



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE INGENIERÍA

Trabajo de Tesis de
Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos

**REMOCIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO POR
NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN
AERÓBICA EN REACTOR DE CARGAS
SECUENCIALES SBR**

Tesista: Ing. Juan Carlos Alzate Marin
Directores: Dra. Noemí E. Zaritzky
Dr. Alejandro H. Caravelli

2019

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos, CIDCA (UNLP, CIC, CCT-La Plata-CONICET), bajo la dirección de la Dra. Noemí E. Zaritzky y el Dr. Alejandro H. Caravelli. El mismo se pone a consideración de las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata, con el objeto de acceder al grado académico de Magister en Tecnología e Higiene de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de la Plata.

Ing. Juan Carlos Alzate Marin

Dra. Noemí E. Zaritzky
Dr. Alejandro H. Caravelli

AGRADECIMIENTOS

- Esta tesis no hubiese tenido un principio y un fin sin el apoyo, la inmensa paciencia, dedicación y motivación personal y profesional de la Dra Noemi Zaritzky y el Dr. Alejandro Caravelli, a quienes debo mi mayor gratitud.
- A los compañeros del grupo de investigación en efluentes del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) con los cuales compartí buenos momentos personales y académicos durante tantos años.
- A mi familia por brindarme el apoyo necesario e incondicional para encarar esta nueva etapa de mi vida.
- Definitivamente a Bibiana, por caminar el día a día conmigo, por cada palabra y cada silencio, por alegrarse con mis alegrías y escuchar mis angustias, por cada aventura...por cuidarme y ser mi complemento.
- Al Centro de Investigaciones y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), por brindar el espacio físico e instrumental que hizo posible el desarrollo de la presente tesis.

Índice

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Contaminación del agua.....	7
1.2. Nitrógeno	9
1.2.1. El ciclo del Nitrógeno.....	10
1.2.2. Contaminación del agua por compuestos nitrogenados	12
1.2.3. Efectos de la descarga de nitrógeno sobre el medio ambiente	13
1.2.3.2. Acidificación	14
1.2.4. Efecto tóxico de los compuestos nitrogenados sobre los seres humanos.....	15
1.2.5. Marco legal.....	17
1.2.5.1. Legislación ambiental para descarga de efluentes	17
1.2.5.2. Normativa para agua de consumo	18
1.2.5.3. Código Alimentario.....	18
1.3. Tratamiento biológico de aguas residuales por lodos activados	19
1.4. Procesos biológicos de eliminación de nitrógeno.....	22
1.4.1. Proceso convencional mediante nitrificación y desnitrificación.....	22
1.4.1.1. Nitrificación biológica.....	22
1.4.1.2. Desnitrificación biológica	24
1.4.1.3. Configuraciones convencionales para la remoción biológica de nitrógeno de las aguas residuales	25
1.4.1.3.1. Configuración Ludzack-Ettinger modificada: Sistema anóxico/aeróbico (AN/AE)....	26
1.4.1.3.2. Configuración Wuhrmann: Sistema aeróbico/anóxico (AE/AN)	27
1.4.2. Nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS).....	28
1.4.3. Proceso Anammox (oxidación anaeróbica de amonio).....	28
1.4.4. Desnitrificación aeróbica (DNA)	30
1.4.5. Reactor de cargas secuenciales (Sequential Batch Reactor, SBR).....	30
1.4.5.1. Reactor de cargas secuenciales basado en nitrificación y desnitrificación a partir de reservas de carbono intracelular	33
1.4.6. Emisión de N ₂ O en plantas de tratamiento con remoción biológica de nitrógeno	35
1.5. Objetivos	36

1.5.1. Objetivo general de la Tesis	37
1.5.2. Objetivos específicos.....	37
1.6. Estructura de la tesis	38
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
METODOLOGÍA.....	40
2.1. Reactor de cargas secuenciales y condiciones de operación.....	40
2.1.1. Sistema de control automático del SBR	41
2.1.1.1. Control de niveles.....	41
2.1.1.2. Control de temperatura y pH	42
2.1.1.3. Control de oxígeno	43
2.1.2. Inoculación del reactor.....	44
2.2 Agua residual sintética	45
2.3. Determinación del tiempo de residencia celular (TRC) y tiempo de residencia hidráulico (TRH).....	45
2.4. Métodos analíticos	46
2.4.1. Potencial de oxidación-reducción	46
2.4.2. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno	47
2.4.3. Determinación de la concentración de biomasa como DQO y sólidos suspendidos volátiles	49
2.4.4. Cuantificación de compuestos inorgánicos solubles de fósforo y nitrógeno	51
2.4.4.1. Cuantificación de ortofosfato (PO_4^{3-})	52
2.4.4.2. Cuantificación de nitrógeno inorgánico (N_i).....	52
2.4.4.2.1. Cuantificación de nitrógeno amoniacal (NH_3).....	52
2.4.4.2.2. Cuantificación de nitrito (NO_2^-)	53
2.4.4.2.3. Cuantificación de nitrato (NO_3^-)	54
2.5. Determinación de las cargas volumétricas de sustrato orgánico y de nitrógeno y fosforo inorgánicos	54
2.6. Detección microscópica de los gránulos de PHA	55
2.7. Detección microscópica de gránulos de polifosfato intracelular	56
2.8. Cuantificación de carbohidratos totales	58
2.9. Análisis estadístico	60

2.10. Diseño experimental	60
CAPITULO 3. ACLIMATACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES.....	62
3.1. Factores que influyen en la nitrificación	63
3.1.1. Temperatura.....	63
3.1.2. Concentración de oxígeno disuelto.....	64
3.1.3. pH	65
3.1.4. Relación DQO/N	66
3.1.5. Efecto de las especies inhibidoras.....	67
3.2. Objetivos del Capítulo	68
3.3. Materiales y Métodos	68
3.3.1. Puesta en marcha del SBR y aclimatación de los lodos activados	68
3.3.2. Selección de bacterias nitrificantes.....	68
3.3.3. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) en el SBR	69
3.3.4. Cuantificación de los procesos de nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS) y desnitrificación (DN) en fase aeróbica	71
3.3.5. Determinación de nitrógeno inorgánico	72
3.3.6. Determinación de las velocidades de nitrificación y desnitrificación	73
3.4. Ensayos experimentales.....	73
3.4.1. Resultados del Ensayo OBCA.....	74
3.4.2. Resultados del Ensayo OBCB.....	76
3.4.3. Discusión de los resultados	79
3.5. Conclusiones del Capítulo	80
CAPITULO 4. ALTERNATIVAS PARA MEJORAR EL PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN	81
4.1. Factores que influyen en la desnitrificación tradicional (anóxica) y aeróbica	82
4.1.1. Desnitrificación anóxica	82
4.1.1.1. Temperatura.....	82
4.1.1.2. Oxígeno disuelto	82
4.1.1.3. pH	83

4.1.1.4. Fuente de carbono	83
4.1.2. Desnitrificación aeróbica.....	84
4.2. Objetivos del Capítulo	86
4.3. Materiales y Métodos	86
4.3.1. Selección de bacterias desnitrificantes. Puesta en marcha y estabilización del SBR.....	86
4.3.2. Ensayos experimentales.....	87
4.3.2.1. Resultados del Ensayo OACB.....	89
4.3.2.2. Resultados del Ensayo OACM	92
4.3.2.3. Resultados del Ensayo OACA.....	95
4.4. Modelado Matemático de la difusión de oxígeno en el flóculo	97
4.4.1. Resolución de las ecuaciones diferenciales	97
4.4.2. Medición de la velocidad de consumo de oxígeno	99
4.4.3. Medición de tamaño del flóculo por observación microscópica	101
4.4.3.1. Distribución de tamaño de flóculos	103
4.5. Perfiles de concentración de oxígeno en el flóculo	105
4.6. Discusión de los resultados	106
4.7. Conclusiones del Capítulo	110
CAPITULO 5. CONCLUSIONES FINALES.....	111
Bibliografía.....	115

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminación del agua

El agua es un recurso natural esencial para la supervivencia de todas las formas de vida conocidas. La calidad de este recurso está cada día más degradada debido principalmente a acciones de origen antropogénico, derivadas de actividades de tipo doméstico, el crecimiento de la población y el aumento de la actividad agrícola e industrial que se genera por la necesidad de producir mayor cantidad de alimentos en menor tiempo y en terrenos no aptos por su baja concentración de nutrientes (Papadakis y col., 2007). La problemática ambiental que representa el vertido sin control de residuos líquidos y sólidos sobre medios acuáticos naturales como acuíferos, ríos y lagos, ha ocasionado que el tratamiento de las aguas residuales se convierta en foco de interés de los países en vía de desarrollo (WHO, 1989).

Uno de los factores que más influye en el tratamiento de efluentes líquidos es su composición. El origen de las aguas residuales es un aspecto importante que define sus características físicas, químicas y biológicas.

Se distinguen cuatro fuentes fundamentales de aguas residuales:

- 1) Aguas Domésticas o Urbanas.
- 2) Aguas Residuales Industriales.
- 3) Escorrentías de Usos Agrícolas.
- 4) Pluviales.

Los contaminantes presentes en los efluentes se clasifican en tres categorías: químicos, físicos y biológicos (Tabla 1.1).

Los contaminantes químicos comprenden tanto compuestos químicos inorgánicos como orgánicos. Muchos de los compuestos inorgánicos son tóxicos para los seres humanos, tales como los metales pesados, elementos radioactivos, pesticidas, hidrocarburos, fenoles, entre otros (Orozco y col., 2002).

Tabla 1.1. Características físicas, químicas y biológicas del agua residual (A.R) y sus procedencias (Metcalf y Eddy, 1995).

Características	Procedencia
Propiedades físicas	
Color, olor, temperatura	A.R. Domesticas e industriales
Constituyentes químicos orgánicos	
Carbohidratos, grasas, aceites	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Pesticidas	Residuos agrícolas
Fenoles	Vertidos industriales
Proteínas	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Compuestos orgánicos volátiles	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Contaminantes prioritarios	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Constituyentes químicos inorgánicos	
Alcalinidad	A.R. domésticas, agua de suministro
Cloruros	A.R. domésticas, agua de suministro
pH	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Fósforo	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Contaminantes prioritarios	A.R. domésticas, industriales y comerciales
Azufre	A.R. domésticas, agua de suministro
Gases	
Sulfuro de hidrógeno	Descomposición de residuos domésticos
Metano	Descomposición de residuos domésticos
Oxígeno	Agua de suministro, infiltración de agua superficial
Constituyentes biológicos	
Animales, plantas	Cursos de agua y plantas de tratamiento
Protistas	A.R. domésticas, plantas de tratamiento, infiltración de agua
Virus	A.R. domesticas

El aspecto fundamental resultante de la contaminación por compuestos orgánicos es la disminución de oxígeno disuelto por la degradación biológica; en el caso de los compuestos inorgánicos el efecto más importante es su toxicidad. Sin embargo, hay ocasiones en las cuales los compuestos inorgánicos presentan demanda de oxígeno, como es el caso de los sulfitos, amonio, y los nitritos. En el caso de los compuestos nitrogenados el amonio es el responsable de la mayor demanda de oxígeno.

Dentro de los contaminantes físicos los más relevantes son los siguientes:

- a) Cambios térmicos (contaminación térmica) por la descarga de aguas relativamente calientes procedentes de plantas industriales, después de haber sido utilizadas en los intercambiadores de calor.
- b) El color generado por licores negros que se descargan procedentes de las plantas de fabricación de pasta química, fabricación de colorantes, etc.
- c) Turbidez por la presencia de sólidos en suspensión originada por la descarga de aguas que contienen sólidos en suspensión.
- d) Formación de espumas por la presencia de detergentes tales como sulfonato de alquilbenceno (SAB).
- e) Radioactividad.

Dentro de los contaminantes biológicos son de particular importancia aquellos responsables de la transmisión de enfermedades por aguas de abastecimiento, como son el cólera, fiebre tifoidea, paratifoidea (Ramalho, 1993).

1.2. Nitrógeno

El nitrógeno es a menudo un nutriente limitante para la vida, a pesar de su presencia en el aire y el agua. Es el elemento químico más abundante que se encuentra en la atmósfera terrestre (casi el 80%), encontrándose principalmente como gas inerte en su forma diatómica (N_2) que debido a la gran fuerza de sus triples enlaces debe ser fijado

o disociado antes que pueda ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos (Yung, 1979). El nitrógeno es uno de los componentes esenciales de muchas biomoléculas (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos). En los tejidos vivos, los elementos químicos más comunes son: el carbono, el oxígeno, el hidrógeno y en cuarto lugar se encuentra el nitrógeno (Camargo y Alonso, 2006).

1.2.1. El ciclo del Nitrógeno

En la Figura 1.1 se encuentran descritos los procesos implicados en el ciclo de nitrógeno los cuales están influenciados por factores naturales y antropogénicos. Este ciclo depende de manera directa de componentes bióticos entre los cuales se encuentran las plantas, microorganismos, animales y seres humanos y abióticos como la temperatura, pH, características del suelo, luz solar, etc. Para poder desarrollarse el ciclo del nitrógeno es fundamental fijar o disociar el nitrógeno que se encuentra en forma de gas diatómico en la atmósfera terrestre y convertirlo en formas de nitrógeno químicamente activas; para ello existen dos estrategias fundamentales:

a- Fijación electroquímica: basada en la energía contenida en los rayos y relámpagos que rompe las moléculas de N_2 y permite que se combine con el oxígeno del aire (O_2), formando óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2). Posteriormente, el dióxido de nitrógeno reacciona con agua para formar ácido nítrico (HNO_3), el cual cae junto con el agua de lluvia e incrementa la disponibilidad de nitratos en los océanos y en el suelo (Yung, 1979).

b- Fijación biológica: este proceso se da por un grupo de bacterias conocidas como diazotróficas, las cuales están encargadas de fijar el nitrógeno atmosférico al suelo y a las raíces de las plantas. Este fenómeno se basa en la capacidad de estas bacterias para romper el nitrógeno molecular y combinarlo con el hidrógeno para formar amoníaco (NH_3), el cual será oxidado por bacterias nitrificantes para formar nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Finalmente las bacterias desnitrificantes se encargan de reducir los nitratos y nitritos a óxidos de nitrógeno y nitrógeno gaseoso; este fenómeno es la fuerza motriz para el regreso del nitrógeno a la atmósfera, manteniendo en marcha el ciclo del nitrógeno, siendo esta la única manera que el nitrógeno no termine disuelto en mares dejando sin

nutrientes a la vida continental y generando su agotamiento en la atmósfera (Capone, 2006). El nitrógeno en forma de amonio y nitratos es asimilable por las plantas, las cuales los utilizan para sintetizar aminoácidos, proteínas y ácidos nucleídos; los animales herbívoros obtienen el nitrógeno alimentándose de estas plantas y así este elemento comienza a recorrer toda la cadena alimentaria (Moiser y col., 1998). Este proceso es considerado un fenómeno evolutivo que permitió que prosperara la vida en la tierra (Capone, 2006).

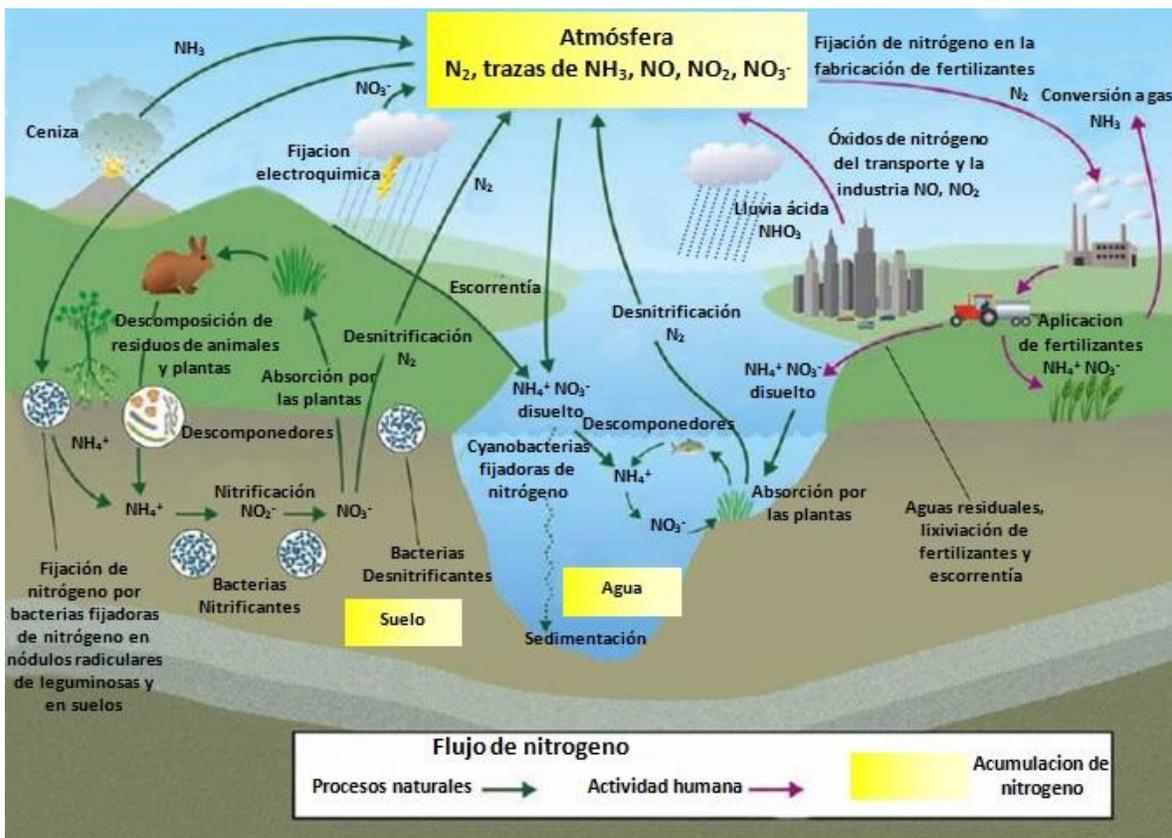


Figura 1.1 Ciclo del nitrógeno adaptado de Moiser y col. (1998)

El nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos y terrestres puede estar en diferentes formas de acuerdo a su estado de oxidación (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Estados de oxidación de compuestos nitrogenados inorgánicos y orgánicos
(Metcalf y Eddy, 1995)

Compuesto	Estado de oxidación
Nitrógeno orgánico (R-NH ₂)	-3
Amonio (NH ₄ ⁺)	-3
Nitrógeno gaseoso (N ₂)	0
Óxido nitroso (N ₂ O)	+1
Óxido de nitrógeno II (NO)	+2
Nitrito (NO ₂ ⁻)	+3
Dióxido de nitrógeno (NO ₂)	+4
Nitrato (NO ₃ ⁻)	+5

1.2.2. Contaminación del agua por compuestos nitrogenados

Las formas inorgánicas de nitrógeno son las más comunes en los sistemas acuáticos, entre las cuales se encuentran: NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻. La presencia de estos compuestos puede estar dada por dos tipos de contaminación:

- a- **Fuente natural:** la cual está dada por el resultado del equilibrio dinámico de la tierra, fases del ciclo natural del agua y del ciclo del nitrógeno.
- b- **Fuente artificial (antropogénica):** resultado de la actividad humana dada en gran medida por las actividades de tipo agrícola, industrial, urbana y producción animal.

El contenido de nutrientes de origen natural en los suelos de cultivo generalmente no es suficiente para lograr una adecuada fertilidad, lo que hace necesario el uso de fertilizantes que contienen diferentes formas de nitrógeno como son: el amoniaco anhidro, urea, sulfato de amonio, nitrato de amonio, etc. Dichos productos son arrastrados por fenómenos de escorrentía y percolación siendo responsables de la presencia de compuestos como NH₄⁺ y NO₃⁻ en las aguas superficiales y subterráneas; tan solo un 10-15 % de la cantidad del fertilizante aplicado al suelo es empleado por las plantas e incorporado a la cadena alimentaria (Discoll, C.T., 2003; y Mulder, 2001).

En aguas residuales, el nitrógeno se puede encontrar en compuestos inorgánicos (NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻), así como formas de nitrógeno orgánico como son las proteínas,

aminoácidos y urea. Debe destacarse que las formas amoniacales y orgánicas son las que predominan en las aguas residuales. Los desechos industriales contienen grandes cantidades de sustancias nitrogenadas, generalmente amoniaco que es utilizado como materia prima en la producción de explosivos, plásticos, resinas, nylon, colorantes, pesticidas y productos farmacéuticos. En gran medida estos desechos no son tratados adecuadamente y son depositados directamente en los cuerpos de agua (Cervantes, 2009).

Las aguas residuales urbanas y las excretas de animales aportan gran cantidad de nitrógeno que proviene principalmente del metabolismo de las proteínas. Aproximadamente el 60% del nitrógeno presente en las aguas residuales urbanas se encuentra en forma orgánica, constituido principalmente por aminoácidos, proteínas y urea; mientras que el 40% restante se encuentra en forma inorgánica como amonio (Fields, 2004).

1.2.3. Efectos de la descarga de nitrógeno sobre el medio ambiente

1.2.3.1. Eutrofización

Según la Unión Europea en su Directiva 91/271/CEE sobre tratamiento de las aguas residuales urbanas, la eutrofización se define como el aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno o de fósforo, que estimulan crecimiento acelerado de algas y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta.

Este fenómeno causa un desequilibrio en el nivel de fertilidad acuática debido a que el ambiente acuático pasa de un estado trófico determinado a uno superior, definiéndose el estado trófico de los cuerpos de agua como su grado de fertilidad o bien su nivel de concentración de nutrientes y productividad (Magrama, 2003; Conzonno, 2009; Huang y col., 2015). El impacto ambiental más drástico generado por la eutrofización de cuerpos de agua está dado por el agotamiento del oxígeno disuelto, siendo éste utilizado en los procesos de oxidación de la materia orgánica de plantas y algas, con graves

consecuencias como la muerte de la vida acuática; además pueden crecer cianobacterias, algunas de las cuales son productoras de toxinas carcinogénicas (Wentzel, 1990).

En la Tabla 1.3 se pueden evidenciar los efectos tóxicos generados por el proceso de eutrofización sobre el medio acuático y los organismos nativos.

Existen diversos tipos de industrias como petroquímicas, farmacéuticas, producción de fertilizantes o alimentarias que generan aguas residuales con elevadas cargas de compuestos nitrogenados principalmente nitrógeno orgánico biodegradable, nitrógeno amoniacal y nitritos, que son vertidos sin control a los sistemas acuáticos generando un fuerte impacto sobre los cuerpos de agua que los recibe, contribuyendo a problemas de eutrofización por la alta demanda de oxígeno al ser oxidados biológicamente. Aproximadamente se necesitan 4,57 g de O₂ por cada g de nitrógeno amoniacal oxidado hasta nitrato (Third, 2003; Metcalf y Eddy 1995):



1.2.3.2. Acidificación

La mayor contribución de la acidez en los cuerpos de agua dulce está dada por el proceso de nitrificación, ya que la oxidación de nitrógeno amoniacal a nitrato produce iones de hidrógeno (Schuurkes y Mosello, 1988; Vitousek y col., 1997; Wetzel, 2001). Este fenómeno solo ocurre en la primera etapa de la nitrificación (Metcalf y Eddy, 1995):



Por otro lado, a nivel atmosférico, el óxido nitroso (N₂O) y el óxido nítrico (NO), comúnmente denominados NO_x, poseen entre 200 y 300 veces más capacidad de retención de la radiación térmica en comparación con el CO₂. Los óxidos de nitrógeno reaccionan con el agua formando ácido nítrico (HNO₃) y ácido nitroso (HNO₂). Estos compuestos caen con el agua de lluvia contribuyendo a la acidificación de los cuerpos de agua superficiales (Fig. 1.1) que no tiene capacidad de neutralizar la acidez es decir aquellos que presentan moderada alcalinidad (Schmidt y col., 2003; Camargo, 2006).

Tabla 1.3. Efectos ecológicos y toxicológicos de la eutrofización de los ecosistemas acuáticos (Camargo y Alonso, 2006)

-
- Reducción de la transparencia de la columna de agua y disponibilidad de luz.
 - Incremento de la cantidad de materia orgánica que sedimenta.
 - Reducción de la concentración de oxígeno disuelto (condiciones hipóxicas o anóxicas) en aguas profundas y sedimentos.
 - Formación de compuestos químicos reducidos (tóxicos) como el sulfuro de hidrogeno (H₂S) en agua profundas y sedimentos.
 - Liberación de fósforo de los sedimentos que puede reforzar la eutrofización.
 - Incremento de la biomasa y actividad del fitoplancton.
 - Cambios en la composición del fitoplancton, algunas especies pueden ser tóxicas (por ejemplo, cianobacteria *Microcystis* en aguas dulces y dinoflagelado *Alexandrium* en aguas costeras).
 - Incremento de biomasa, productividad y composición de especies del perifiton de agua dulce (complejo conjunto de organismos de bacterias, hongos, algas y protozoos embebidos en una matriz de polisacáridos)
 - Incremento de biomasa, productividad y composición de especies macrófitas de agua dulce.
 - Incremento de biomasa, productividad y composición de comunidades de macroalgas marinas.
 - Pérdida de biodiversidad en especies y comunidades de fitoplancton, perifiton, macrófitas y macroalgas.
 - Incremento de la biomasa, productividad y composición de especies de zooplancton. Pérdida de biodiversidad debido al desarrollo de especies dominantes.
 - Cambios en la biomasa, productividad y composición de especies de invertebrados bentónicos y peces a menudo con eventos de mortalidad masiva en poblaciones sensibles y degradación de las condiciones de hábitat para la reproducción.
 - Pérdidas de diversidad de especies en zooplancton, invertebrados bentónicos y comunidades de peces
 - Reducción de la biodiversidad y tamaño de las poblaciones de coral marino.
 - Alteraciones de la cadena alimentaria de los ecosistemas marinos, de agua dulce, estuarios y costeros que afectan todos los niveles tróficos.
-

1.2.4. Efecto tóxico de los compuestos nitrogenados sobre los seres humanos

Las elevadas concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en los cuerpos de agua son tóxicas para los organismos acuáticos perjudicando la capacidad de crecer y reproducirse. La ingesta en los seres humanos de agua o alimentos contaminados por estos compuestos químicos pueden producir un deterioro de la salud e incluso la muerte.

El gran problema de salud en los seres humanos por ingestión de agua contaminada con nitritos y nitratos es el riesgo de padecer metahemoglobinemia, enfermedad que se caracteriza por la pérdida en la capacidad de transporte de oxígeno en sangre. La hemoglobina, una hemoproteína encargada de transportar el oxígeno en la sangre, es oxidada por estos compuestos a metahemoglobina con poca afinidad por el oxígeno (Jensen y col 2012). Los grupos más vulnerables son: mujeres embarazadas, mujeres lactantes, personas de edad avanzada y bebés ("síndrome del bebé azul"). Más de 3000 casos de metahemoglobinemia han sido informados alrededor del mundo desde 1945, los cuales siempre han estado asociados con el consumo de agua proveniente de pozos con niveles de concentración de nitrato superior a 10 mg N/L (Wolfe y Patz, 2002). Por otro lado, el consumo de nitritos y nitratos está asociado a la formación de compuestos nitrogenados como las nitrosaminas, generalmente formadas en medio ácido en el estómago por la reacción entre una amina secundaria y el nitrito, teniendo un alto potencial cancerígeno y mutagénico (Fewtrell, 2004). También se ha relacionado el consumo de nitritos y nitratos a casos de deformaciones en recién nacidos, infecciones en el tracto respiratorio y enfermedades coronarias (Grupta y col., 2000).

La incorporación de compuestos nitrogenados a los cuerpos receptores de agua puede favorecer el desarrollo de organismos transmisores o causantes de enfermedades como la malaria y el cólera; además estos nutrientes generan el aumento de algas productoras de toxinas que al ser ingeridas en el agua o alimentos pueden dar lugar a trastornos fisiológicos como náuseas, vómitos, diarrea, gastroenteritis, neumonía, dolores musculares y diversos síntomas de intoxicación (Brusse y col., 2006). Asimismo, el nitrógeno amoniacal presente en el agua tratada reacciona con el cloro utilizado como desinfectante, dando lugar a la formación de cloraminas y tricloruro de nitrógeno de menor poder desinfectante que el cloro (Gerardi, 2003).

1.2.5. Marco legal

1.2.5.1. Legislación ambiental para descarga de efluentes

La legislación de la Provincia de Buenos Aires establece normas de calidad de los vertidos de los efluentes líquidos domésticos y/o industriales a los distintos cuerpos receptores, siendo uno de los parámetros de control más relevantes la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) y la demanda química de oxígeno (DQO). La normativa ambiental vigente en la Pcia de Buenos Aires, del Código de aguas (Ley 12257) y su decreto reglamentario N° 2009/60, en su resolución 336/03 establece los límites de descarga admisible para diferentes agentes contaminantes. En la Tabla 1.4 se presentan algunos de los parámetros más relevantes.

**Tabla 1.4. Parámetros de calidad de las descargas límites admisibles
(Resolución N° 336/2003. Buenos Aires. Anexo II. Directorio de la Autoridad del Agua de la
Provincia de Buenos Aires)**

Parámetro	Unidad	Límites de descarga			
		Conducto pluvial o cuerpo de agua superficial	Colectora Cloacal	Absorción por el suelo	Mar abierto
D.B.O.	mg/L	≤50	≤200	≤200	≤200
D.Q.O.	mg/L	≤250	≤700	≤500	≤500
Nitrógeno Total (a)	mg/L	≤35	≤105	≤105	≤105
Nitrógeno Amoniacal (a)	mg/L	≤25	≤75	≤75	≤75
Nitrógeno Orgánico (a)	mg/L	≤10	≤30	≤30	≤30

(a) Estos límites serán exigidos en las descargas a lagos, lagunas o ambientes favorables a procesos de eutrofización. De ser necesario, se fijara la carga total diaria permisible en kg/día.

Nitrógeno total equivalente a la suma del nitrógeno Kjeldahl total (N orgánico y amoniacal), nitrógeno en forma de nitrato (NO_3) y nitrógeno en forma de nitrito (NO_2).

La Directiva 91/271/CEE de la Comunidad Económica Europea (European Commission, 1991) establece los requisitos de los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas: $\text{DBO}_5 < 25 \text{ mg O}_2/\text{L}$, $\text{DQO} < 125 \text{ mg O}_2/\text{L}$, N total $< 10\text{-}15 \text{ mg N/L}$ dependiendo en este caso del número de habitantes-equivalente, entre otros parámetros.

1.2.5.2. Normativa para agua de consumo

La Ley 11.820 de Prestación de Servicios Públicos y Desagües Cloacales en la Provincia de Buenos Aires (1996), en su Anexo A presenta los límites tolerables de componentes que afectan a la salud en el agua de consumo, entre ellos se encuentran los correspondientes a nitrato y nitrito:

- Nitrato (como NO_3^-): 50 mg/L
- Nitrito (como NO_2^-): 3 mg/L

1.2.5.3. Código Alimentario

El Código Alimentario Argentino determina en el Capítulo XII (Bebidas hídricas, agua y agua gasificada) – Artículo N° 982 (Resolución Conjunta N° 68/2007 y N° 196/2007) las características físicas, químicas y microbiológicas que deberá cumplir el agua para ser considerada potable. Los valores máximos informados por el código para las diferentes formas de nitrógeno son los siguientes:

- Amoníaco (NH_4^+): 0,20 mg/L
- Nitrato (NO_3^-): 45 mg/L
- Nitrito (NO_2^-): 0,10 mg/L

Límites similares han sido determinados para agua potable por la ley 19.587 de Higiene y seguridad en el trabajo - Decreto 351/79, en su Capítulo VI (Provisión de agua potable) – Artículo 58 – Resolución 523/95.

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2004) ha fijado valores guía para los nitratos y nitritos en agua potable, indicando las concentraciones a partir de las cuales representarían un riesgo importante para la salud de la población:

- Nitrito (como NO_2^-): 0,2 mg/L
- Nitrato (como NO_3^-): 50 mg/L

1.3. Tratamiento biológico de aguas residuales por lodos activados

En la actualidad la sociedad está cada vez más urbanizada e industrializada. Con una población mundial en expansión, se hace necesario desarrollar e implementar tecnologías eficientes y económicamente viables para el tratamiento de aguas residuales. La preocupación por la gestión de los residuos hídricos y los niveles de nutrientes en los cuerpos de agua receptores conlleva a los organismos gubernamentales a establecer normas ambientales cada día más exigentes; esto hace que el tratamiento de aguas residuales sea esencial.

El tratamiento de aguas residuales está mejorando constantemente al igual que la comprensión de los microorganismos implicados en la eliminación de nutrientes. Actualmente los procesos biológicos constituyen el tratamiento más utilizado tanto para aguas domésticas como industriales. Dentro de los sistemas biológicos, el proceso de lodos activados es el más utilizado, este término hace referencia a un proceso biológico que utiliza una comunidad mixta de microorganismos que metabolizan y transforman las sustancias orgánicas e inorgánicas en formas ambientalmente aceptables (Irvine y col., 1997; Seviour y Blackall, 1999).

La microbiología típica de los lodos activados se compone de aproximadamente 95% de bacterias, las cuales incluyen los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium* y las dos bacterias nitrificantes más comunes, *Nitrosomas* y *Nitrobacter*. Adicionalmente se pueden presentar diversas formas de bacterias filamentosas tales como: *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*,

Thiotrix, *Lecicothrix* y *Geotrichum*. También se encuentran otros microorganismos como protozoos y pequeños metazoos (Wanner, 1994).

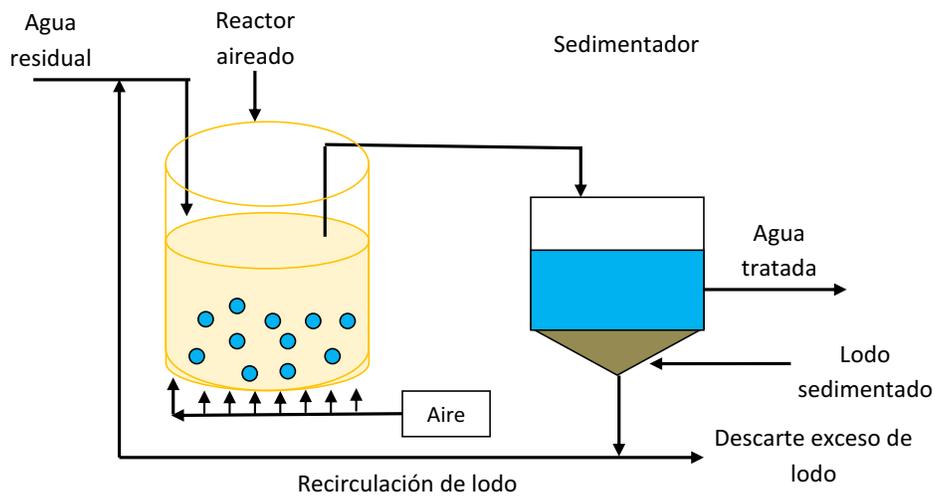


Figura 1.2. Esquema del proceso de lodos activados
(Schmidell y col., 2007)

El proceso básico por lodos activados consta de un reactor o tanque de aireación y un sedimentador o clarificador secundario. El agua residual cruda se introduce en el reactor donde se mantiene en suspensión el cultivo bacteriano aeróbico, el cual es el responsable de la degradación de los contaminantes (Figura 1.2). Los lodos activados están compuestos de dos componentes: uno biológico formado por una amplia variedad de bacterias, hongos, protozoos y algunos metazoos y un componente no biológico compuesto de partículas orgánicas e inorgánicas. Estos componentes se disponen formando flóculos (Figura 1.3). Los flóculos de lodos activados conjuntamente con los compuestos orgánicos e inorgánicos solubles y particulados, presentes en el tanque de aireación, constituyen lo que se denomina licor de mezcla.

El licor de mezcla pasa al clarificador, que se encuentra en serie con el reactor aireado, permitiendo la separación de los flóculos microbianos del agua tratada por sedimentación. El sobrenadante clarificado, denominado efluente secundario, puede ser descargado a un cuerpo de agua receptor, previa desinfección con cloro, o pasar a otra etapa para un tratamiento complementario. El lodo sedimentado es en parte retornado al tanque de aireación, permitiendo que éste opere con elevada concentración de biomasa,

mientras que el exceso de lodo producido es enviado a tratamientos posteriores de secado y disposición final (Schmidell y col., 2007) (Figura 1.2).

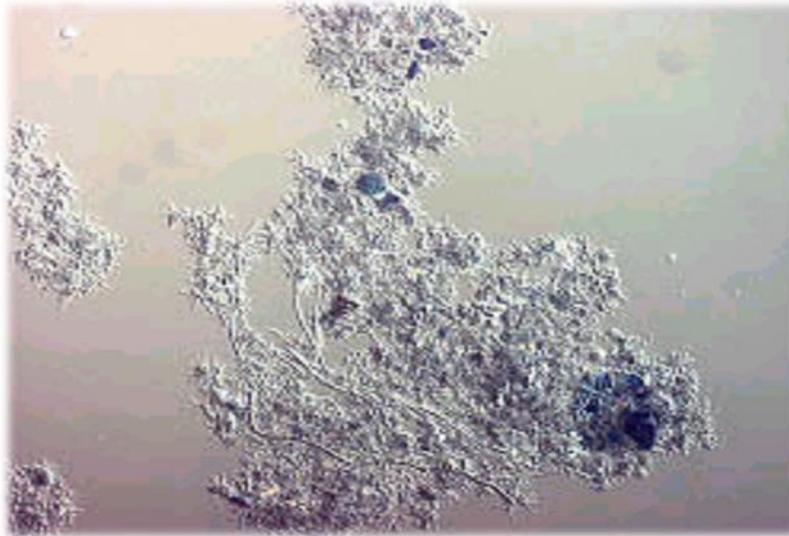


Figura 1.3. Flóculo de lodos activados

La capacidad de los microorganismos para flocular constituye la propiedad más importante de los sistemas de lodos activados. Esta capacidad de floculación puede ser considerada como una presión selectiva primaria en el cultivo mixto de lodos activados.

Los microorganismos que tienen la capacidad de formar flóculos y aquellos que se fijan a los mismos tienen las siguientes ventajas selectivas sobre aquellas células que están dispersas en el licor de mezcla:

- a- Los microorganismos que forman agregados microbianos (flóculos microbianos) son retenidos en el sistema de lodos activados pues los flóculos sedimentan en el sedimentador secundario y retornan al tanque de aireación. En cambio, los microorganismos dispersos en el licor de mezcla del tanque de aireación son lavados del sistema a través del efluente secundario.
- b- El crecimiento en flóculos protege a la mayoría de las células microbianas de los depredadores.

Debe destacarse que si bien las bacterias son los microorganismos que realmente degradan el residuo orgánico del efluente, las actividades metabólicas de otros microorganismos son también importantes en el sistema de lodos activados. Por ejemplo, los protozoos y rotíferos ejercen una acción de refinado de los efluentes. Los protozoos consumen las bacterias dispersas que no han floculado y los rotíferos consumen cualquier partícula biológica pequeña que no haya sedimentado (Metcalf y Eddy., 1995).

1.4. Procesos biológicos de eliminación de nitrógeno

1.4.1. Proceso convencional mediante nitrificación y desnitrificación

La remoción biológica convencional de nitrógeno implica dos procesos. En la primera etapa conocida como nitrificación se convierte el amoníaco a nitrato reduciendo la demanda de oxígeno del efluente. No obstante, en este paso, el nitrógeno no se elimina (Wei y col., 2014). En la segunda etapa conocida como desnitrificación, el nitrato es convertido en un producto gaseoso que puede ser óxido nitroso (N_2O , desnitrificación parcial) o nitrógeno gaseoso (N_2 , desnitrificación completa), los cuales finalmente son eliminados a la atmósfera (Zhang y col., 2012). El proceso de nitrificación y desnitrificación constituye el método más apropiado para la eliminación del nitrógeno, presentando una elevada eficacia, una alta estabilidad y fiabilidad, fácil control del proceso, bajas necesidades de espacio y económicamente rentable (Ferrer y Secco. 2008).

1.4.1.1. Nitrificación biológica

La nitrificación biológica es el primer paso en la eliminación de nitrógeno, implica una oxidación de amoníaco a nitrito o nitrato. Este proceso, denominado nitrificación biológica vía nitrato, es muy difundido y está caracterizado por ocurrir bajo condiciones aeróbicas estrictas, llevándose a cabo en dos etapas de oxidación. Inicialmente ocurre la oxidación del amonio (NH_4^+) hasta nitrito (NO_2^-), proceso conocido como nitrificación, y luego la oxidación de nitrito hasta nitrato (NO_3^-) denominado nitratación. Ambos procesos son realizados por bacterias nitrificantes autótrofas (Figura 1.4) requiriendo la presencia

de oxígeno, por lo tanto si predominan condiciones reductoras se dificulta la formación del nitrato (Münch y col., 1996; Gerardi, 2003; Schmidt y col., 2003).

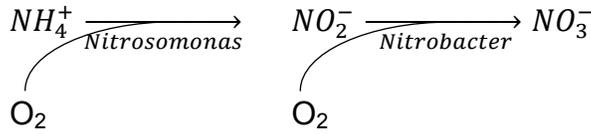
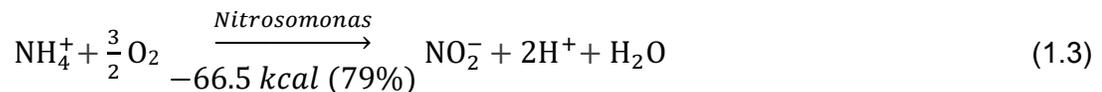
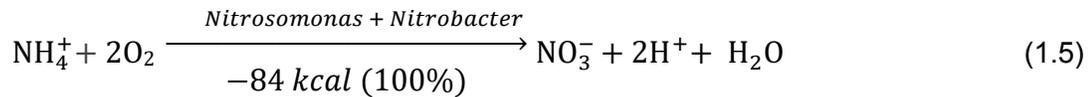


Figura 1.4. Nitrificación biológica en proceso de lodos activados (Gerardi, 2003)

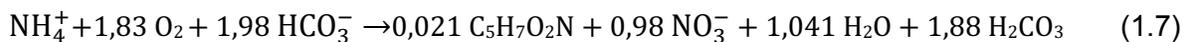
Cada etapa de oxidación se lleva a cabo por diferentes géneros de bacterias como son bacterias oxidantes de amonio (BOA) y bacterias oxidantes de nitrito (BON) que usan amoníaco o nitrito como fuente de energía respectivamente, oxígeno molecular (O₂) como último aceptor de electrones y dióxido de carbono (CO₂) como fuente de carbono (Ahn, 2006). El género más común de bacterias autótrofas que lleva a cabo la oxidación del amonio es *Nitrosomonas* spp., en el caso de la oxidación de nitrito es *Nitrobacter* spp. (Kim y col., 2008). *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus* también son capaces de oxidar amonio a nitrito (Yu y col., 2010). Estas bacterias oxidantes de amonio son genéticamente diversas pero relacionadas entre sí en la subdivisión beta de las proteobacterias. Se sabe que *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrocystis* están involucrados en la oxidación de nitritos (Ahn, 2006). Los géneros oxidantes de nitrito pertenecen a las subdivisiones alfa, gamma y delta de las proteobacterias (Teske y col., 1994).

Las bacterias involucradas en el proceso de nitrificación utilizan la energía generada en la reacción de oxidación de amonio a nitrito y nitrato para el crecimiento y mantenimiento celular (Ecs. 1.3 y 1.4). En la ecuación 1.5 se presenta la reacción energética global (Randall y Buth, 1984).





Junto con la producción de energía, una fracción del amonio se asimila como parte de la biomasa celular (Randall y Buth, 1984). En la ecuación 1.6 se presenta la reacción de síntesis de biomasa. La reacción global de oxidación y síntesis se presenta en la ecuación 1.7.



La tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes es bastante lenta debido a que la producción de energía en las reacciones es relativamente baja. Los rendimientos para *Nitrosomonas* están en el intervalo 0,04-0,13 mg SSV/mg NH_4^+ -N oxidado, mientras que para *Nitrobacter* es 0,02-0,07 mg SSV/mg NO_2^- -N oxidado (Randall y Buth, 1984). Se informaron similares rendimientos para *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*: 0,15 mg SSV/mg NH_4^+ -N oxidado y 0,02 mg SSV/mg NO_2^- -N oxidado respectivamente; con el respecto al oxígeno se informaron los siguientes rendimientos: 3,16 mg O_2 /mg NH_4^+ -N y 1,11 mg O_2 /mg NO_2^- -N oxidado para *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* respectivamente (Ahn, 2006).

1.4.1.2. Desnitrificación biológica

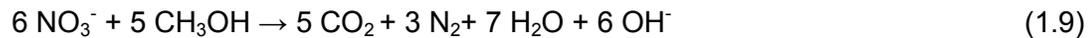
La desnitrificación (DN) es un proceso metabólico que se da generalmente en condiciones anóxicas por acción de bacterias heterótrofas facultativas que reducen el nitrato hasta nitrógeno molecular. Esta reacción ocurre en etapas consecutivas (Ec. 1.8) apareciendo como productos intermedios nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O); dado que estos compuestos nitrogenados son gases insolubles, no pueden ser incorporados al material celular, sino que escapan a la atmósfera (Gerardi, 2003). Las bacterias desnitrificantes utilizan el carbono orgánico para la síntesis celular y fuente de energía y el nitrato como aceptor final de electrones constituyendo un mecanismo respiratorio alterno (EPA, 2010). Este proceso se da generalmente por acción de diversos géneros de bacterias entre las cuales se pueden destacar: *Achromobacter*, *Aerobacter*,

Alcaligenes, Bacillus, Brevibacterium, Lactobacillus, Micrococcus, Proteus, Pseudomonas y *Spirillum* (Metcalf y Eddy, 1995).

El proceso de desnitrificación se lleva a cabo por enzimas específicas que han sido ampliamente estudiadas (Zumft, 1997; Ji y col., 2015). La nitrato reductasa (Nar), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos) catalizan el proceso de reducción en etapas como se presenta en la ecuación 1.8:



La reacción global de la desnitrificación considerando el metanol como fuente de carbono puede ser descrita del siguiente modo:



Los coeficientes estequiométricos para desnitrificación usando metanol como fuente de carbono varían entre 3,75 y 4,5 mg DQO/mg NO_3^- -N (Ahn, 2006).

1.4.1.3. Configuraciones convencionales para la remoción biológica de nitrógeno de las aguas residuales

Desde el punto de vista biológico el carbono no es un compuesto difícil de eliminar, por el contrario, uno de los problemas más comunes en las plantas de tratamiento de aguas residuales es la falta de carbono orgánico para llevar a cabo el proceso de desnitrificación. Por lo tanto, las plantas de tratamiento con bajas relaciones de DQO:N experimentan dificultades en la remoción de nitrógeno debido a la escasez de sustrato orgánico (Pitman, 1991; Zeghal y col., 1997b).

Hasta la década de 1960, el objetivo de las plantas de tratamiento de aguas residuales consistía en remover sólidos en suspensión, materia carbonácea y microorganismos patógenos. No obstante, debido al crecimiento industrial y poblacional se comenzaron a conocer los problemas del vertido sin control de nitrógeno presente en los efluentes. Por ello Ludzack y Ettinger (1961) y Wuhrmann (1964) desarrollaron sistemas de tratamiento biológico con el fin de eliminar nitrógeno de las aguas residuales

incorporando nuevas etapas (nitrificación-desnitrificación) al proceso tradicional. Sin embargo, el sistema Ludzack y Ettinger (anóxico-aeróbico) no utilizaba una recirculación del licor mixto, desaprovechando significativamente la demanda biológica de oxígeno (DBO) del influente. A principio de los años setenta Barnard modificó el diseño propuesto por Ludzack y Ettinger, incluyendo una recirculación interna, lo cual permitió utilizar la DBO del influente para la desnitrificación. Dicho sistema es conocido como proceso modificado de Ludzack-Ettinger. También demostró que la secuencia anaeróbica-aeróbica del lodo activado, con la carga de la DBO del influente entrando primero a la zona anaeróbica, era necesaria para realizar la remoción biológica de fósforo (RBP). En 1978 se realizaron estudios sobre un proceso de cuatro etapas (anóxico-aerobio-anóxico-aeróbico) diseñado principalmente para la eliminación de nitrógeno, el cual fue patentado como el Proceso Bardenpho (1978). La versión de cinco etapas, creada al agregar una zona anaeróbica como la primera etapa, se conoció como el Proceso de Bardenpho modificado (EPA, 2010).

De todos los métodos posibles para la eliminación del nitrógeno, la nitrificación y desnitrificación biológica suele ser el más adecuado por las siguientes razones: elevados rendimientos en la remoción de nitrógeno, alta estabilidad y fiabilidad del proceso de remoción de nitrógeno, relativa facilidad de control del proceso, necesidades reducidas de espacio y costos moderados (Ahn, 2006).

1.4.1.3.1. Configuración Ludzack-Ettinger modificada: Sistema anóxico/aeróbico (AN/AE)

Este tipo de tecnología es la más utilizada en los sistemas convencionales de remoción de nitrógeno, siendo también conocida como sistema de pre-desnitrificación. Este proceso está conformado por dos reactores en serie caracterizándose porque la zona anóxica se encuentra antes de la aeróbica (Figura 1.5). En el primer reactor se realiza la desnitrificación empleando como fuente de carbono orgánico el agua residual (afluente), en el segundo tanque (reactor aeróbico), el nitrógeno amoniacal es oxidado a nitrato, siendo necesaria la recirculación del licor mixto rico en nitratos al tanque anóxico para su desnitrificación. Varias desventajas están asociadas a este proceso como son: a) los altos costos implicados en la recirculación, b) la producción de óxidos de nitrógeno

como producto final en lugar de N_2 debido a condiciones microaerófilas generadas por la recirculación (Robertson y col., 1995), c) la limitación de fuente de carbono en el tanque anóxico, causada por la dilución ejercida por la recirculación de nitratos, resultando una acumulación de productos intermedios como nitritos y óxidos de nitrógeno (Winkler y col., 2011).

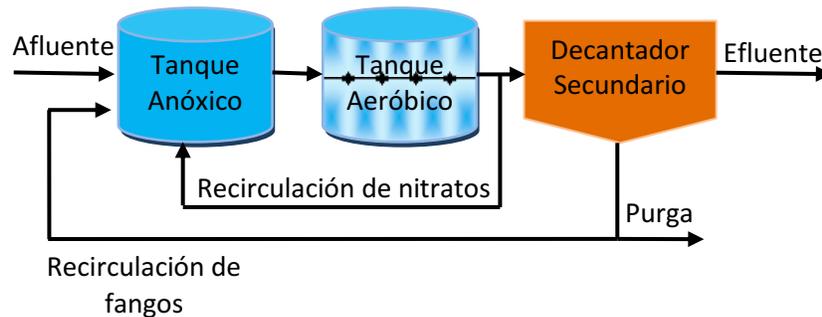


Figura 1.5. Configuración Ludzack-Ettinger modificada (Metcalf y Eddy, 1995)

1.4.1.3.2. Configuración Wuhrmann: Sistema aeróbico/anóxico (AE/AN)

Este proceso, conocido como sistema de post-desnitrificación, es también muy utilizado. El sistema se caracteriza porque el tanque aeróbico se encuentra situado al inicio del proceso realizándose allí la nitrificación y consumo de la fuente de carbono orgánica, luego se encuentra el tanque anóxico donde se realiza la desnitrificación, siendo necesario la adición de una fuente de carbono exógena (Figura 1.6).

Si bien estos sistemas con post-desnitrificación anóxica convencional elimina la necesidad de recirculación del licor de mezcla, hay costos operacionales adicionales que están asociados a la adición de carbono exógeno como metanol o acetato (Tchobanoglous y col., 2003). No obstante, la desnitrificación en este sistema también puede ser impulsada a partir de reservas de carbono como polihidroxialcanoatos (PHAs) y glucógeno (Coats y col., 2011). Otra desventaja del sistema de post-desnitrificación está dada por las condiciones microaerófilas generadas a partir de la transferencia de oxígeno mediante la mezcla en el reactor anóxico, lo cual puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la tasa de desnitrificación, que finalmente desencadena en la producción de óxidos de nitrógeno por desnitrificación incompleta (Plósz y col., 2003).

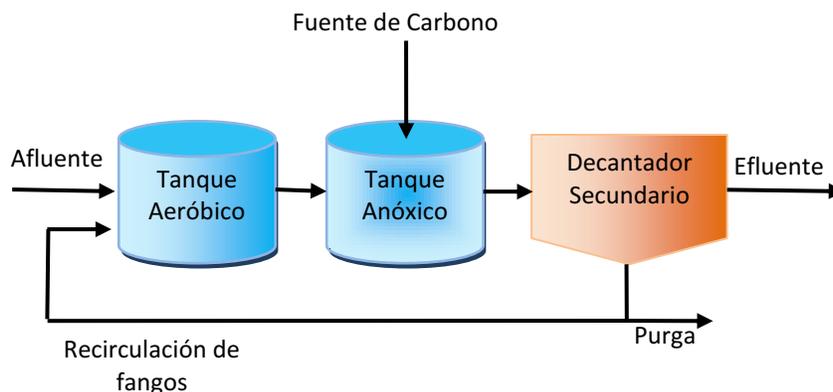


Figura 1.6. Configuración Wuhrmann (Metcalf y Eddy, 1995)

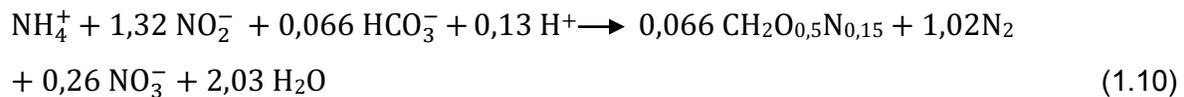
1.4.2. Nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS)

La nitrificación y la desnitrificación simultánea (NDS) es una variante del proceso convencional de nitrificación y desnitrificación previamente descrito. El proceso NDS se caracteriza por llevarse a cabo en un único reactor, en el cual ocurre de manera simultánea la eliminación biológica de nitrógeno amoniacal y nitrito (Keller y col., 1997; Helmer y Kunst, 1998; Zeng y col., 2003). El proceso NDS se basa en los gradientes de concentración de oxígeno disuelto (OD) dentro de los flóculos. Las bacterias autótrofas nitrificantes se distribuyen sobre la periferia del flóculo, donde las concentraciones de oxígeno se encuentran por encima de $2 \text{ mg O}_2/\text{L}$, mientras que las bacterias desnitrificantes se ubican en el interior del flóculo, donde la concentración de oxígeno es muy baja o nula (Robertson y Kuenen, 1984; Hibiya y col., 2003; Zhu y col., 2008). Para que ocurra este proceso es de gran importancia que los flóculos sean de tamaño mayor a $125 \text{ }\mu\text{m}$, generando un gradiente de oxígeno con condiciones anóxicas en el centro del flóculo (Li y Ganczarczyk, 1990, 1993; Pochana y Keller, 1999). Cabe destacar que a bajas concentraciones de O_2 , en el orden de los $0,4 \text{ mg O}_2/\text{L}$, el N_2O puede ser el producto final de la desnitrificación en lugar de N_2 (Tallec y col., 2008). Además, es importante que el sistema no acumule nitrito por encima de 1 mg/L ya que se ha informado que estos niveles desencadenan la producción de N_2O , e incluso a mayores niveles de nitrito se podría inhibir el proceso de desnitrificación (Zeng y col., 2003).

1.4.3. Proceso Anammox (oxidación anaeróbica de amonio)

Es un proceso biológico no convencional que forma parte del ciclo del nitrógeno. En este proceso, ciertos microorganismos bajo condiciones anóxicas convierten el amonio

en nitrógeno gaseoso, empleando el nitrito como aceptor de electrones. La presencia de nitrito resulta imprescindible debido a que los organismos ANAMMOX presentan gran afinidad para emplearlo como aceptor de electrones. Caso contrario ocurre con el nitrato, el cual no puede ser empleado por estos microorganismos (Van Loosdrecht y Salem, 2006). La reacción catabólica total es:



Las bacterias anaeróbicas oxidantes de amonio son autótrofas del Orden Brocadiales, perteneciente al Phylum Planctomycetes, y corresponden a los géneros *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia*, *Candidatus Jettenia*, *Candidatus Anammoxoglobus* y *Candidatus Scalindua*. Sin embargo, las más comunes son *Brocadia anammoxidans* y *Kuenenia stuttgartiensis* (Breisha y Winter, 2010).

El proceso Anammox por sí solo no puede ser utilizado debido a la necesidad de un efluente rico en amonio y nitrito, por lo tanto se hace necesario un sistema donde el amonio pueda ser pre-oxidado parcialmente a nitrito (55-60% del amonio) para posteriormente ser convertido a N₂ por el proceso Anammox (Ahn, 2006). El proceso de nitrificación parcial puede ser de tipo Sharon (single reactor system for high-rate ammonium removal over nitrite), que utiliza un solo reactor para la nitrificación parcial y proceso Anammox con aireación intermitente, o tipo Canon (completely autotrophic nitrogen removal over nitrite), donde el proceso se realiza en dos reactores en serie donde inicialmente se realiza la nitrificación parcial del efluente el cual finalmente es alimentado en un segundo reactor donde se realiza el proceso Anammox. Tanto el sistema Sharon como el Canon requieren condiciones de operación que favorezcan el crecimiento de bacterias oxidantes de amonio. (Third, 2003; EPA, 2010). El proceso de eliminación de nitrógeno vía nitrito utiliza altas concentraciones de amonio y bajas concentraciones de oxígeno disuelto (< 0,4 mg/l o 5% de saturación de aire) para prevenir el crecimiento de bacterias oxidantes de nitrito (Schmidt y col., 2003). En el proceso de nitrificación se reduce el consumo de oxígeno en un 25% al ser vía nitrito y se reduce en un 40% la cantidad de carbono orgánico necesario para la desnitrificación, en comparación con la nitrificación y desnitrificación tradicional (EPA, 2010). Sin embargo, este sistema presenta grandes problemas como la producción de óxido nitroso (N₂O) debido a la limitación de O₂

(Kampschreur y col., 2009). Cabe destacar que las mayores emisiones de N_2O se han informado a 0,4 mg O_2/L y además se observaron velocidades de desnitrificación más bajas por encima de dicha concentración (Tallec y col., 2008).

1.4.4. Desnitrificación aeróbica (DNA)

La desnitrificación aeróbica (DNA) es un proceso alternativo a la desnitrificación tradicional, mediante el cual puede lograrse la desnitrificación completa en presencia de altas concentraciones de oxígeno disuelto. Ofreciendo una buena alternativa para disminuir las emisiones de óxidos de nitrógeno (Takaya y col., 2003).

Las bacterias con capacidad de desnitrificar de forma aeróbica pertenecen a diferentes especies: *Citrobacter diversus* (Huang y Tseng, 2001), *Alcaligenes faecalis* (Joo y col., 2005), *Pseudomonas aeruginosa* (Liang y col., 2011), *Microvirgula aerodenitrificans* (Patureau y col., 1998), *Paracoccus denitrificans* (Liang y col., 2011), *Bacillus licheniformis* (Takenaka y col., 2007).

Las enzimas encargadas del proceso de desnitrificación se han encontrado presentes tanto en desnitrificación aeróbica como en la desnitrificación tradicional (Stouthamer, 1992; Vollack y col., 1998; Ji y col., 2015), debido a esto se cree que la diferencia entre ambos procesos se encuentra en los diferentes mecanismos de regulación a nivel genético y enzimático de las bacterias y no a la sensibilidad de sus enzimas al oxígeno (Zumft, 1997).

1.4.5. Reactor de cargas secuenciales (Sequential Batch Reactor, SBR)

El reactor de cargas secuenciales (SBR) es una de las principales tecnologías en el tratamiento biológico de efluentes con cultivos en suspensión que se ha utilizado satisfactoriamente en agua residual urbana (Lee y col., 2004; Puig y col., 2005) como en aguas de desechos industriales (Vives y col., 2003; Cassidy y Belia, 2005).

El funcionamiento de los SBRs se basa en la secuencia de ciclos de llenado y vaciado. Los procesos unitarios que intervienen son idénticos a los de un proceso convencional de lodos activados. En ambos sistemas intervienen la aireación y la sedimentación-clarificación. No obstante, en las plantas convencionales, los procesos se llevan a cabo simultáneamente en tanques separados, mientras que en los SBRs los procesos tienen lugar secuencialmente en el mismo tanque (Metcalf y Eddy, 1995).

Todos los sistemas SBR tienen en común 5 etapas, que tienen lugar de forma secuencial. En la figura 1.7 se puede ver detallado el modo de operación: (1) Llenado: el objetivo de esta fase es la adición de sustrato (afluente, agua residual bruta o efluente primario); (2) Reacción: durante esta fase se completan las reacciones iniciadas durante la fase de llenado, tiene lugar bajo condiciones de agitación pudiendo ser anaeróbica, anóxica o aeróbica; (3) Sedimentación: el objetivo de esta fase es permitir la separación de los lodos para conseguir un sobrenadante clarificado como efluente secundario; (4) Extracción: en esta fase se realiza la extracción del efluente clarificado; (5) Fase inactiva: en esta fase se puede realizar la purga de lodos activados, aunque puede llevarse a cabo durante cualquier fase dependiendo del modo de operación.

Por su configuración y características los SBR presenta las siguientes ventajas y beneficios:

- Diseño simple y compacto debido a la ausencia de un clarificador separado (Cervantes, 2009).
- Ahorro potencial de costos de capital mediante la eliminación de clarificadores y otros equipos como los utilizados en los procesos de desnitrificación. Al requerir un solo reactor lo hace ideal para industrias que no dispongan de espacio suficiente (EPA, 1999).
- Las cargas hidráulicas elevadas no producen arrastre de los sólidos del licor de mezcla (Metcalf y Eddy, 1995).

- Flexibilidad, versatilidad y control de operación. Alta capacidad de adaptación y tolerancia a variaciones de la carga orgánica (EPA, 1999).
- Posibilidad de ajustar secuencias de condiciones anaeróbicas, anóxicas y aeróbicas lo que lo hacen ideal en la eliminación biológica de nutrientes (Cuil y col, 2009).
- Sistema automatizado que puede controlar y ajustar con facilidad la aireación a lo largo del ciclo, cargas del efluente, periodos de reacción y decantación. Gran capacidad para manejar variaciones de carga del efluente diurnas, nocturnas y estacionales (Freitas y col, 2009).

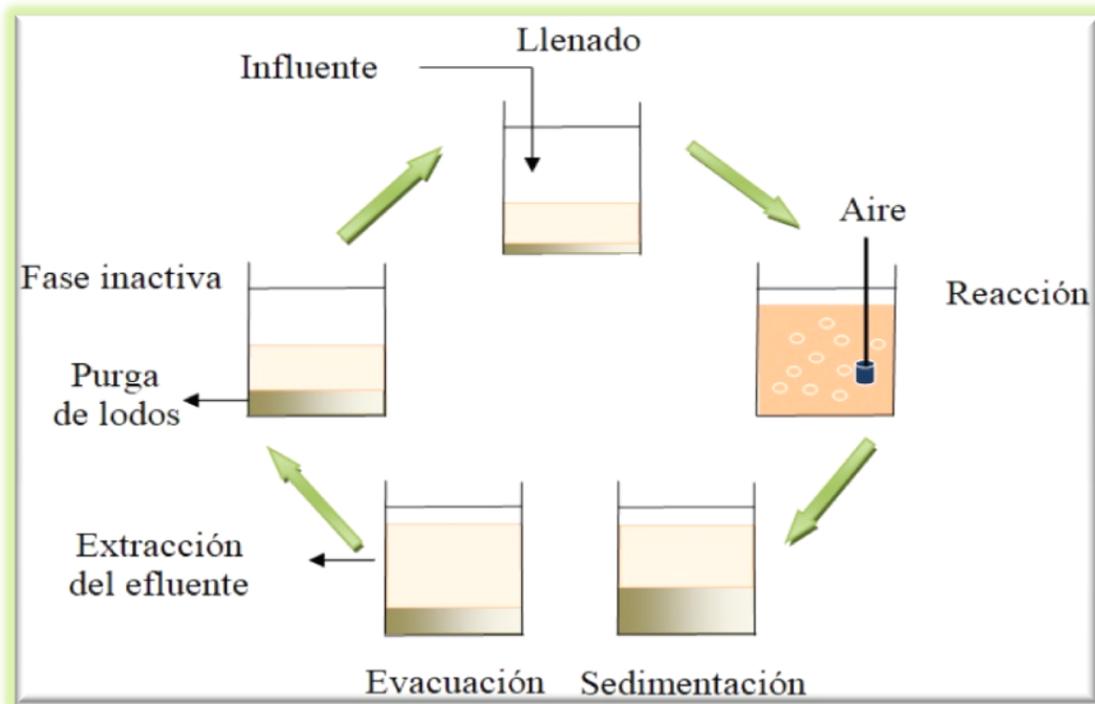


Figura 1.7. Esquema de un reactor de cargas secuenciales (SBR) con fase de reacción aeróbica

Considerando que la purga de lodos puede realizarse durante la etapa de reacción, el proceso puede ser simplificado. La operación cíclica de un SBR puede definirse con cuatro etapas (Schmidell y col., 2007):

$$TC = TF + TR + TS + TW \quad (1.11)$$

Donde: TC = tiempo total del ciclo
 TF = tiempo de llenado
 TR = tiempo de reacción
 TS = tiempo de sedimentación
 TW = tiempo de extracción del efluente

En la figura 1.8 se encuentra esquematizado un ciclo de operación de un SBR con eliminación de nitrógeno. El ciclo está conformado por las siguientes fases: llenado del agua residual, fase de reacción, que comprende una etapa aeróbica y una etapa anóxica, y finalmente las fases de sedimentación y vaciado. En la primera etapa de la fase de reacción ocurre el proceso de nitrificación; en la fase anóxica es necesario disponer de una fuente de carbono para poder llevar a cabo el proceso de desnitrificación (Metcalf y Eddy, 1995).

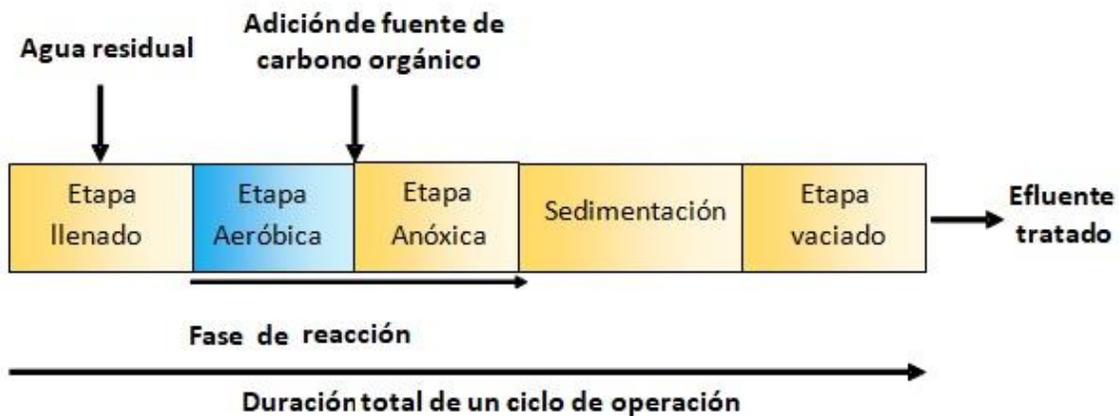


Figura 1.8. Ciclo de operación de un reactor de cargas secuenciales (SBR) con eliminación de N-amoniaco. Modificado de (Metcalf y Eddy, 1995)

1.4.5.1. Reactor de cargas secuenciales basado en nitrificación y desnitrificación a partir de reservas de carbono intracelular

El carbono orgánico requerido para la desnitrificación es el elemento crítico en los procesos convencionales de remoción de nitrógeno (Li y col., 2014). Por lo tanto, resulta

necesario lograr un proceso de remoción de nitrógeno a partir del máximo aprovechamiento de la fuente de carbono orgánico presente en las aguas residuales.

El proceso anaeróbico/aeróbico (ANA/AE) puede enriquecer dos tipos de organismos:

a- Organismos acumuladores de polifosfato (PAOs): Los PAOs bajo condiciones anaeróbicas convierten sustratos orgánicos (generalmente ácidos grasos volátiles, AGV, como acetato y propionato) en polihidroxialcanoatos (PHAs). Para esto, dichos microorganismos utilizan reservas intracelulares de polifosfato (poli-P) y glucógeno, las cuales se encuentran en forma de gránulos, como fuente de energía y poder reductor respectivamente, liberando fósforo soluble al medio externo (Mino y col., 1998). En la etapa aeróbica, el PHA se utiliza tanto para el mantenimiento y crecimiento celular como para la reposición de glucógeno y poli-P, disminuyendo el fósforo soluble del medio (Oehmen y col., 2007). Los PAOs son responsables del proceso de remoción biológica incrementada de fósforo (EBPR, enhanced biological phosphorus removal). Dentro de este grupo de microorganismos, los PAOs desnitrificantes (DPAOs) tienen la capacidad de desnitrificar usando PHA intracelular (Carvalho y col., 2007). Dependiendo del sustrato oxidado y la ruta metabólica involucrada se pueden sintetizar diferentes tipos de PHAs como poli-hidroxivalerato (PHV) y poli-hidroxibutirato (PHB).

b- Organismos acumuladores de glucógeno (GAOs): Los GAOs también almacenan AGV en forma de PHA bajo condiciones anaerobias, utilizando el glucógeno como fuente de energía en lugar de poli-P (Muszyński y col., 2013). En la fase aeróbica, los GAOs utilizan el PHA almacenado previamente para la reposición del glucógeno, el crecimiento de la biomasa y cubrir los requisitos de mantenimiento (Zeng y col., 2003; Oehmen y col., 2007). Los GAOs desnitrificantes (DGAOs) tienen la capacidad de utilizar el PHA intracelular para desnitrificar (Zeng y col., 2004). Los GAOs pueden presentar morfología tipo coco, los cuales se disponen en tétradas, siendo conocidos como organismos formadores de tétradas (TFO, tetrad-forming organism) y frecuentemente asociados con el deterioro del proceso EBPR (Oehmen y col., 2007; Muszyński y col., 2013).

Desde hace aproximadamente dos décadas se han comenzado a desarrollar y proponer diferentes variantes de los sistemas convencionales de remoción biológica de nitrógeno con el propósito de reducir costos y mejorar la eficiencia de los mismos.

Li y col. (2014) han propuesto un sistema de remoción de carbono y nitrógeno modificando el proceso ANA/AE descrito anteriormente, dado que la actividad desnitrificante por DPAOs y DGAOs ocurre comúnmente bajo condiciones anóxicas. Estos autores utilizaron un sistema SBR anaeróbico/aeróbico/anóxico (ANA/AE/AN), el cual logró una eficiente remoción de nitrógeno por nitrificación en la etapa aeróbica y desnitrificación a partir de las reservas de carbono y energía intracelular (PHA y glucógeno) en la etapa anóxica atribuida a los microorganismos DGAOs. Cabe destacar que la selección de bacterias con capacidad de desnitrificación bajo condiciones aeróbicas permitiría implementar las configuraciones más simples, tales como los procesos anaeróbico/aeróbico (ANA/AE) y anóxico/aeróbico (AN/AE).

1.4.6. Emisión de N₂O en plantas de tratamiento con remoción biológica de nitrógeno

El óxido nitroso (N₂O) y el dióxido de carbono (CO₂) son gases de efecto invernadero que pueden producirse durante el tratamiento de aguas residuales. Dentro de los sistemas de tratamiento biológico de efluentes, los procesos de remoción de nitrógeno son los principales responsables de la emisión de N₂O. Como se ha presentado previamente, los procesos convencionales de remoción biológica de nitrógeno (Sección 1.4.1.3), el proceso NDS (Sección 1.4.2) así como el proceso Anammox acoplado a un proceso de nitrificación parcial (Sección 1.4.3) favorecen comúnmente la producción de N₂O.

El óxido nitroso es producido bajo condiciones nitrificantes (aeróbicas) y desnitrificantes (anóxicas) (Wunderlin y col., 2011). En general, se ha propuesto que la desnitrificación realizada por bacterias nitrificantes oxidantes de amonio, conocida como desnitrificación nitrificante, es la principal vía de producción de N₂O en el tratamiento biológico de aguas residuales bajo condiciones aeróbicas (Colliver y Stephenson, 2000)

(Wunderlin y col., 2011). En este proceso se reduce el nitrito utilizando el amoníaco, hidrogeno o piruvato como donadores de electrones bajo condiciones limitantes de oxigeno o concentraciones elevadas de nitrito (Wrage y col., 2001; Colliver y Stephenson, 2000; Stüven y col., 1992).

Existe una creciente necesidad de reducir e identificar los factores que controlan las emisiones de gases de efecto invernadero de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Las emisiones de CO₂ no se consideran que contribuyan al efecto invernadero debido a que se produce directamente por conversión de materia orgánica de manera biológica por lo tanto se considera que forma parte del ciclo corto (no proveniente de combustibles fósiles) (Kampschreur y col., 2009). El N₂O es un gas de efecto invernadero muy importante y también contribuye a la disminución del ozono en la estratosfera (Yan y col., 2015). Este gas tiene un efecto 300 veces más fuerte que el dióxido de carbono, por ello se pretende evitar la producción inclusive en mínimas concentraciones. Las emisiones de N₂O se asocian a varios procesos en plantas de tratamiento de aguas residuales y los flujos de emisión depende del tipo de proceso y los parámetros de funcionamiento de las plantas así como de sus condiciones ambientales (Takaya y col., 2003; Gabarró y col., 2014). De acuerdo a Kampscheur y col. (2009) los parámetros operativos más importantes que conducen a la emisión de N₂O son:

- Baja concentración de oxígeno disuelto en la etapa de nitrificación y condiciones microaerófilas en el proceso de desnitrificación.
- El aumento de las concentraciones de nitritos en ambas etapas de nitrificación y desnitrificación.
- Baja relación DQO/N en la etapa de desnitrificación.

1.5. Objetivos

Los procesos tradicionales de remoción de nitrógeno (AN/AE, AE/AN y NDS) presentan desventajas importantes entre las cuales cabe destacar: altos costos implicados en la recirculación de licor de mezcla, limitaciones de la fuente de carbono

exógena, inhibición de los procesos de desnitrificación y producción de óxidos de nitrógeno como se ha explicado previamente. Por tal motivo en la presente tesis se propone desarrollar un sistema de remoción biológica de nitrógeno utilizando un reactor biológico secuencial SBR, a escala laboratorio, bajo condiciones anóxica/aeróbica (AN/AE) favoreciendo la síntesis y acumulación de reservas de carbono intracelulares durante la fase anóxica así como el desarrollo de bacterias desnitrificantes aeróbicas, las cuales pueden ser potencialmente capaces de utilizar dichas reservas en el proceso de desnitrificación durante la etapa aeróbica final. Asimismo, el sistema AN/AE propuesto minimizaría la acumulación de nitrito así como la ocurrencia del proceso de desnitrificación anóxica convencional, los cuales son fenómenos bien conocidos que favorecen fuertemente la generación de gases de invernadero.

1.5.1. Objetivo general de la Tesis

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la factibilidad de lograr un proceso de remoción biológica de nitrógeno (RBN) por lodos activados mediante nitrificación seguido de desnitrificación aeróbica. Para ello se diseñó un reactor tipo SBR que fue operado bajo un régimen anóxico/aeróbico (AN/AE) y alimentado con un efluente sintético basado en acetato, sales inorgánicas de nitrógeno y fósforo y micronutrientes.

1.5.2. Objetivos específicos

Se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Diseño y puesta en marcha de un reactor de cargas secuenciales (SBR).
- Evaluar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto, pH, la duración del ciclo y la relación temporal AN/AE sobre el proceso de nitrificación y desnitrificación.
- Determinar las fuentes de carbono intracelular que intervienen en el proceso de desnitrificación.

- Evaluar el efecto de la relación carbono/nitrógeno (DQO/N) sobre el proceso de nitrificación y desnitrificación.
- Determinar las condiciones operacionales más adecuadas para lograr un proceso de remoción biológica de nitrógeno con desnitrificación aeróbica.
- Modelar la transferencia de oxígeno en los flóculos microbianos.

1.6. Estructura de la tesis

A continuación se detallan los contenidos principales de los diferentes Capítulos que fueron desarrollados para cumplir con los objetivos propuestos.

En el Capítulo 2 se exponen los Materiales y Métodos utilizados en la realización del presente trabajo de Tesis.

En el Capítulo 3 se realiza la puesta en marcha del reactor de cargas secuenciales (SBR) y la selección de bacterias nitrificantes a partir de un cultivo mixto proveniente de un reactor semicontinuo alimentado con suero de queso. Se analizaron experimentos con baja concentración de oxígeno y con baja y alta concentración de fuente de carbono.

En el Capítulo 4 se trabaja a partir de las bacterias nitrificantes que dieron mejores resultados en los ensayos anteriores. En este capítulo se buscan alternativas para promover el proceso de desnitrificación aeróbica para lo cual se trabajó con mayores concentraciones de oxígeno y 3 niveles de fuente de carbono, además se planteó un modelo matemático difusivo para analizar los perfiles de concentración de oxígeno disuelto para la etapa aeróbica del proceso.

En el Capítulo 5 se exponen las conclusiones finales de la tesis.

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA

2.1. Reactor de cargas secuenciales y condiciones de operación

En el presente trabajo de tesis se empleó un bioreactor de cargas secuenciales (SBR, Sequencing Batch Reactor) que fue operado durante 24 meses. El reactor consiste de un recipiente cilíndrico de polimetilmetacrilato (PMMC) de 2,0 litros (volumen de trabajo= 1,2 litros) el cual contiene 7 entradas/salidas para mangueras, las cuales fueron utilizadas para la adición del medio de cultivo (agua residual sintética), dosificación de ácido y base, purga del sistema, toma de muestras, suministro de aire y una salida de seguridad de vaciado en caso de una posible falla del sistema de control de llenado. Se diseñó un sistema de seguridad eléctrico, para el caso eventual de una ruptura del reactor y/o desborde del líquido, con corte de la alimentación eléctrica del SBR.

El reactor se operó con sucesivos ciclos que comprenden las siguientes fases:

- a) Llenado con el medio de cultivo,
- b) Reacción con etapas anóxica y aeróbica,
- c) Sedimentación de la biomasa y purga final del sobrenadante.

Durante la fase anóxica, el contenido del reactor se mezcló con un agitador vertical (TWT-06SGN, Tung Way Team Electrical Industry CO., LTD., Taiwán) a velocidad constante de 100 rpm. En la fase aeróbica se suministró aire mediante aireadores y la velocidad de agitación se controló automáticamente entre 100-160 rpm a fin de mantener la concentración de oxígeno deseada. Al final de la fase de reacción se realizaba la purga del licor de mezcla para mantener el tiempo de residencia celular (TRC) deseado. La alimentación del sistema se realizaba al inicio de la fase anóxica. El reactor, el sistema de control y el software fueron desarrollados por el Laboratorio de Electrónica del CIDCA (Figura 2.1).



Figura 2.1. Reactor de cargas secuenciales (SBR)

2.1.1. Sistema de control automático del SBR

El reactor cuenta con un módulo de control automático encargado de mantener constante la temperatura, pH, el oxígeno disuelto (OD) y la duración de las diferentes fases de operación, así como de regular la velocidad de agitación, llenado, vaciado y purga del reactor. Un esquema del funcionamiento del SBR se presenta en la Figura 2.2.

2.1.1.1. Control de niveles

El SBR cuenta con 3 sensores de nivel que actúan por conductividad eléctrica, que pueden regularse a diferentes alturas del bioreactor permitiendo establecer los volúmenes deseados de llenado y de purga del sobrenadante. El Sensor 1 determinaba el volumen de llenado con medio de cultivo. El Sensor 2 determinaba el volumen de purga del

sobrenadante del sistema, la cual se realizaba mediante la manguera de vaciado luego de la etapa de sedimentación. La manguera de vaciado se encontraba ubicada 2-3 cm por encima de la interfase sobrenadante-lodos a fin de evitar la descarga de los lodos sedimentados en el fondo del reactor. El Sensor 3 completaba el circuito de conductividad y se ubicaba aproximadamente a 2-3 cm del fondo del reactor (Figura 2.3).

Los procesos de llenado del reactor así como la purga del licor mixto y del sobrenadante se realizaban mediante bombas peristálticas. El momento de activación de las bombas peristálticas para el inicio de dichos procesos se establecía al inicio de la puesta en marcha del SBR. La desactivación de las bombas para los procesos de llenado y purga del sobrenadante dependía de las señales eléctricas/conductividad de los sensores 1 y 2 respectivamente. El corte de la función del llenado se activaba cuando el volumen del reactor alcanzaba el nivel 1 (N1). El corte del proceso de vaciado del sobrenadante se producía cuando el volumen del reactor alcanzaba el nivel 2 (N2) (Figura 2.3). Para el caso de la purga del licor de mezcla se establecía, al inicio de la operación del SBR, el caudal de la bomba peristáltica así como su tiempo de operación con el propósito de obtener el volumen de purga necesario para lograr el TRC deseado. Es decir el corte de la descarga del licor de mezcla no dependía del sistema de control de niveles.

2.1.1.2. Control de temperatura y pH

Durante la operación del reactor se mantuvo la temperatura a $25 \pm 0,5$ °C. El pH fue medido de manera continua durante la operación del reactor con un electrodo de pH (Phoenix, Houston, TX, USA) y fue controlado durante las fases de reacción (fases anóxica y aeróbica). El control de pH se realizó de manera automática por medio de bombas peristálticas mediante la dosificación de soluciones de hidróxido de sodio y ácido sulfúrico con concentraciones 1 M y 0,5 M respectivamente (Figura 2.2). El electrodo de pH se calibraba periódicamente utilizando soluciones comerciales (pH= 4,01; 7,01 y 9,21). Además se evaluaba regularmente el funcionamiento del electrodo de pH y del sistema de control mediante medidas externas del licor mixto utilizándose un electrodo de pH con sensor de temperatura integrado (Hach Company, Loveland, CO) acoplado a un medidor de pH (Modelo sensION PH3, Hach Company, Loveland, CO).

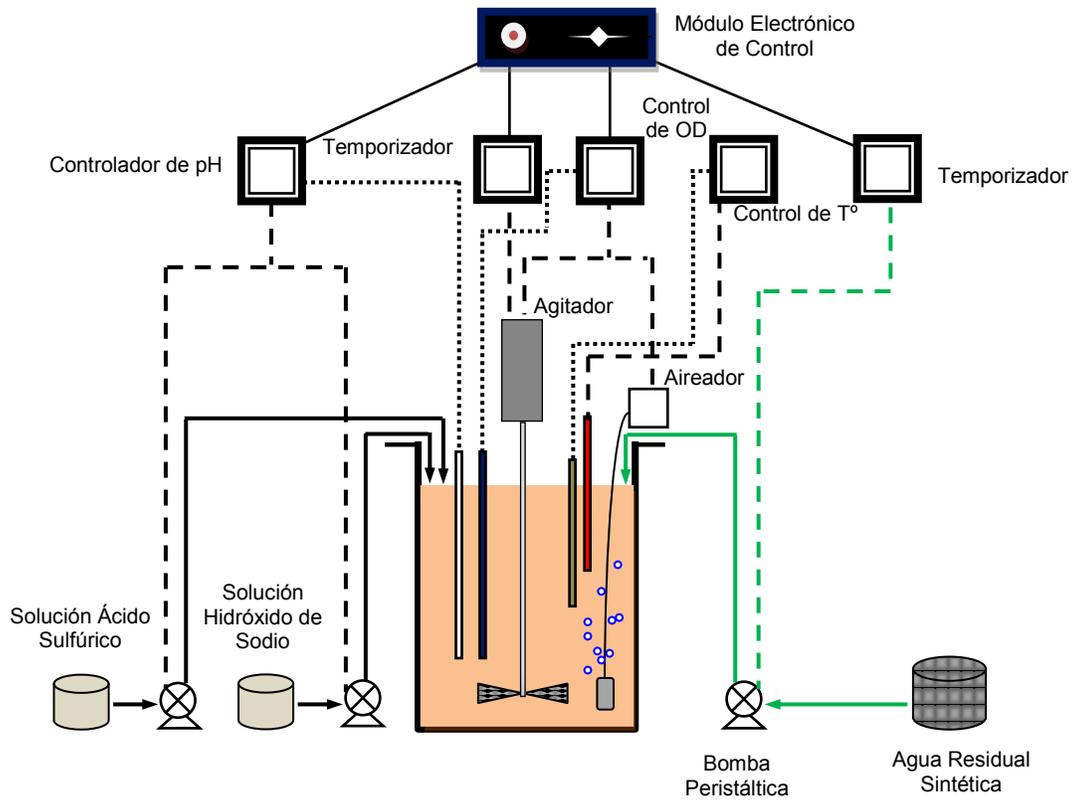


Figura 2.2. Esquema del reactor de cargas secuenciales (SBR)

2.1.1.3. Control de oxígeno

El aire se introducía de forma intermitente a través de difusores porosos situados en el fondo del reactor durante la fase de aireación. La concentración de oxígeno disuelto (OD) se medía mediante un electrodo (Ingold Mettler Toledo, Bedford, MA, USA) y se registraba como porcentaje del nivel de saturación de oxígeno (NSO) por el sistema de control. Dicho sistema permitía regular la velocidad de agitación entre 100-160 rpm a fin de mantener la concentración de OD deseada. Periódicamente se realizaba la calibración del electrodo utilizando un vaso de precipitado conteniendo agua destilada saturada en oxígeno (100%) a la temperatura de operación del reactor (25°C).

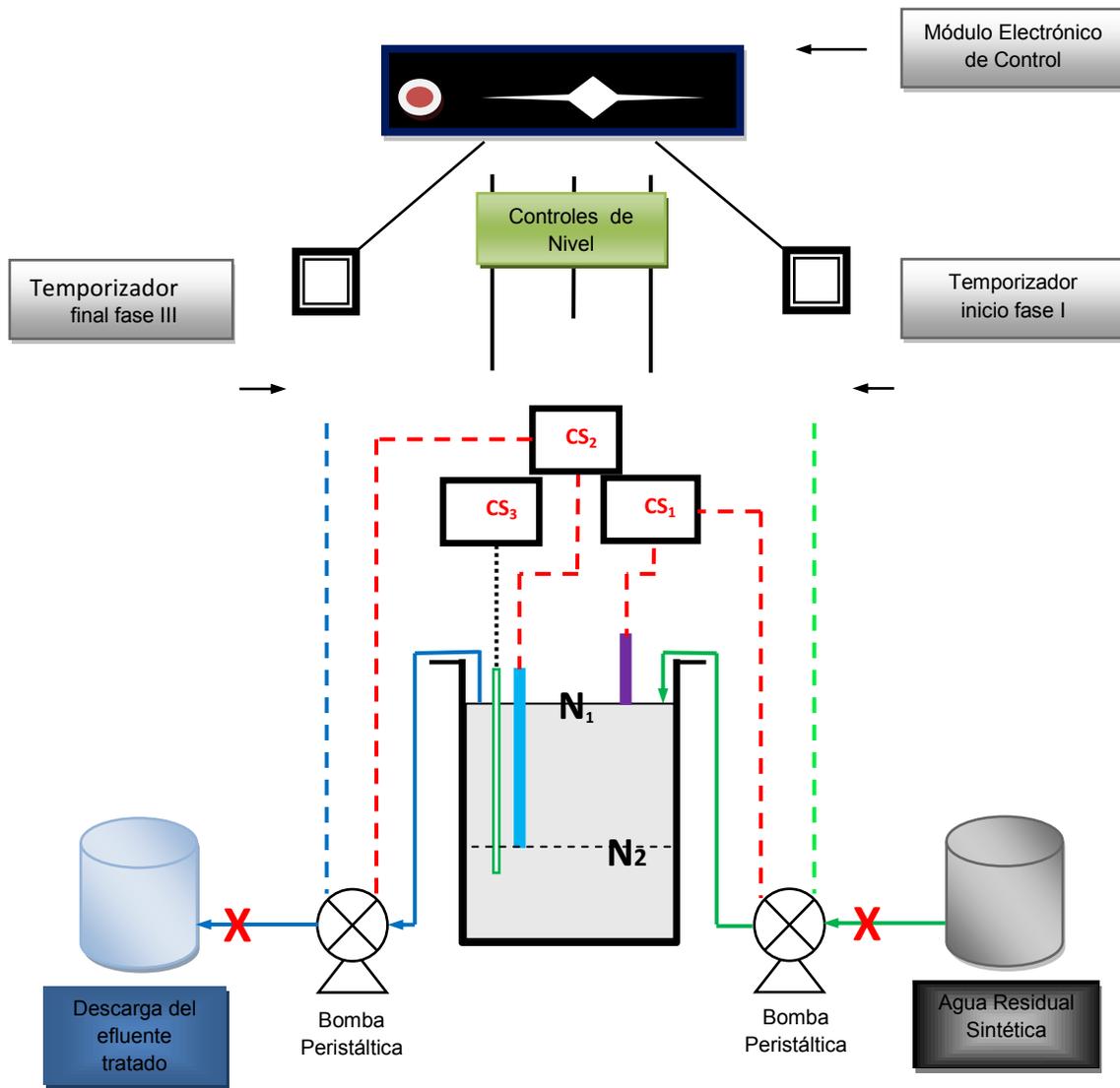


Figura 2.3. Esquema de funcionamientos de controles de nivel para carga y descarga del SBR. CS₁ control sensor 1, CS₂ control sensor 2, CS₃ control sensor 3.

- - - Inicio de llenado, — Línea de llenado, - - - Inicio de vaciado,
— Línea de vaciado, - - - Líneas de corte

2.1.2. Inoculación del reactor

El reactor se inoculó con lodos activados obtenidos de un reactor biológico aerobio semicontinuo a escala laboratorio del CIDCA, el cual estaba alimentado con agua residual modelo de la industria láctea, conteniendo suero de queso como fuente de carbono. Por lo tanto, el sistema biológico fue inicialmente aclimatado a la fuente de carbono utilizada en el presente trabajo de tesis (acetato de sodio) durante 6 tiempos de residencia celular (TRC).

2.2 Agua residual sintética

Se utilizó agua residual sintética compuesta por acetato de sodio (CH_3COONa) como fuente de carbono y energía, sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) como fuente de nitrógeno y sales de fosfatos (KH_2PO_4 y K_2HPO_4). Se añadió 1 ml de solución de micronutrientes (Lobo y col., 2013) por 1 L de agua residual sintética. Se utilizaron tres modelos de aguas residuales. La solución de elementos traza presentó la siguiente composición (g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,75, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,15, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5, H_3BO_3 0,15, KI 0,1.

2.3. Determinación del tiempo de residencia celular (TRC) y tiempo de residencia hidráulico (TRH)

Tiempo de residencia celular (TRC): Se define como el tiempo promedio que las partículas de biomasa permanecen en el reactor antes de ser desechadas (Orozco, 2005).

EL tiempo de residencia celular (TRC, días) se calculó mediante según la siguiente ecuación:

$$\text{TRC} = \frac{V_r * X}{Pl * X} \quad (2.1)$$

Donde:

V_r : Es el volumen de trabajo del reactor (L)

Pl : Purga de lodos (L/día)

X : Concentración de biomasa (g DQOb/L)

Tiempo de residencia hidráulico (TRH): Es el tiempo promedio que un volumen elemental de agua residual permanece en un tanque, desde la entrada hasta la salida. El TRH en el reactor es de gran importancia pues define el tiempo promedio durante el cual el sustrato orgánico está sometido a tratamiento (Orozco, 2005).

EL tiempo de residencia hidráulico (TRH, días) se calculó mediante la siguiente ecuación

$$TRH = \frac{V_r}{Pl + Ps} \quad (2.2)$$

Donde:

Vr: Es el volumen de trabajo del reactor (L)

Pl: Purga de lodos (L/día)

Ps: Purga del sobrenadante luego de la etapa de sedimentación (L/día)

2.4. Métodos analíticos

El funcionamiento del SBR se monitoreó mediante los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de los ciclos: potencial de óxido-reducción (ORP, mV), ortofosfato (PO_4^{3-} -P, mg/L), amonio (NH_3 -N, mgN/L), nitrito (NO_2^- -N, mgN/L), nitrato (NO_3^- -N, mgN/L), sustrato orgánico como demanda química de oxígeno (DQO) soluble (DQO_S , mg/L) y concentración de biomasa determinada como DQO (DQO_B , mg/L). DQO_B correspondió a la diferencia entre DQO total (DQO_T) y DQO_S . La presencia de gránulos de PHA y polifosfato intracelulares se detectó mediante tinción específica y observación microscópica.

2.4.1. Potencial de oxidación-reducción

El potencial de oxidación-reducción (ORP, oxidation–reduction potential) o potencial Redox es la tendencia de una solución a ganar o perder electrones, correspondiendo a una medida del estado de oxidación en un sistema acuoso que refleja la concentración de OD, el sustrato orgánico, la actividad de los organismos y algunos compuestos tóxicos en el sistema, siendo la concentración de OD, el factor más importante (Cui y col., 2009). El ORP a lo largo del ciclo del SBR se midió mediante un sensor externo de ORP (Phoenix, Houston, TX, EE.UU.) acoplado a un medidor de pH/ORP (Modelo sensION PH3, Hach Company, Loveland, CO) (Figura 2.4).



Figura 2.5. Termoreactor HACH

El presente trabajo de tesis, las determinaciones de DQO se realizaron empleando un kit comercial (Método Hach N° 8000). El método utilizado fue el de digestión orgánica con un rango de medida de 20 a 1500 mg/L DQO (Desviación estándar= 18 mg/L). El procedimiento consistió en la adición de 2 ml de la muestra en tubos de vidrio conteniendo la mezcla de reacción comercial (dicromato de potasio, ácido sulfúrico, sulfato de plata y sulfato de mercurio). Se utilizó un termoreactor HACH (Figura 2.5) para el tratamiento térmico de las muestras a 150 °C a reflujo cerrado durante dos horas. Posteriormente, los tubos conteniendo las muestras se dejaron enfriar y se determinó la absorbancia a 620 nm con un espectrofotómetro HACH, modelo DR 2800 (Figura 2.6). Mediante una curva de calibración incorporada en el equipo, las lecturas de absorbancia fueron convertidas a valores de DQO. El valor de DQO total (DQO_T) del sistema se determinó utilizando directamente las muestras del licor mixto de lodos activados obtenidas del reactor biológico.

El sustrato orgánico se determinó como DQO soluble (DQO_S) utilizando las muestras de licor mixto previamente centrifugadas (13000 rpm, 10 minutos) utilizando una microcentrifuga (Eppendorf modelo 5415C, Figura 2.7) y filtradas mediante membranas de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm (GE Osmonics). En los casos requeridos se realizaron diluciones adecuadas de las muestras para que las lecturas de absorbancia entren en el rango de medición del método descrito.



Figura 2.6. Espectrofotómetro Hach DR 2800

2.4.3. Determinación de la concentración de biomasa como DQO y sólidos suspendidos volátiles

La concentración de biomasa de lodos activados en el SBR fue determinada como DQO empleando la técnica propuesta por Contreras y col. (2002). De acuerdo a éste método, la DQO correspondiente a la biomasa (DQO_B) se determina a partir de la diferencia entre DQO_T y DQO_S .

El valor de la demanda química de oxígeno de la biomasa incluye los aportes correspondientes a la biomasa viable, los sólidos particulados lentamente biodegradables, sustancias particuladas no biodegradables provenientes del agua de desecho a tratar y la materia orgánica particulada generada por la actividad metabólica microbiana en fase endógena (Orhon y Artan, 1994).



Figura 2.7. Microcentrifuga

La concentración de biomasa expresada como sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinó mediante el siguiente procedimiento:

- 1) Se utilizaron membranas de fibra de vidrio (Osmonics inc.) de 1,0 micrones y 47 mm de diámetro que fueron llevadas a mufla a 550 °C durante 10 min con el fin de eliminar la materia orgánica. Una vez enfriadas a temperatura ambiente se registraba su peso (m_o , g).
- 2) Un volumen de 35 ml (V_M , L) de muestra tomado directamente del reactor fue filtrado al vacío, utilizando las membranas previamente secadas y pesadas, con el fin de separar la biomasa del licor mixto.
- 3) Las membranas con la muestra fueron llevadas a estufa a 105 °C durante 24 horas con el objetivo de eliminar el agua remanente. Luego de este periodo, se registró el peso de las membranas (m_1 , g).
- 4) La concentración de biomasa como sólidos suspendidos totales (SST, g/L SST) fue calculado mediante la siguiente expresión:

$$SST = \frac{m_1 - m_0}{V_M} \quad (2.4)$$

- 5) Las membranas con la biomasa previamente pesadas fueron llevadas a la mufla a 550 °C durante 10 min, para volatilizar la fracción orgánica de la muestra, luego se dejaron enfriar y se pesaron (m_2 , g).
- 6) La concentración de biomasa como sólidos suspendidos volátiles (SSV, g/L SSV) fue calculada mediante la siguiente expresión:

$$SSV = \frac{m_1 - m_2}{V_M} \quad (2.5)$$

A partir de las medidas de DQO_B y SSV se obtuvo una relación lineal, surgiendo un factor de conversión (f_x) que representa la DQO aportada por unidad de SSV y que depende de los microorganismos y de la composición microbiana de los lodos activados. El factor f_x fue utilizado para estimar la concentración de SSV a partir de las medidas de DQO.

2.4.4. Cuantificación de compuestos inorgánicos solubles de fósforo y nitrógeno

Las concentraciones de ortofosfato y las diferentes formas de nitrógeno inorgánico (nitrógeno amoniacal, nitrito y nitrato) fueron determinadas, a lo largo del ciclo del SBR, por espectrofotometría utilizando reactivos comerciales (Hach Company, Loveland, CO) y un espectrofotómetro Hach modelo DR 2800 (Figura 2.6).

Para ello, se tomaron muestras del reactor, las cuales fueron centrifugadas durante 10 min a 13000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415C, Figura 2.7). A continuación, se filtraba el sobrenadante con membranas filtrantes de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm (GE Osmonics). Las muestras filtradas fueron utilizadas para la determinación de los compuestos inorgánicos solubles mediante los métodos espectrofotométricos que se describen a continuación.

2.4.4.1. Cuantificación de ortofosfato (PO_4^{3-})

Las concentraciones de ortofosfato (PO_4^{3-} , mg/L) fueron determinadas mediante el método de molibdovanadato. El ortofosfato reacciona con el molibdato en medio ácido para producir un complejo de fosfato/molibdato, que en la presencia de vanadio forma el ácido molibdovanadato-fosfórico de color amarillo. La intensidad del color es proporcional a la concentración de fosfato. La lectura se realiza a una longitud de onda de 430 nm.

Para la determinación de ortofosfato se utilizaron las muestras del reactor que fueron previamente filtradas como se detalló en la Sección 2.4.4. Las muestras filtradas (25 mL) se trasvasaban a una cubeta para su determinación espectrofotométrica. En caso de ser necesario se realizaron las correspondientes diluciones, con agua destilada, de la muestra previamente filtrada con el propósito de que la lectura de la absorbancia entre en el rango de medición del método. Paralelamente se utilizó una cubeta conteniendo 25 mL de agua destilada como blanco de la muestra. A ambas cubetas se adicionaba 1 ml de molibdovanadato en medio ácido y se dejaba reaccionar durante 3 min. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se determinaba la concentración de ortofosfato (PO_4^{3-} , mg/L) de la muestra mediante el método Hach N° 8114 (Adaptado de Métodos Estándar) a una longitud de onda de 430 nm. Este método presenta un rango de medición comprendido entre 0,3 y 45,0 mg PO_4^{3-} /L con una desviación estándar de $\pm 0,09$ mg PO_4^{3-} /L. Finalmente se utilizó el factor de conversión de $\text{P}/\text{PO}_4^{3-} = 31 \text{ g P}/95 \text{ g PO}_4^{3-} = 0,326$ para expresar los resultados como mg PO_4^{3-} -P/L (fosforo como ortofosfato).

2.4.4.2. Cuantificación de nitrógeno inorgánico (N_i)

El nitrógeno inorgánico (N_i) correspondió a la suma de las concentraciones de nitrógeno amoniacal, nitrito y nitrato, las cuales fueron determinadas a partir de las muestras previamente filtradas como se detalló en la Sección 2.4.4.

2.4.4.2.1. Cuantificación de nitrógeno amoniacal (NH_3)

El nitrógeno amoniacal fue determinado por el método de Nessler. Este método está basado en la reacción del reactivo de Nessler que contiene una disolución alcalina de yodomercuriato potásico (K_2HgI_4). Dicho compuesto reacciona con el amoníaco formando un complejo de color amarillo. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de amoníaco (Pino, 1983).

El nitrógeno amoniacal fue medido por el método HACH N° 8038, a una longitud de onda de 425 nm, con un rango de medición comprendido entre 0,02 y 2,50 mg NH₃-N/L y desviación estándar de ± 0,015 mg NH₃-N/L. Para ello, se tomó la muestra previamente filtrada y se realizó una dilución adecuada colocándose la solución resultante en una cubeta de 25 mL. Paralelamente se utilizó una cubeta conteniendo 25 mL de agua destilada como blanco de la muestra. A continuación se adicionaba a cada cubeta: 1 ml de reactivo de Nessler (Hach Company, Loveland, CO), 3 gotas de estabilizador mineral para acomplejar la dureza en la muestra y 3 gotas de alcohol de polivinilo como agente dispersante que ayuda a la formación de color en la reacción. Se dejaba reaccionar durante 1 min. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se determinaba la concentración de nitrógeno amoniacal de la muestra como NH₃-N. La técnica fue verificada por determinación de nitrógeno amoniacal de diferentes diluciones obtenidas de una solución estándar de sulfato de amonio.

2.4.4.2.2. Cuantificación de nitrito (NO₂⁻)

La concentración de nitrito fue determinada por el método de sulfato ferroso. El sulfato ferroso en un medio ácido reduce el nitrito a óxido nitroso. Los iones ferrosos se combinan con el óxido nitroso para formar un complejo de color marrón verdoso el cual es proporcional a la concentración de nitrito.

Para determinar la concentración de nitrito se utilizó el Método HACH N° 8153. La longitud de onda de medición es 585 nm con un rango de medición de 2 a 150 mg NO₂⁻/L con una desviación estándar de 2,2 mg NO₂⁻/L. La muestra previamente filtrada, y diluida en caso de ser necesario, se trasvasaba a una cubeta con volumen de 25 mL. Inmediatamente se procedía al agregado de un sobre comercial de NitriVer 2 Nitrite (sulfato ferroso), se mezclaba y se dejaba reaccionar durante 10 min. El mismo procedimiento fue realizado para determinar el blanco de la muestra, utilizándose en este caso 25 mL de agua destilada. Finalmente se utilizó el factor de conversión de NO₂⁻/N= 46 g NO₂⁻/14 g N= 3,28 para expresar los valores de nitrógeno como nitrito (mg NO₂⁻-N/L).

2.4.4.2.3. Cuantificación de nitrato (NO_3^-)

El nitrato fue cuantificado por el método de la reducción por cadmio. De acuerdo a este método, la determinación de nitratos por absorción de luz visible se logra reduciendo los nitratos a nitritos por medio de cadmio. El ion nitrito reacciona en un medio ácido con ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio intermedia. Finalmente dicha sal se une al ácido gentísico formando una solución de color ámbar.

En el presente trabajo de tesis se utilizó el Método HACH N° 8039 para determinar la concentración de nitrato (mg/L NO_3^- -N). La longitud de onda de medición es de 500 nm con un rango de medida de 0,3 a 30,0 mg NO_3^- -N/L con una desviación estándar de 0,8 mg NO_3^- -N /L. La muestra previamente filtrada se colocaba en una cubeta (25 mL) para proceder al agregado del sobre de reactivo comercial NitrVer 5 Nitrate (cadmio, ácido gentísico, ácido sulfanílico, sulfato de magnesio), se mezclaba durante 1 min y se dejaba reaccionar durante 5 min. El mismo procedimiento se realizaba para determinar el blanco de la muestra utilizando agua destilada. La concentración de ion nitrato se obtenía sustrayendo la cantidad de ion nitrito, medido por el método descrito en la Sección previa, al valor total obtenido por este método.

2.5. Determinación de las cargas volumétricas de sustrato orgánico y de nitrógeno y fosforo inorgánicos

Carga volumétrica de sustrato orgánico ($\text{mg DQO}/(\text{L día})$): La carga orgánica volumétrica de sustrato (CV_{DQOs}) se puede definir como la cantidad de sustrato carbonáceo por unidad de volumen que reciben diariamente los microorganismos (Orozco, 2005):

$$\text{CV}_{\text{DQOs}} = \frac{Q * C_s}{V_r} \quad (2.6)$$

Donde:

Q: es el caudal de alimentación del reactor, L/día

Cs: Concentración de sustrato orgánico, $\text{mg DQO}/\text{L}$

Vr: Es el volumen de trabajo, L

Carga volumétrica de nitrógeno amoniacal (mg NH₃-N/(L día)): La carga volumétrica de nitrógeno amoniacal (CV_{NH₃-N}) se puede definir como la cantidad de nitrógeno por unidad de volumen que reciben diariamente los microorganismos (Orozco,2005):

$$CV_{NH_3-N} = \frac{Q \cdot C_n}{V_r} \quad (2.7)$$

Donde

Cn: Concentración de nitrógeno, mg N/L

Carga volumétrica de fósforo (mg P/(L día)): La carga volumétrica de fósforo (CV_P) se puede definir como la cantidad de fósforo por unidad de volumen que reciben diariamente los microorganismos (Orozco, 2005):

$$CV_P = \frac{Q \cdot C_p}{V_r} \quad (2.8)$$

Donde

Cp: Concentración de fósforo, mg P/L.

2.6. Detección microscópica de los gránulos de PHA

La detección de gránulos intracelulares de PHA se realizó mediante la tinción con el colorante lipofílico Sudan Black (Serafim y col., 2002). Se tomaron alícuotas de 30 µL del SBR al inicio de las fases anóxica y aeróbica y al final de la fase aeróbica. Las muestras fueron extendidas sobre portaobjetos de vidrio para microscopía y secadas a temperatura ambiente. Se utilizó una versión ligeramente modificada de la técnica de tinción propuesta por Jenkins (1993). Los preparados fueron teñidos con una solución de Sudan Black, la cual fue preparada en solución hidroalcohólica al 60% V/V con 0,3 % P/V de Sudan Black B(IV) (Anedra). El colorante tiñe los gránulos intracelulares de PHA de color azul-negro mediante contacto directo durante 10 minutos. Luego se procedía a lavar los preparados con una solución hidroalcohólica al 50% v/v para retirar el exceso de colorante. Con el fin de tener contraste, los preparados fueron tenidos con solución acuosa de safranina T al 0,5% P/V durante 10 segundos y enjuagados vigorosamente con agua destilada. La safranina tiñe todas las células de color rosado facilitando la observación de los gránulos intracelulares oscuros de PHA. Finalmente los preparados

fueron secados a temperatura ambiente y observados con un microscopio óptico Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con cámara fotográfica incorporada (Figuras 2.8 y 2.9). Las imágenes microscópicas se tomaron bajo iluminación de contraste de fases con un aumento de 1000X. Para la observación por contraste de fases se utilizó una solución de fructosa concentrada en remplazo del aceite de inmersión comercial, ya que este último causa una decoloración del preparado microscópico.

2.7. Detección microscópica de gránulos de polifosfato intracelular

La detección de los gránulos intracelulares de polifosfato se realizó por medio de tinción con el colorante Neisser utilizando la técnica propuesta por Eikelboom (1981). Para ello se prepararon 3 soluciones utilizando reactivos comerciales Anedra (Tabla 2.1).



Figura 2.8. Microscopio óptico Leica DMLB

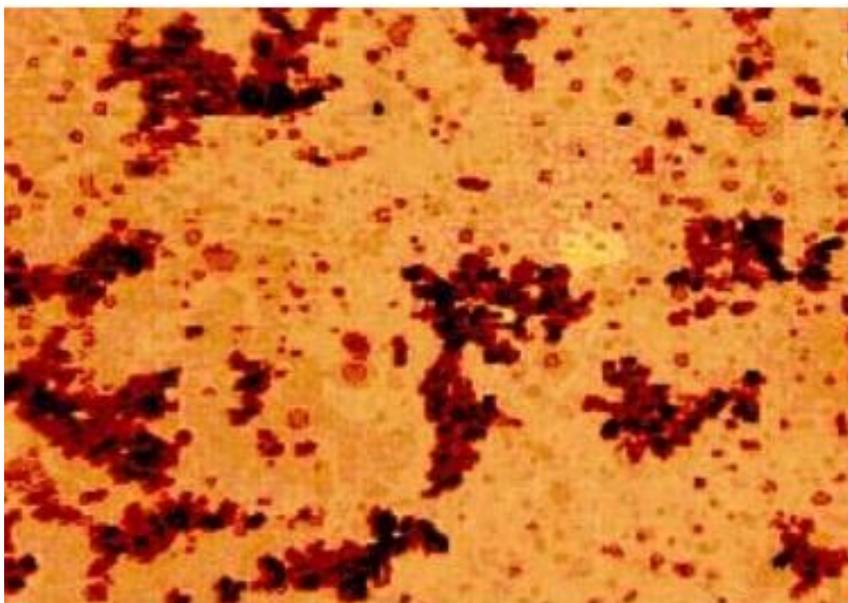


Figura 2.9. Micrografía de lodos activados teñido con Sudan Black

Tabla 2.1. Soluciones utilizadas para la tinción de Neisser

Solución 1	
Solución A	
Azul de metileno	0,1 gr
Ácido acético glacial	5 ml
Etanol (96%)	5 ml
Agua destilada	100 ml
Solución B	
Cristal violeta (10% P/V en etanol (96%))	3,3 ml
Etanol (96%)	6,7 ml
Agua destilada	100 ml
Solución 2	
Bismark Brown (solución acuosa al 1% P/V)	33,3 ml
Agua destilada	66,7 ml

La solución 1 se obtuvo mezclando 2 volúmenes de solución A con 1 volumen de solución B. La solución 1 y 2 fueron almacenadas en cámara de 4°C y remplazadas cada 3 meses. El protocolo para la determinación de polifosfato intracelular se detalla a continuación:

Se tomaron muestras de 30 μL del SBR al inicio de las fases anóxica y aeróbica y al final de la fase aeróbica. Las muestras fueron extendidas sobre portaobjetos y secadas a temperatura ambiente. Se procedió a teñir el preparado con la solución 1 durante 30 segundos y se enjuagó con agua por varios minutos. A continuación se procedió a la tinción con la solución 2 permitiendo un tiempo de contacto de 1 min. Finalmente se enjuagó con abundante agua durante varios minutos. Los preparados teñidos se secaron a temperatura ambiente y se observaron con el microscopio óptico Leica mencionado en la Sección 2.6. Los gránulos de polifosfato se tiñen de color azul-violeta indicando una tinción positiva, mientras que las células teñidas de amarillo-marrón indican una tinción negativa (Figura 2.10). Las imágenes microscópicas se tomaron bajo iluminación de contraste de fases con un aumento de 1000X. Para la observación por contraste de fases se utilizó una solución de aceite de inmersión comercial.

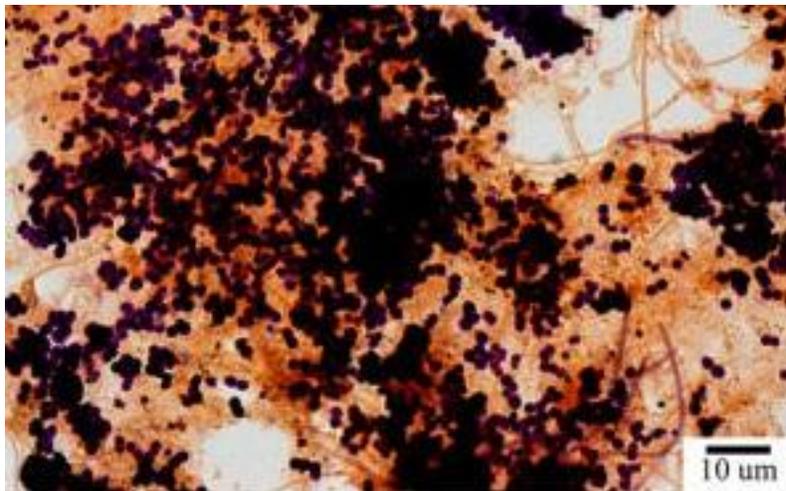


Figura 2.10. Microfotografía de lodos activados teñidos con Neisser
(Tomada de Tu y Schuler, 2013)

2.8. Cuantificación de carbohidratos totales

La concentración de carbohidratos totales (CT) de los lodos activados se determinó siguiendo la técnica de Antrona propuesta por Jenkins y col. (1993). El principio del método se basa en la hidrólisis ácida de polisacáridos hasta sus unidades elementales, monosacáridos, los cuales luego son deshidratados generando

hidroximetilfurfural. Este último reacciona con la antrona formando un compuesto coloreado (azul-verdoso) que finalmente fue medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm (Raunkjær y col, 1994). La reacción de antrona con monosacáridos en medio ácido se esquematiza en la Figura 2.11.

Se utilizó una solución de antrona con una concentración de 0,5 mg/l para ello se pesaron 0,175 gramos de antrona (Sigma-Aldrich) llevados a un volumen de 350 ml con ácido sulfúrico concentrado (Carlo Erba grado Reactivo).

Se tomaron muestras de 1,0 mL del SBR a lo largo del ciclo de operación. Las muestras fueron centrifugadas (13000 rpm, 5 minutos), lavadas y resuspendidas en agua destilada. Este procedimiento fue repetido 2 veces para eliminar cualquier componente que pueda interferir con el método. De forma paralela se preparó la curva de calibración a partir una solución de glucosa patrón (200 µg Glucosa/ml), utilizando glucosa anhidra (Anedra, grado Reactivo). Con la solución patrón se prepararon 5 estándares de glucosa en un rango de 0-200 µg glucosa/ml. Posteriormente tanto las muestras (0,6 ml) como los 5 estándares (0,6 ml) fueron llevados a tubos de ensayo de borosilicato que contenían 3 ml de la solución del reactivo de antrona resultando un volumen final de 3,6 ml. Los tubos de ensayo correspondientes a las muestra y a la curva de calibración se ubicaban en un baño de hielo con el fin de evitar el inicio de la reacción. Luego, los tubos se colocaban simultáneamente a un baño termostático a 100 °C durante 10 min; posteriormente los tubos se enfriaban de forma inmediata en el baño de hielo para cortar la reacción. La lectura de absorbancia se realizó a 620 nm en el espectrofotómetro HACH DR 2800 (Figura 2.6). Se utilizó agua destilada como el blanco de la reacción. Los resultados fueron determinados como µg glucosa/ml y expresados como mg CT/L y mg CT/mg DQO_B.

En ciertos procesos biológicos, particularmente en aquellos que se cicla el glucógeno bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, se ha comúnmente asumido que los cambios en la concentración de carbohidratos totales ocurren sobre el componente glucógeno. En el caso de sistemas con remoción biológica incrementada de fósforo (RBIP) se ha propuesto que los cambios en carbohidratos totales durante las etapas anaeróbica y aeróbica representan la degradación y síntesis de glucógeno respectivamente (Serafim y col., 2002; Liu y col., 2007; Zheng y col ., 2009). En el proceso

anóxico/aeróbico (AN/AE) propuesto en el presente trabajo de tesis se deberá evaluar si los cambios en la concentración de carbohidratos totales están asociados a la probable ocurrencia de procesos de degradación y síntesis de glucógeno y/o vinculados al crecimiento de la biomasa microbiana.

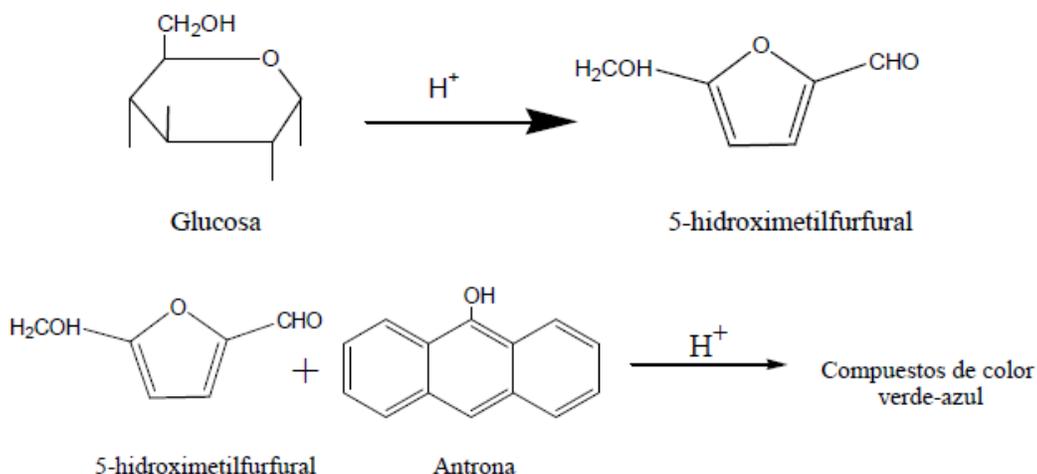


Figura 2.11. Esquema de reacción de Antrona

2.9. Análisis estadístico

Todos los ensayos experimentales fueron realizados por duplicado. Para cada ensayo fueron analizados tres ciclos operativos. Todos los resultados fueron expresados como valores promedio. Se realizó el análisis de varianza utilizando el software Systat 12 (Systat Software Inc., USA). Se utilizó un nivel de significación de 0,05.

2.10. Diseño experimental

Para estudiar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto y concentración de fuente de carbono sobre el proceso de nitrificación se trabajó en una primera etapa de experimentos con una concentración de oxígeno disuelto relativamente baja (<2,0 mgO₂/L) y dos niveles de cargas orgánica, alta y baja, utilizándose la siguiente nomenclatura:

OBCA = Experimento con baja concentración de oxígeno y carga orgánica alta

OBCB = Experimento con baja concentración de oxígeno y carga orgánica baja

Luego de seleccionar las mejores condiciones de operación para las bacterias nitrificantes y a los efectos de generar un sistema de remoción de nitrógeno por desnitrificación, en condiciones aeróbicas y utilizando la fuente de carbono intracelular como fuerza impulsora del proceso, se realizaron 3 experimentos con una mayor concentración de oxígeno disuelto (3,9- 5,5 mgO₂/L) y 3 cargas orgánicas: baja, media y alta de acuerdo a la siguiente nomenclatura:

OACB = Experimento con oxígeno alto y carga orgánica baja

OACM = Experimento con oxígeno alto y carga orgánica media

OACA = Experimento con oxígeno alto y carga orgánica alta

CAPITULO 3

ACLIMATACIÓN Y SELECCIÓN

DE BACTERIAS NITRIFICANTES

ACLIMATACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS NITRIFICANTES

3.1. Factores que influyen en la nitrificación

Los principales factores que influyen sobre el proceso de nitrificación son: la edad de los lodos o tiempo de residencia celular (TRC), temperatura, concentración de oxígeno disuelto (OD), concentración del sustrato donador de electrones, carga orgánica, pH, especies inhibidoras y sustancias tóxicas entre otras. Estos factores influyen significativamente sobre la tasa de crecimiento y actividad de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Cuando el proceso de nitrificación se ve afectado de manera negativa disminuye la concentración de nitritos o nitratos afectando directamente el proceso de desnitrificación y como consecuencia el rendimiento global de eliminación de nitrógeno. (Senstrom y Song, 1991; Surampalli y col., 1997; Gerardi, 2003).

3.1.1. Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes en el proceso de nitrificación. Existe en literatura una gran variedad de valores óptimos de temperatura para nitrificación con lodos activados, ya que los valores óptimos son dependientes de: tipo de proceso, condiciones ambientales, condiciones de operación, edad de lodos etc. La mayoría de las investigaciones en diferentes sistemas de lodos activados coinciden en que la tasa de nitrificación disminuye al disminuir la temperatura (Shamas, 1986; Surampalli y col., 1997; Miranda y col., 2008; Isnansetyo y col., 2014). Las bajas temperaturas ejercen un efecto desfavorable sobre el proceso de nitrificación, siendo este efecto mayor para las bacterias encargadas de oxidar el nitrito a nitrato con respecto a aquellas encargadas de oxidar el amonio a nitrito. Por lo tanto, se pueden generar velocidades de oxidación de nitrito menores a la velocidad de formación del mismo, lo cual ocasiona la acumulación de nitrito en el sistema y con el transcurso del tiempo producir la inhibición y pérdida del proceso de nitrificación (Randall y Burh, 1984; Shamas, 1986). Se han informado valores óptimos entre 15 y 35 °C para el proceso de nitrificación en sistemas SBR a gran escala (Randall y Burh, 1984; Surampalli y col., 1997). Se ha demostrado que el proceso se puede llevar a cabo en un rango de temperaturas comprendido entre 5 y 45 °C, con una temperatura óptima de 35 °C para *Nitrosomonas*.

Aun en las mejores condiciones, el crecimiento de las bacterias nitrificantes es bajo (Jones y Hood, 1980).

Por otra parte, existe una relación estrecha entre la temperatura y la edad de lodos. Komoroswska-Kaufman y col. (2006) estudiaron la relación de la temperatura y la edad de lodos, encontrando que el proceso de nitrificación resulta inestable cuando la temperatura era menor a 15°C para una edad de lodos inferior a 20 días, mientras que para una edad de lodos superior a 20 días observaron que la influencia de la temperatura fue significativamente menor.

3.1.2. Concentración de oxígeno disuelto

El oxígeno juega un papel fundamental en los procesos de nitrificación al generar condiciones de oxidación en el sistema; por lo general se requieren valores de potencial de óxido-reducción (ORP, oxidation reduction potential) entre 100 y 350 mV para favorecer la nitrificación autótrofa (Gerardi, 2003). Los efectos de la concentración de OD sobre el proceso de nitrificación biológica han sido ampliamente demostrados tanto en cultivos puros como en lodos activados de plantas de tratamiento de aguas residuales (Beccari y col., 1992).

Los requerimientos de oxígeno para las etapas de nitritación y nitratación están dados por las siguientes ecuaciones:



En la Ecuación 3.1 se puede observar que se requieren 1,5 moles de oxígeno para oxidar 1 mol de amoníaco, produciéndose 2 moles de hidrógeno. Por lo tanto, el requerimiento de oxígeno para oxidar amonio hasta nitrito es 3,43 g O₂/g NH₄⁺-N. En el caso de la nitratación (Ecuación 3.2), la oxidación de nitrito a nitrato, requiere 1,14 g O₂/g NO₂⁻-N (EPA, 2010). La reacción global de nitrificación (Ecuación 3.3) muestra que se requieren 4,57 gramos de oxígeno por gramo de nitrógeno amoniacal para su completa oxidación hasta nitrato (Surampalli y col., 1997):



En los sistemas de lodos activados, las bacterias nitrificantes autótrofas crecen mucho más lentamente que las bacterias heterotrófas y existe una competencia por el oxígeno entre ambos grupos de organismos (Wang, 2012). La mayor eficiencia en la nitrificación se produce a altas concentraciones de oxígeno disuelto (Randall y Buth 1984; Surampalli y col., 1997). A concentraciones de oxígeno disuelto inferiores a 0,5 mg O₂/l se produce poca o nula nitrificación, debido a los efectos relacionados con la resistencia a la difusión del oxígeno dentro del floculo y la competencia por el oxígeno con microorganismos heterótrofos. Al aumentar los niveles de oxígeno, la nitrificación se vuelve más eficiente, por lo tanto se recomienda que la concentración de OD se encuentre por encima de 3 mg O₂/l y así garantizar que el oxígeno llegue al interior de los floculos microbianos (Beccari y col., 1992; Surampalli y col., 1997; Chen y col., 2006)

Third y col (2003) utilizando un SBR aeróbico/anóxico con SND y alimentado principalmente con acetato de sodio y sales de amonio y fósforo, lograron una aceptable velocidad de nitrificación a una concentración de OD de 1,5 mg O₂/L, la cual representó un 93,7% de la velocidad máxima alcanzada con una concentración de 5 mg O₂/L. Los autores sugieren mantener una concentración de OD mayor a 2,0 mg O₂/L para evitar una inhibición competitiva de la nitrificación por oxígeno.

3.1.3. pH

Durante el proceso de nitrificación se pierde alcalinidad a través de los procesos de generación de energía por oxidación del amonio (Ecuación 1.3) y uso del dióxido de carbono durante la síntesis de bacterias nitrificantes (Ecuación 1.6). La pérdida de alcalinidad en el proceso de oxidación de amonio ocurre únicamente en la primera etapa de la nitrificación (Ecuación 3.1), es decir cuando ocurre la conversión de amonio a nitrito (Surampalli y col 1997; EPA, 2009). Esta producción de iones de hidrógeno (H⁺) sumado al consumo de CO₂ puede afectar de manera significativa el pH del sistema. De acuerdo a la reacción global de oxidación y síntesis de biomasa nitrificante, se consume 1,98 moles de HCO₃⁻ por cada mol de nitrógeno amoniacal utilizado en el proceso de nitrificación

(Ecuación 1.7). Esta pérdida de alcalinidad equivale a 7,14 mg de alcalinidad expresada como CaCO_3 por mg de amonio. Debe destacarse que se pierde más alcalinidad por la oxidación de iones de amonio que por el uso de CO_2 como fuente de carbono (Gerrardi, 2003).

La aireación arrastra parcialmente el dióxido de carbono del agua residual disminuyendo de este modo la caída del pH ocasionada por la nitrificación; este fenómeno es importante ya que resulta indispensable mantener condiciones de pH óptimas en el sistema para garantizar un proceso en estado estacionario.

Existen diversos estudios donde se informa valores de pH óptimos en una escala bastante amplia para la tasa de nitrificación; sin embargo la tendencia general es que a medida que el pH disminuye, la tasa de nitrificación disminuye (Shammas, 1986; Chen, 2006). El intervalo óptimo de valores de pH se encuentra entre 7,5 y 8,6, pero algunos sistemas aclimatados a condiciones de pH más bajo también han conseguido nitrificación de forma satisfactoria (Metclaf y Eddy., 1995). Jones (1980) informó actividad nitrificante a pH entre 6,0 y 10,0 con un valor de pH óptimo de 8,5 para bacterias nitrificantes aisladas de un pantano de agua dulce. Chen (2006) informó un pH óptimo para la nitrificación que puede variar entre 7,0 y 9,0 con un intervalo óptimo de pH de 7,2 a 8,8 y 7,2 a 9,0 para *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* respectivamente.

3.1.4. Relación DQO/N

Uno de los parámetros más críticos en el proceso de nitrificación es la demanda química de oxígeno y su relación con el nitrógeno (DQO/N). En los sistemas de nitrificación en tanques separados como en el caso de los sistemas Ludzack-Ettinger y Wuhrmann (ver Capítulo 1), se ha comprobado que cuanto mayor es la relación DQO/N, menor es la capacidad nitrificante del sistema ya que influye directamente sobre el crecimiento de las bacterias nitrificantes y heterótrofas, las cuales compiten por macronutrientes, micronutrientes, OD etc. (Carrera y col., 2004). Se han estudiado relaciones DQO/N entre 0,71 y 3,4 en una planta piloto Ludzack-Ettinger modificada, informando una relación óptima de 0,71 (Carrera y col., 2004).

Por otro lado los sistemas que realizan el proceso de nitrificación y desnitrificación en un solo tanque alternando una serie de etapas aeróbicas y anóxicas (como es el caso de sistemas SBR), las relaciones DQO/N deben ser mayores para cubrir la fuente de carbono necesaria en el proceso de desnitrificación (Metcalf y Eddy, 1995). Para un sistema de remoción de nitrógeno vía post-desnitrificación utilizando un SBR anaeróbico/aeróbico/anóxico se ha informado una relación óptima DQO/N de 7,1 al inicio del proceso, con el fin de generar acumulación de fuente de carbono intracelular en la fase anaeróbica para posteriormente utilizarla en el proceso de desnitrificación durante la fase anóxica. En este sistema, el proceso de desnitrificación se llevó a cabo mediante la utilización de las reservas intracelulares de carbono, lográndose una eficiencia de remoción de nitrógeno total del 98% (Li y col., 2014).

3.1.5. Efecto de las especies inhibidoras

El proceso de nitrificación puede ser inhibido por diferentes factores como por ejemplo la naturaleza de la materia biodegradable, la temperatura, las condiciones de la calidad del agua, los cuales pueden producir una disminución de la velocidad de nitrificación hasta la muerte de las bacterias (Breisha y Winter, 2010). Dependiendo del nivel de toxicidad, las bacterias pueden perder temporalmente o completamente su actividad enzimática, llegando en ocasiones a tener daños irreversibles en su estructura celular. Las bacterias nitrificantes obtienen una cantidad pequeña de energía del proceso de oxidación del amonio y el nitrito, por ello en condiciones adversas se les dificulta la recuperación de los sistemas enzimáticos dañados (Gerardi, 2003). *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* son inhibidas por el amonio y el nitrito cuando se presentan en concentraciones excesivamente altas (Guerrero y col., 2012). El amoníaco libre, que puede ser generado por un aumento del pH (Ecuación 3.4), inhibe a *Nitrosomonas* en concentraciones de 10 mg/l y a *Nitrobacter* en concentraciones de 0,1 mg/l; el ácido nitroso (HNO_2), que se genera en condiciones de bajo pH a partir de los iones de nitrito (Ecuación 3.5), afecta tanto a *Nitrosomonas* como a *Nitrobacter* en concentraciones de 1,0 mg/l (Gerardi, 2003).



El proceso de nitrificación puede también ser significativamente afectado por metales pesados, incluyendo el níquel (0,25 mg/L), el cromo (0,25 mg/L) y el cobre (0,10 mg/L) (Metcalf y Eddy, 2003).

3.2. Objetivos del Capítulo

Los objetivos de este capítulo fueron: la puesta en marcha del reactor de cargas secuenciales (SBR), la aclimatación de los lodos activados a la fuente de carbono y condiciones de operación del reactor (anóxica/aeróbica) y el enriquecimiento de los lodos con bacterias nitrificantes.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Puesta en marcha del SBR y aclimatación de los lodos activados

El SBR utilizado en el presente trabajo de tesis se inoculó con lodos activados provenientes de un reactor biológico aeróbico semi-continuo, a escala laboratorio, alimentado con suero de queso como fuente de carbono. El SBR se operó con régimen anóxico/aeróbico y la fuente de carbono elegida fue acetato de sodio (Sección 2.1), por lo tanto fue necesario un período de aclimatación de los lodos a las nuevas condiciones. La aclimatación se logró una vez que los lodos fueron capaces de utilizar la nueva fuente de carbono bajo condiciones anóxicas. Una vez aclimatados los lodos activados, se requirieron 6 TRC (tiempos de residencia celular) para lograr un estado estable del sistema definido por una velocidad constante de consumo de acetato. Las condiciones de operación y sistema de control automático del reactor así como la composición del agua residual sintética utilizada se describieron en las Secciones 2.1 y 2.2.

3.3.2. Selección de bacterias nitrificantes

Se definieron las condiciones de operación del SBR considerando los factores que afectan el proceso de nitrificación, los cuales fueron descritos en la Sección 3.1. En el presente capítulo, el SBR fue operado a 25 °C, pH= 7,0 y nivel de saturación de oxígeno

(NSO) de 20%, equivalente a una concentración de OD de 1,6 mg O₂/L (Fase aeróbica). Estas condiciones fueron seleccionadas considerando que son favorables para el proceso de nitrificación.

Se utilizó una duración de ciclo de 6 horas y una relación temporal anóxica/aeróbica de 1. Cabe destacar que se utilizó una relación DQO/N= 100:10 para favorecer la acumulación de reservas intracelulares de carbono, las cuales podrían ser requeridas en el proceso de desnitrificación. Además debe considerarse que la adición de carbono orgánico favorece el desarrollo y actividad de las bacterias heterótrofas, las cuales proveen la fuente de carbono inorgánico (CO₂) necesaria para el crecimiento de nitrificantes. Al respecto se evaluó el efecto de la carga orgánica volumétrica sobre la capacidad de nitrificación del sistema biológico utilizando la relación DQO/N mencionada.

3.3.3. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) en el SBR

El k_La se determinó en agua corriente bajo las siguientes condiciones: 20°C, velocidad de agitación de 100 rpm y diferentes velocidades de aireación (12, 37, y 137 L/(L h)). El método se basa en la eliminación de oxígeno disuelto del sistema por la adición de sulfito de sodio. Cuando la concentración de OD en el reactor alcanza 0 mgO₂/L, se enciende la aireación para alcanzar el nivel de saturación. Los valores de OD se midieron a lo largo del periodo de aireación.

El K_La se obtuvo por la integración de la siguiente ecuación:

$$TTO = \frac{dCOD}{dt} = K_L a (COD^* - COD) \quad (3.6)$$

Donde TTO es la tasa de transferencia de oxígeno (mgO₂/(Lh)), COD* es la concentración de saturación de oxígeno en el agua (mgO₂/L) a la temperatura de trabajo y COD es la concentración de oxígeno disuelto (mgO₂/L) en el tiempo (t). La fuerza impulsora del proceso de transferencia de oxígeno está dado por la diferencia entre COD* y COD.

Se ha propuesto una relación lineal entre el $k_L a$ y la velocidad de aireación mediante la siguiente expresión:

$$k_L a = mVAR + n \quad (3.7)$$

donde VAR es la velocidad de aireación (L/(L h)), m es la pendiente (L/L) y n (h^{-1}) corresponde al $k_L a$ producido por la agitación sin aireación (VAR= 0).

Los parámetros m y n estimados fueron: 0,10 L/L y 2,34 h^{-1} respectivamente. Third y col (2003) utilizaron el mismo procedimiento para determinar el valor de $k_L a$ correspondiente únicamente a la agitación. En agua corriente y bajo las condiciones de trabajo del reactor (25 °C, velocidad de agitación de 100 rpm, sin aireación) se estimó un valor de $k_L a$ de 2,63 h^{-1} utilizando la Ecuación (3.8) (Al-Ahmady, 2006). Sobre la base de esta estimación, se puede suponer que en un cultivo mixto sometido únicamente a agitación se produce el ingreso de oxígeno a través de la superficie del líquido durante la etapa anóxica de la operación del SBR. Es bien conocido que el oxígeno aumenta el estado oxidativo de los sistemas biológicos, lo cual podría afectar negativamente los procesos anaerobios y anóxicos. Plósz y col. (2003), utilizando un modelo matemático y mediante simulación, cuantificaron el efecto del oxígeno que ingresa al reactor anóxico a través de la superficie sobre el proceso de desnitrificación.

$$k_L a_{(25^\circ C)} = k_L a_{(20^\circ C)} 1.024^{(25 - 20)} \quad (3.8)$$

En el presente trabajo, se realizaron determinaciones de ORP a fin de evaluar las condiciones de oxidación de las fases anóxicas y aerobias y establecer su relación con los procesos biológicos que tienen lugar en cada ensayo.

3.3.4. Cuantificación de los procesos de nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS) y desnitrificación (DN) en fase aeróbica

La cantidad de nitrógeno removido a través de la nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS) se calculó en la fase aeróbica durante el período que estuvo presente el nitrógeno amoniacal.

La NDS se determinó a partir de la diferencia entre el nitrógeno amoniacal que fue oxidado ($\text{NH}_3\text{-N}_{\text{OXIDADO}}$) y la suma de las formas de nitrógeno generado en el proceso de nitrificación ($\text{NO}_x\text{-N} = \text{NO}_3^-\text{-N} + \text{NO}_2^-\text{-N}$). El nitrógeno amoniacal oxidado ($\text{NH}_3\text{-N}_{\text{OXIDADO}}$) se calculó a partir de la diferencia entre el consumo total de nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) y el $\text{NH}_3\text{-N}$ que fue asimilado por la biomasa heterótrofa durante la fase aeróbica. El nitrógeno que fue asimilado por la biomasa nitrificante se consideró despreciable (Third y col., 2003).

El consumo total de nitrógeno amoniacal se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito en la Sección 2.4.4.2.1. El $\text{NH}_3\text{-N}$ asimilado por la biomasa heterótrofa, durante la fase aeróbica en presencia de nitrógeno amoniacal, se estimó a partir de los balances teóricos de masa de carbono y nitrógeno utilizándose los coeficientes estequiométricos típicos del sistema biológico estudiado. Para ello se estimaron las cantidades de polihidroxibutirato (PHB) y la biomasa producidas en las fases anóxicas y aeróbicas, respectivamente. El polímero que se forma principalmente cuando se utiliza acetato como fuente de carbono es el PHB (Dias y col., 2006). En la fase anóxica se estimó la cantidad de PHB que se producía a partir del acetato consumido utilizando un rendimiento estequiométrico $Y_{\text{PHB}/\text{Ac}}$ de 0,52 C-mol PHB/C-mol Ac, equivalente a 0,38 g PHB/g Ac (Beun y col., 2002). El acetato disponible para la producción de PHB se determinó a partir diferencia entre las concentraciones de DQOs al inicio de la fase anóxica y DQOs utilizada en el proceso de desnitrificación anóxica con una demanda de acetato teórica de 3,8 mg DQOs/mg $\text{NO}_3\text{-N}$ (3,65 mg Ac/mg $\text{NO}_3\text{-N}$).

La biomasa producida a partir de PHB se calculó asumiendo un rendimiento de biomasa heterótrofa $Y_{\text{X}/\text{PHB}}$ de 0,5 C-mol biomasa/C-mol PHB, equivalente a 0,57 g SSV/g PHB. Por último, el $\text{NH}_3\text{-N}$ asimilado en la biomasa heterótrofa se determinó a partir de la

fórmula molecular de la biomasa $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$, equivalente a 24,6 g SSV/C-mol biomasa (Third y col. 2003).

El nitrógeno removido por NDS se calculó mediante la siguiente expresión (Third y col. 2003):

$$\% \text{NDS} = \left(1 - \frac{\text{NO}_x^- - \text{N}}{\text{NH}_3 - \text{N}_{\text{oxidado}}} \right) \times 100 \quad (3.9)$$

Donde $\text{NO}_x^- - \text{N}$ es la suma de las concentraciones de nitrito y nitrato en el momento que se agota el nitrógeno amoniacal y $\text{NH}_3 - \text{N}_{\text{oxidado}}$ es la cantidad de nitrógeno amoniacal oxidado durante la fase aeróbica.

La cantidad de nitrógeno eliminado a través de desnitrificación (DN) se calculó, luego de la etapa de NDS, a partir de la diferencia entre las concentraciones de nitrógeno oxidado ($\text{NO}_x^- - \text{N}$) al final de la nitrificación y al final de la fase aeróbica. La DN se expresó de manera porcentual a través de la siguiente expresión:

$$\% \text{DN} = \left(1 - \frac{\text{NO}_x^- - \text{N}_{\text{FA}}}{\text{NO}_x^- - \text{N}_{\text{FN}}} \right) \times 100 \quad (3.10)$$

Donde $\text{NO}_x^- - \text{N}_{\text{FA}}$ es la cantidad de nitrógeno oxidado al final de la fase aerobia y $\text{NO}_x^- - \text{N}_{\text{FN}}$ es la cantidad de nitrógeno oxidado al final del período de nitrificación.

3.3.5. Determinación de nitrógeno inorgánico

La eliminación de nitrógeno inorgánico (Ni) se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{NiR} = \left(1 - \frac{\text{Ni}_t}{\text{Ni}_o} \right) \times 100 \quad (3.11)$$

Donde Ni_o es la concentración de nitrógeno inorgánico (Ni, mg/L) del agua residual al inicio de la fase anóxica, la cual corresponde a la concentración de $\text{NH}_3 - \text{N}$ en dicha

fase, y N_i corresponde a la concentración de Ni total, la cual está dada por la suma de las concentraciones de las diferentes formas de nitrógeno inorgánico (NH_3-N , NO_2-N y NO_3-N), a diferentes tiempos de operación del ciclo del SBR. Las concentraciones de nitrato y/o nitrito al inicio del ciclo (provenientes del sobrenadante residual del ciclo anterior) no fueron consideradas en la determinación de la concentración de Ni.

3.3.6. Determinación de las velocidades de nitrificación y desnitrificación

La velocidad de nitrificación volumétrica (VNV, $mg\ NH_3-N/(L\ h)$) se determinó a partir de la pendiente de las curvas de decaimiento de nitrógeno amoniacal después de restar el NH_3 asimilado por la biomasa heterótrofa en el intervalo de tiempo. La velocidad de nitrificación específica (VNE, $mg\ NH_3-N/(g\ SSV\ h)$) se calculó a partir de la relación entre VNV y la concentración de biomasa expresada como SSV. La velocidad de desnitrificación volumétrica (VDNV) y la velocidad de desnitrificación específica (VDNE) se calcularon a partir de las pendientes de las curvas de decaimiento de nitrato para el período posterior a la etapa de la NDS, y se expresaron como $mg\ NO_3-N/(L\ h)$ y $mg\ NO_3-N/(g\ SSV\ h)$ respectivamente.

3.4. Ensayos experimentales

Una vez alcanzadas las condiciones de estabilidad en el SBR, se realizaron dos ensayos para evaluar el efecto de la carga volumétrica de sustrato orgánico sobre el proceso de nitrificación:

OBCA = experimento con baja concentración de oxígeno y carga orgánica alta.

OBCB = Experimento con baja concentración de oxígeno y carga orgánica baja.

Los ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones de operación, excepto en lo que respecta a la carga volumétrica orgánica (Tabla 3.1). Para ello se utilizaron dos modelos de aguas residuales sintéticas: ARS_1 , ARS_2 (Tabla 3.2). El tiempo de residencia celular fue de 10 días para ambos ensayos. Cada condición experimental se mantuvo al menos 4 tiempos de residencia celular.

Tabla 3.1. Condiciones operativas y cargas volumétricas de los ensayos OBCA y OBCB

Parámetros	Ensayo OBCA	Ensayo OBCB
Fase anaeróbica (min)	150	150
Fase aeróbica (min)	150	150
Sedimentación (min)	50	50
Purga sobrenadante (min)	10	10
Ciclo total (h)	6	6
Relación anóxica/aeróbica	1,0:1,0	1,0:1,0
Temperatura (°C)	25 ± 0,5	25 ± 0,5
pH (Fase anóxica y aeróbica)	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1
Oxígeno (Nivel de saturación) (%)	20	20
Carga volumétrica de sustrato orgánico (mg DQO/(L día))	880	440
Carga volumétrica de nitrógeno amoniacal (mgNH ₃ -N/(L día))	88	44
Carga volumétrica de fosforo (mgP/(L día))	44	22

3.4.1. Resultados del Ensayo OBCA

El SBR presentó 4 ciclos por día y el tiempo de residencia hidráulico (TRH) fue de 21,8 hs. El SBR se operó bajo condiciones de baja aireación, determinada por un nivel de saturación de oxígeno (NSO) de 20%, y relativamente alta carga orgánica (880 mg DQO/(L día)). Las cargas volumétricas de nitrógeno y fósforo fueron 88 mgNH₃-N/(L día) y 44 (mgP/(L día)) respectivamente, conduciendo a una relación DQO:N:P= 100:10:5 (Tabla 3.1). El SBR fue alimentado con el agua residual sintética ARS₁ (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Agua residual sintética de los Ensayos OBCA y OBCB

Agua residual sintética (ARS)	Concentración (g/L)	
	ARS ₁	ARS ₂
CH ₃ COONa	1,172	0,586
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,376	0,188
KH ₂ PO ₄	0,1086	0,0543
K ₂ HPO ₄	0,0856	0,0428
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,18	0,18
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,0285	0,0285
Solución de elementos trazas		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15	15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5	5
MnSO ₄ ·H ₂ O	3	3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,75	0,75
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,15	0,15
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,5	0,5
H ₃ BO ₃	0,1	0,1
KI	0,1	0,1

El sistema en condiciones de estado estacionario presentó una concentración de biomasa de 1850 ± 120 mg DQO_B/L, un nivel de nitrificación de 7% mientras que el proceso de desnitrificación no fue observado. Al final del ciclo se obtuvo un efluente con alta concentración de nitrógeno inorgánico $43,5 \pm 0,20$ mg N/L, lo que resultaba en una descarga media de 52,2 mg N/día. Por lo tanto, la eliminación de Ni fue solamente de 8% (Fig. 3.1). En los sistemas de lodos activados, las bacterias nitrificantes crecen mucho más lentamente que las bacterias heterótrofas, lo que genera una competencia por el oxígeno entre estos dos grupos de organismos (Wang, 2012). Por lo tanto se demostró que las condiciones de alta carga orgánica y baja concentración de OD generaron un mayor crecimiento de bacterias heterótrofas y pobre actividad nitrificante, con escasa producción de nitrato, en consecuencia no se observó actividad desnitrificante. Debe

destacarse que no se observaron cambios significativos respecto a la concentración de fósforo (Fig. 3.1).

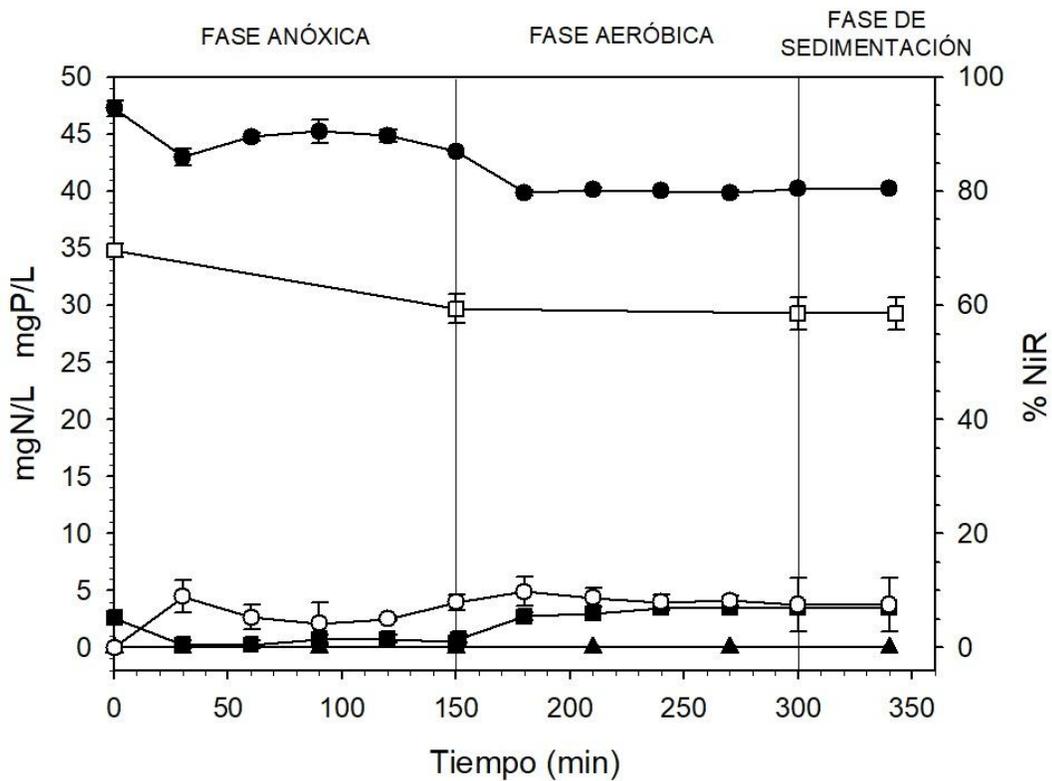


Figura 3.1. Remoción de especies químicas de nitrógeno y fósforo durante un ciclo de operación del SBR (Ensayo OBBCA). (□) Ortofosfato (PO₄-P, mg P/L); (●) N amoniacal (NH₃-N, mg N/L); (■) Nitrito (NO₂⁻-N, mg N/L); (▲) Nitrito (NO₂⁻-N, mg N/L); (○) % Remoción de N inorgánico (%NiR).

3.4.2. Resultados del Ensayo OBBCB

El SBR se operó bajo condiciones de baja aireación (NSO= 20%) y baja carga orgánica (440 mg DQO/(L día)). Las cargas volumétricas de nitrógeno y fósforo fueron 44 mgNH₃-N/(L día) y 22 (mgP/(L día)) respectivamente, manteniendo la misma relación DQO:N:P= 100:10:5 utilizada en el ensayo previo. Además se utilizaron las mismas condiciones operativas que aquellas del ensayo OBBCA (Tabla 3.1) El SBR fue alimentado con el agua residual sintética ARS₂. (Tabla 3.2). El sistema en estado estacionario

alcanzó una concentración de biomasa de 1251 ± 187 mg DQO_B/L, consumiéndose casi por completo el sustrato orgánico (>99%) durante la fase anóxica. La acumulación de PHA se produjo en la fase anóxica y su degradación ocurrió en la fase aeróbica según se determinó por observación microscópica de las muestras teñidas de los lodos activados (Fig. 3.2 a y b).

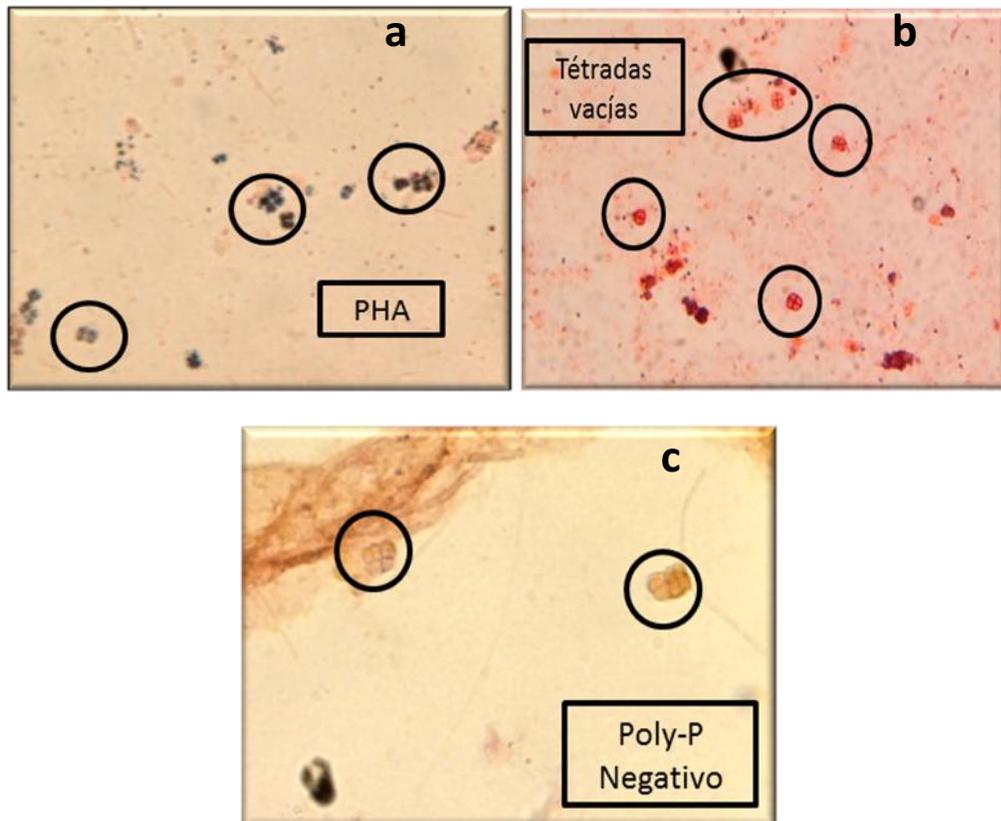


Figura 3.2. Micrografías de lodos activados correspondientes al Ensayo OBCB. a) Fase anóxica final: tétradas PHA positivo. b) Fase aeróbica final: tétradas vacías, PHA negativo. c) Poly-P negativo.

Durante todo el ciclo el ORP se mantuvo en valores positivos entre 286-295 (mV) y la concentración de ortofosfato no mostró cambios significativos, además la tinción intracelular de poly-P resultó negativa (Fig. 3.2 c). Estos resultados permiten determinar que no tuvo lugar el proceso de remoción biológica incrementada de fósforo. En la fase anóxica, la transferencia de oxígeno por agitación fue responsable de las condiciones oxidantes del sistema biológico (ORP= $+286 \pm 8$ mV). Durante la fase aeróbica se

registraron valores de ORP alrededor de +295 mV proporcionando condiciones adecuadas de oxidación para la nitrificación autótrofa (Gerardi, 2007).

En el ensayo OBCB se eliminó aproximadamente 99% del nitrógeno amoniacal, casi exclusivamente en la fase aeróbica. Alrededor del 70% del nitrógeno amoniacal presente en fase aeróbica fue removido por nitrificación, es decir se utilizó como fuente de energía por las bacterias nitrificantes que conducen a la formación de nitrato, según fue determinado por el balance de masa de nitrógeno. A pesar de que la concentración de OD fue relativamente baja ($<2,0$ mg O_2/L), el proceso de nitrificación no resultó afectado y pudieron determinarse los siguientes parámetros cinéticos: $VNV= 3,96$ mg $NH_3-N/(L h)$ y $VNE= 4,22$ mg $NH_3-N/(g SSV h)$, sin registrarse acumulación de nitrito (Fig. 3.3). Los procesos de NDS y DN, que tuvieron lugar durante la fase aeróbica, presentaron escaso desarrollo (11 ± 10 y 5 ± 5 % respectivamente), por consiguiente la velocidad de desnitrificación no pudo ser calculada.

El efluente final presentó una concentración de nitrógeno inorgánico de 4,5 mg N/L, lo que resulta en una descarga media de 5,4 mg N/día, según se determinó mediante el balance de nitrógeno. Estos resultados implicaron una remoción de nitrógeno inorgánico de $45 \pm 2\%$ (Fig. 3.3). Debe destacarse que el nitrato residual que no pudo ser desnitrificado en la fase aeróbica, fue eliminado completamente en los primeros minutos de la fase anóxica del siguiente ciclo operativo por bacterias desnitrificantes y no fue tenido en cuenta para los cálculos de la remoción de nitrógeno inorgánico.

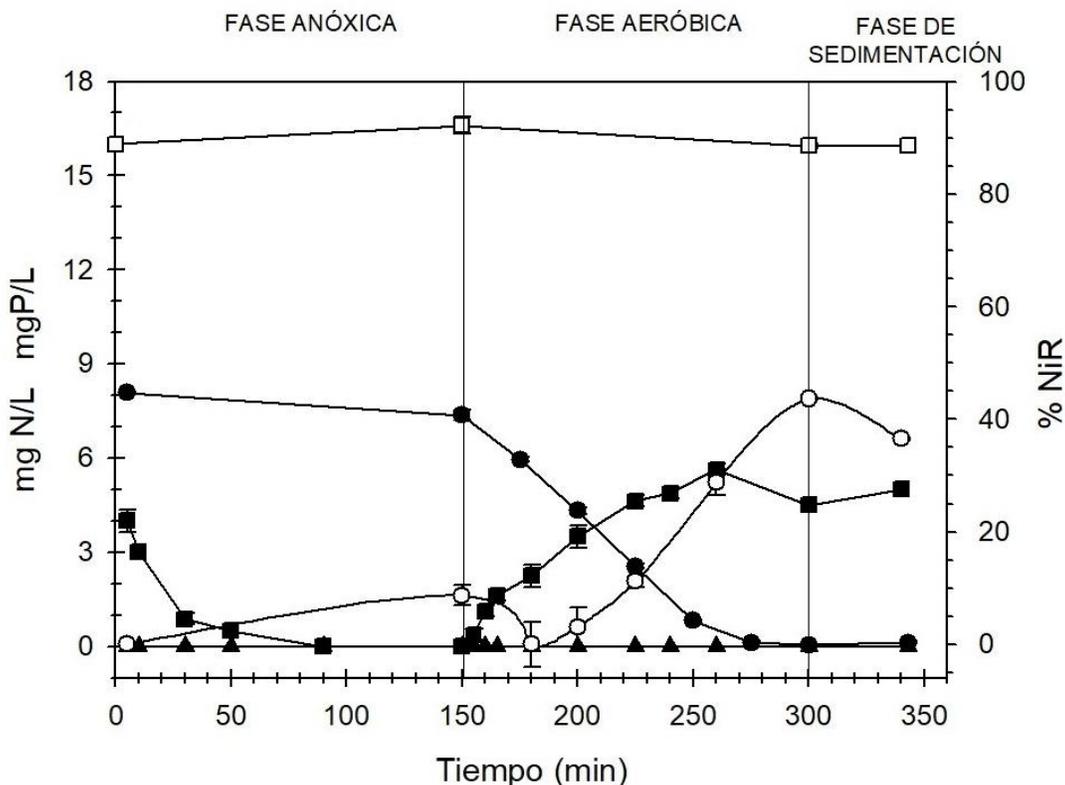


Figura 3.3. Remoción de especies químicas de nitrógeno y fósforo durante un ciclo de operación del SBR (Ensayo OBCB). (□) Ortofosfato (PO₄-P, mg P/L); (●) N amoniacal (NH₃-N, mg N/L); (■) Nitrato (NO₃⁻-N, mg N/L); (▲) Nitrito (NO₂⁻-N, mg N/L); (○) % Remoción de N inorgánico (%NiR).

3.4.3 Discusión de los resultados

En el presente capítulo se ha evaluado el efecto de la carga orgánica sobre la nitrificación. Cabe destacar que una elevada carga orgánica generó un mayor crecimiento de heterótrofos, lo cual podría intensificar la competencia con los nitrificantes por los factores nutricionales de crecimiento (macro y micronutrientes, OD, etc...). Además se debe considerar que una mayor carga orgánica genera una mayor producción de PHA bajo condiciones anóxicas y su posterior oxidación en la fase aeróbica conduce a un mayor consumo de oxígeno. Esta observación fue informada por Third (2003) trabajando con un SBR aeróbico alimentado con acetato. Este análisis permitiría explicar los bajos rendimientos del proceso de nitrificación observados en el Ensayo OBCA así como demostrar la fuerte influencia de la carga orgánica sobre la competencia entre los

microorganismos heterótrofos y nitrificantes por el oxígeno en condiciones de baja concentración de OD.

3.5. Conclusiones del Capítulo

En el presente capítulo se demostró la influencia de las bacterias heterótrofas en los sistemas de remoción de nitrógeno y el deterioro que pueden causar sobre el proceso de nitrificación. Se ha propuesto que la competencia por el oxígeno entre los microorganismos heterótrofos y autótrofos es probablemente el factor responsable de generar una baja actividad nitrificante en sistemas con carga orgánica relativamente alta y bajo OD representados en el Ensayo OBCA. El reactor sometido a una carga orgánica de 880 mg DQO/(L día) presentó un efluente final de mala calidad en términos de su elevada concentración de nitrógeno inorgánico ($43,5 \pm 0,20$ mgN/L) con descarga media de 52,2 mg N/día y pobre eliminación de nitrógeno inorgánico (8%).

Sin embargo se obtuvo un proceso de nitrificación aceptable una vez que se redujo la carga orgánica hasta 440 mg DQO/(L día) (Ensayo OBCB) manteniendo las mismas condiciones operacionales: concentración de OD= < 2,0 mg O₂/L, relación DQO:N:P= 100:10:5, pH= 7,0 y relación anóxica/aeróbica AN/AE= 1,0:1,0. Este sistema con buena actividad nitrificante presentó una completa remoción del sustrato orgánico en la fase anóxica. La remoción de nitrógeno amoniacal fue mayor al 99%, del cual el 70% fue utilizado como fuente de energía por bacterias nitrificantes. La velocidad de nitrificación volumétrica y específica fueron de 3,96 mg NH₃-N/(L h) y 4,22 mg NH₃-N/(g SSV h) respectivamente. No hubo generación de nitrito. El proceso de nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS) y el posterior proceso de desnitrificación (DN) fueron muy bajos. El efluente final presentó una concentración de nitrógeno inorgánico de 4,5 mg N/L, lo que resulta en una descarga media de 5,4 mg N/día y una remoción de nitrógeno inorgánico de $45 \pm 2\%$. Esta pobre remoción de nitrógeno inorgánico fue asociada a la baja capacidad desnitrificante del sistema.

CAPITULO 4

ALTERNATIVAS PARA

MEJORAR EL PROCESO DE

DESNITRIFICACIÓN

ALTERNATIVAS PARA MEJORAR EL PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN

4.1. Factores que influyen en la desnitrificación tradicional (anóxica) y aeróbica.

La desnitrificación puede ser afectada por varios factores, entre los más relevantes se encuentran: temperatura, oxígeno disuelto (OD), pH, potencial de óxido-reducción, nutrientes, fuente de carbono orgánico y concentración de nitrato. En el caso de la desnitrificación anóxica los factores más críticos son la presencia sustrato o carbono orgánico fácilmente disponible y la ausencia de oxígeno molecular libre (Gerardi, 2003).

4.1.1. Desnitrificación anóxica

4.1.1.1. Temperatura

Se sabe que los microorganismos desnitrificantes pueden crecer en un amplio rango de temperatura de 4 a 45 °C (Cervantes, 2009). En general, cuando se incrementa la temperatura del agua residual, la velocidad de crecimiento y desnitrificación también aumentan. La temperatura óptima ha sido informada alrededor de 30 a 40 °C (Winkler, 1999). Otros autores (Carrera y col., 2003) informaron una temperatura óptima de 25 °C en un sistema donde el proceso de nitrificación y desnitrificación se producía en reactores separados. Cabe destacar el efecto de la temperatura sobre el oxígeno, pues al aumentar la temperatura disminuye la solubilidad del oxígeno (Gerardi, 2003).

4.1.1.2. Oxígeno disuelto

Tradicionalmente la desnitrificación ocurre en condiciones anóxicas y los altos niveles de OD pueden inhibir la desnitrificación (Zhang y col., 2015). La velocidad de desnitrificación tiende a ser nula cuando la concentración de oxígeno disuelto alcanza 1,0 mg/L (Metcalf y Eddy, 1995). Concentraciones de OD del orden de 2 mg/L puede inhibir el sistema de desnitrificación en cultivos puros, mientras que en sistemas de lodos activados las concentraciones que pueden inhibir el proceso pueden variar entre 0,3 y 1,5 mg/L dependiendo del tamaño de los flóculos (Schmidell, 2007). Algunos autores plantean que

la desnitrificación puede tener lugar a concentraciones de OD mayores a 2 mg/L, debido a que las bacterias nitrificantes se ubican en la periferia del flóculo mientras las desnitrificantes se encuentran en el centro donde se dan condiciones anóxicas; cabe destacar que para que esto ocurra, los flóculos deben presentar diámetros mayores a 125 μm (Robertson y Kuenen, 1984; Li y Ganczarczyk, 1990, 1993; Pochana y Keller, 1999; Zhu y col., 2008). A bajas concentraciones de O_2 , en el orden de los 0,4 mg O_2/L , el N_2O puede ser el producto final de la desnitrificación en lugar de N_2 (Tallec y col., 2008).

4.1.1.3. pH

Durante el proceso de conversión de nitrato a nitrógeno molecular se produce un equivalente de alcalinidad por equivalente de $\text{NO}_3\text{-N}$ reducido, lo cual es igual a 3,5 g de alcalinidad como CaCO_3 producida por g de nitrato reducido, recuperándose aproximadamente la mitad perdida en la nitrificación que es de 7,14 g de alcalinidad como CaCO_3 (Ronzano y Dapena 2002). El pH óptimo para el proceso de desnitrificación se encuentra en el intervalo de 7,0-7,5 (Gerardi 2003), 7,0-8,0 (Knowles 1982), 6,5-7,5 con un óptimo de 7,0 (Metcalf y Eddy 1995), 7,0-9,0 con un óptimo de 7,5 (Ferrer y Secco. 2003). Estudios con cultivos de *Pseudomonas denitrificans* mostraron que el pH óptimo para el crecimiento y la reducción de nitratos y nitritos se encontraba entre 7,2 y 7,6. Los cultivos de *Comamonas denitrificans* mostraron que el pH más favorable era de 7,5 (Gumaelius y col., 2001).

A valores de pH ácido, las enzimas encargadas de la desnitrificación se inhiben progresivamente, especialmente la óxido nitroso reductasa, provocando un aumento de la producción de óxidos de nitrógeno, como productos finales de la desnitrificación (Ferrer y Seco, 2003; Knowles 1982).

4.1.1.4. Fuente de carbono

Los microorganismos desnitrificantes pueden utilizar numerosas fuentes de carbono y energía para su crecimiento. Algunas especies son fotoautótrofas, como *Rhodopseudomonas sphaeroides*, otros, como *Thiobacillus denitrificans* pueden usar hidrógeno o compuestos de azufre reducido como fuente de energía y CO_2 como fuente

de carbono (litoautótrofos) (Cervantes, 2009). Muchas otras especies pueden usar varias fuentes orgánicas (organoheterótrofos) como glicerol (Akuna y col., 1993), glucosa (Cuervo y col., 1999), ácidos grasos volátiles (Rijn y col., 1996), alcohol polivinílico (Watanabe y col., 1995) e incluso compuestos recalcitrantes como los productos aromáticos del petróleo (Pena-Calva y col.; Martínez y col., 2007).

La desnitrificación es sumamente dependiente de la disponibilidad de la fuente de carbono por ello es esencial que exista una relación adecuada de C/N. Se debe tener un contenido de carbono (materia orgánica) suficiente para proporcionar la energía necesaria para que las bacterias lleven a cabo la conversión de nitrato a gas nitrógeno (Metcalf y Eddy, 1995). Si en el sistema de tratamiento se realiza la desnitrificación después de la nitrificación es necesario agregar una fuente de carbono externa como por ejemplo: metanol, ácido acético, etanol, glucosa o glicerol (EPA, 2010). Un estudio en una planta piloto tipo Ludzack-Ettinger modificada, alimentada con metanol como fuente externa de carbono, presentó una relación DQO/N experimental para la desnitrificación de $7,1 \pm 0,8$ g DQO/g N, mientras que la relación estequiométrica fue de 4,2 g DQO/g N. Esta diferencia se debe a la oxidación de la materia orgánica en el reactor anóxico con el oxígeno del reciclado interno. (Carrera y col., 2004). Kuba y col (1996) sugirieron una relación DQO/N mayor que 3,4. Por otro lado, se han informado relaciones para el metanol de 4,0 a 5,0 g DQO/g $\text{NO}_3\text{-N}$ (EPA, 2010), mientras que Schmidell (2007) ha informado para metanol una relación de 3,7 g DQO/g $\text{NO}_3\text{-N}$.

4.1.2. Desnitrificación aeróbica

La desnitrificación aeróbica es un proceso biológico que ha sido poco estudiado. La desnitrificación aeróbica ocurre directamente en reactores aireados, lo que implica una gran reducción en los costos de construcción y menores requerimientos de espacio con respecto a sistemas convencionales de remoción de nitrógeno. Se ha descrito el potencial de desnitrificación aeróbica en la eliminación de nitratos mediante reactores de flujo ascendente y biofiltros aireados (Ferraz y col., 2014; Ji y col., 2015).

Los valores de temperatura para la desnitrificación aeróbica son similares a los informados para la desnitrificación tradicional. Según Ji y col. (2015) los desnitrificadores

aeróbicos tienden a funcionar eficientemente entre 25 y 37 ° C. Para *Agrobacterium* sp. LAD9 T se observó buena actividad desnitrificante a 27,9 °C (Chen y Ni, 2012). Con respecto a la relación DQO/N óptima se han informado comúnmente valores entre 5 (Huang y Tseng, 2001) y 8,3 (Kim y col, 2008; Chen y Ni, 2012).

Chen y Ni (2012) estudiaron el proceso de nitrificación heterótrofa y desnitrificación aeróbica para *Agrobacterium* sp. LAD9, encontrando las condiciones óptimas de pH= 8,4 una relación DQO/N de 8,28 y temperatura de 27,9 °C. El 40,8% del nitrógeno se utilizó para síntesis de biomasa y el 50,1% se eliminó como nitrógeno gaseoso.

Kim y col, (2008) aislaron un desnitrificador aerobio del suelo el cual fue identificado como *Pseudomonas putida* AD-21 capaz de tolerar niveles de oxígeno de 5,0–6,0mg/L durante el proceso de desnitrificación. *P. putida* AD-21 logró una eficiencia de eliminación de nitrato de 95,9% con una relación DQO/N óptima de 8 (OD= 5,0–6,0 mg/L). *P. stutzeri* KCTC 2760 eliminó hasta un 63,7% de nitrato bajo las mismas condiciones. Los resultados sugieren que *P. putida* AD-21 puede ser un buen candidato para el tratamiento aeróbico de aguas residuales.

Zhu y col (2012) informaron rendimientos de remoción de nitrógeno total entre 97 y 98% con niveles de OD entre 3 y 10 mg/L para *Pseudomonas stutzeri* sp. 1-1, *P. pseudoalcaligenes* sp. 2-3 y *P. mendocina* sp. 3-7. Huang y Tseng (2001) encontraron para *Citrobacter diversus* la mejor relación DQO/N de 5 con una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente 5 mg/L.

En el presente capítulo se presentan los ensayos realizados para mejorar la actividad desnitrificante y en consecuencia la capacidad de remoción de nitrógeno del sistema. Para ello se propone incrementar la duración total del ciclo operativo desde 6 hs hasta 12 hs así como modificar la relación temporal anóxica/aeróbica desde 1,0:1,0 hasta 0,5:1,0 con el fin de disponer de más tiempo para que tenga lugar el proceso de desnitrificación. Además se dispuso incrementar el nivel de saturación de oxígeno desde 20% hasta 60% con el propósito de reducir los fenómenos de competencia entre heterótrofos y nitrificantes por el oxígeno así como poder evaluar el efecto de mayores cargas orgánicas sobre la capacidad de desnitrificación.

4.2. Objetivos del Capítulo

El objetivo del presente capítulo consistió en mejorar la capacidad de desnitrificación bajo condiciones aeróbicas del SBR anóxico/aeróbico a partir de la utilización de las reservas intracelulares como fuente de carbono y energía. Para ello se propuso evaluar el efecto de diferentes cargas orgánicas sobre la eficiencia del proceso de desnitrificación. Por otro lado se planteó desarrollar un modelo matemático de difusión de oxígeno en el floculo así determinar si el proceso de desnitrificación que tuvo lugar en la fase aeróbica del SBR ocurrió bajo condiciones anóxicas en el interior del flóculo microbiano (desnitrificación anóxica) o en presencia de oxígeno (desnitrificación aeróbica).

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Selección de bacterias desnitrificantes. Puesta en marcha y estabilización del SBR

El SBR se inoculó con lodos activados provenientes del Ensayo OBCB los cuales se encontraban aclimatados a la fuente de carbono (acetato de sodio), siendo ésta oxidada en la fase anóxica. Dichos lodos presentaban una buena capacidad de nitrificación permitiendo inferir que la comunidad microbiana estaba altamente enriquecida en bacterias nitrificantes. Además, el sistema presentaba poca o nula actividad desnitrificante (Capítulo 3). Por estas razones, dichos lodos fueron utilizados como punto de partida para la realización de los ensayos del presente capítulo.

El SBR se operó bajo las mismas condiciones descritas para los ensayos previos con respecto al régimen anóxico/aeróbico y al uso de acetato de sodio como fuente de carbono y energía (Sección 2.1). Se definieron las nuevas condiciones de operación del SBR considerando los factores descritos en la Sección 4.1. El SBR fue operado a 25 °C, pH= 7,5 y nivel de saturación de oxígeno (NSO) de 60% (Fase aeróbica). Se incrementó la duración del ciclo del SBR desde 6 horas (Ensayo OBCB, Capítulo 3) hasta 12 horas y la relación temporal anóxica/aeróbica se redujo desde 1,0:1,0 hasta 0,5:1,0 con el fin de disponer de más tiempo para que tenga lugar el proceso de desnitrificación. Estas

condiciones fueron seleccionadas considerando que son favorables para el proceso de desnitrificación sin alterar el proceso de nitrificación previamente obtenido. La operación y sistema de control automático del reactor así como la composición del agua residual sintética utilizada se describieron en las Secciones 2.1 y 2.2.

Los cálculos utilizados en el presente Capítulo fueron explicados en los Capítulos 2 y 3.

Tabla 4.1. Condiciones operativas y cargas volumétricas para los Ensayos OACB, OACM, y OACA

Parámetros	Experimento OACB	Experimento OACM	Experimento OACA
Fase anaeróbica (min)	220	220	220
Fase aeróbica (min)	440	440	440
Sedimentación (min)	51	51	51
Purga sobrenadante (min)	9	9	9
Ciclo total (h)	12	12	12
Relación anóxica/aeróbica	0,5:1,0	0,5:1,0	0,5:1,0
Temperatura (°C)	25 ± 0,5	25 ± 0,5	25 ± 0,5
pH (Fase anóxica y aeróbica)	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1
Oxígeno (Nivel de saturación) (%)	60	60	60
Carga volumétrica de sustrato orgánico (mg DQO/(L día))	440	585	880
Carga volumétrica de nitrógeno amoniacal (mgNH ₃ -N/(L día))	44	44	44
Carga volumétrica de fósforo (mg P/(L día))	22	29	44

4.3.2. Ensayos experimentales

El SBR fue operado con sucesivos ciclos con una etapa de reacción (fase anóxica y aeróbica), seguida de la sedimentación de la biomasa y purga final del sobrenadante. En la fase anóxica, los lodos fueron agitados a velocidad constante (100 rpm); mientras que en la fase aeróbica, la velocidad se controló automáticamente a fin de mantener la concentración de oxígeno deseada (Sección 2.1). El agua residual se adicionó al reactor

en los primeros minutos de la fase anóxica; la purga de lodos se realizó al final de la fase aeróbica y la sedimentación de la biomasa y purga del sobrenadante al final del ciclo.

Se realizaron tres ensayos para evaluar el efecto de la carga volumétrica de sustrato orgánico sobre el proceso de desnitrificación y capacidad de remoción de nitrógeno:

OACB = Experimento con oxígeno alto y carga orgánica baja.

OACM = Experimento con oxígeno alto y carga orgánica media.

OACA = Experimento con oxígeno alto y carga orgánica alta.

Tabla 4.2. Agua residual sintética de los Ensayos OACB, OACM y OACA

Agua residual sintética (ARS)	Concentración (g/L)		
	ARS ₃	ARS ₄	ARS ₅
CH ₃ COONa	1,172	1,56	2,35
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,376	0,376	0,376
KH ₂ PO ₄	0,1086	0,1445	0,2173
K ₂ HPO ₄	0,0856	0,1139	0,1713
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,18	0,18	0,18
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,0285	0,0285	0,0285
Solución de elementos trazas			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15	15	15
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5	5	5
MnSO ₄ ·H ₂ O	3	3	3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,75	0,75	0,75
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,15	0,15	0,15
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,5	0,5	0,5
H ₃ BO ₃	0,1	0,1	0,1
KI	0,1	0,1	0,1

Se trabajó con diferentes cargas volumétricas de sustrato orgánico y una única carga volumétrica de nitrógeno conduciendo a una relación DQO:N:P de 100:10:5, 100:7,5:5 y 100:5:5 para los Ensayos OACB, OACM, y OACA respectivamente (Tabla 4.1). Para ello se utilizaron tres modelos de agua residual sintética: ARS₃, ARS₄, y ARS₅ (Tabla 4.2). El tiempo de residencia celular fue de 10 días y el tiempo de residencia hidráulico fue de 43,6 horas, manteniéndose estas condiciones para todos los ensayos.

En todos los ensayos se mantuvo el pH en $7,5 \pm 0,1$ durante la etapa de reacción (fases anóxica y aeróbica) para generar condiciones más favorables para las bacterias desnitrificantes. En los sistemas estudiados, el acetato fue consumido en la fase anóxica, por lo tanto no fue necesario un período de aclimatación extenso de los lodos activados a las nuevas condiciones de operación. Se requirieron 4 TRC (tiempos de residencia celular) para lograr un estado estable de cada sistema definido por una velocidad constante de consumo de acetato.

4.3.2.1. Resultados del Ensayo OACB

El SBR presentó 2 ciclos por día y fue operado con una relativamente baja carga orgánica (440 mg DQO/(L día)). El SBR fue alimentado con el agua residual sintética ARS₃ (Tabla 4.2). Las cargas volumétricas de nitrógeno y fósforo fueron 44 mg NH₃-N/(L día) y 22 mg P/(L día) respectivamente, conduciendo a una relación DQO:N:P= 100:10:5 (Tabla 4.1). Cabe destacar que las cargas volumétricas de sustrato orgánico, nitrógeno y fósforo fueron idénticas a las utilizadas en el Ensayo OBCB.

El sistema en estado estacionario alcanzó una biomasa de 1125 ± 66 mg DQO_B/L y el sustrato orgánico fue eliminado en su totalidad en la fase anóxica. El ORP durante todo el ciclo se mantuvo en valores positivos (+ 187-199 mV). Se oxidó alrededor del 85 % del amoníaco que ingresó en la fase aeróbica y el 15% restante fue asimilado por bacterias heterótrofas. Los valores de VNV= 3,71 mg NH₃-N/(L h) y VNE= 4,14 mg NH₃-N/(g SSV h) fueron similares a los correspondientes al Ensayo OBCB. En el ensayo OACB, no tuvo lugar el proceso SND. Alrededor del $55 \pm 3\%$ del nitrato generado se eliminó por desnitrificación con VDNV= 2,53 mg NO₃⁻-N/(L h) y VDNE= 2,94 mg NO₃⁻-N/(g SSV h) (Tabla 4.3). Nitrito no fue detectado en ninguna de las fases del SBR (Fig. 4.1). El

efluente final presentó una concentración de Ni de $5,95 \pm 0,28$ mg N/L, lo que implicó una descarga media de 3,57 mg N/día. Se puede observar que el proceso de desnitrificación (DN) junto con la asimilación de nitrógeno heterotrófica condujo a una eliminación de nitrógeno inorgánico del $67 \pm 2\%$ (Tabla 4.3, Fig. 4.1)

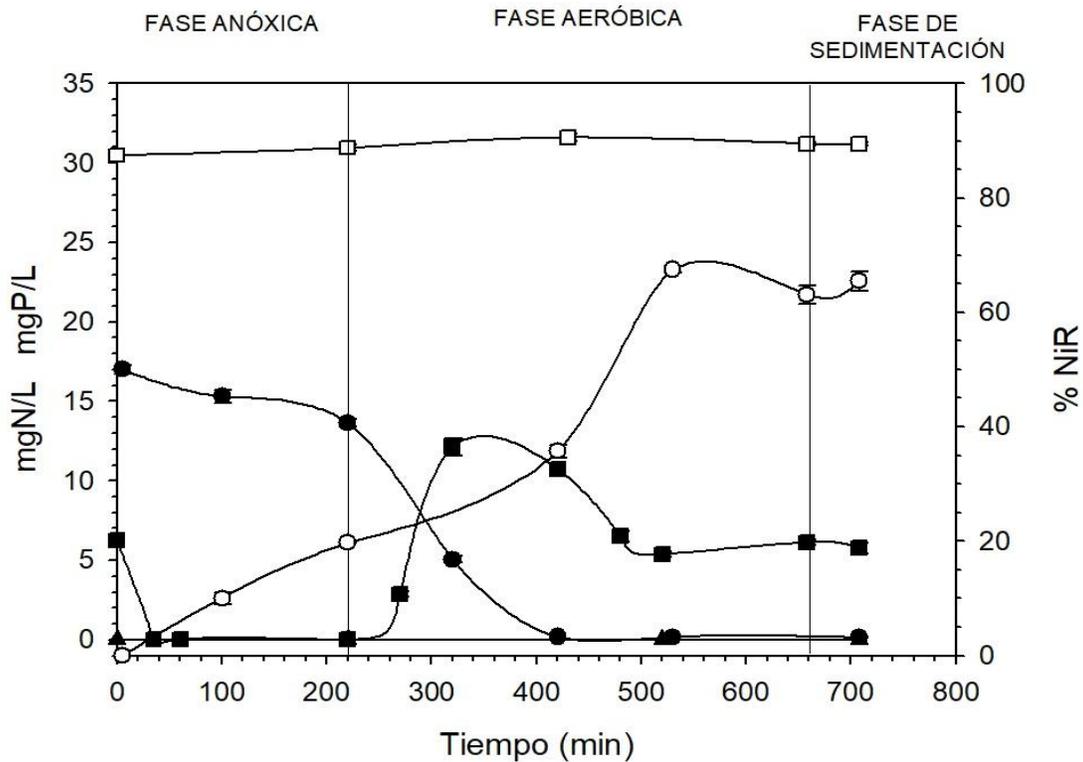


Figura 4.1. Remoción de especies químicas de nitrógeno y fósforo durante un ciclo de operación del SBR (Ensayo OACB). (□) Ortofosfato (PO₄-P, mg P/L); (●) N amoniacal (NH₃-N, mg N/L); (■) Nitrato (NO₃⁻-N, mg N/L); (▲) Nitrito (NO₂⁻-N, mg N/L); (○) % Remoción de N inorgánico (%NiR).

La eliminación de Ni durante el ensayo OACB fue aproximadamente 1,5 veces mayor que la lograda en el Ensayo OBCB (ver Capítulo 3). La mayor eliminación de nitrógeno inorgánico se atribuyó a una mayor actividad desnitrificante en el Ensayo OACB. La mejoría observada en el proceso de desnitrificación del presente ensayo puede atribuirse a una mayor extensión de la fase aeróbica.

Tabla 4.3. Parámetros físico-químicos y biológicos

Parámetros		Experimento OACB	Experimento OACM	Experimento OACA
Relación DQO:N:P ^a		100:10:5	100:7,5:5	100:5:5
TRC (días) ^b		10	10	10
TRH (horas) ^c		43,6	43,6	43,6
DQO _B ^d (mg DQO _B /L)		1125 ± 66	2082 ± 30	4004 ± 90
Fase anóxica	OD ^e (mg/L)	0	0	0
	ORP ^f (mV)	187 ± 13	176 ± 12	171 ± 10
Fase aeróbica	OD ^e (mg/L)	5,5 ± 1,2	4,3 ± 0,2	3,9 ± 0,3
	ORP ^f (mV)	199 ± 9	180 ± 13	175 ± 5
	VNV ^g (mg NH ₃ -N/(L h))	3,71 ± 0,45	6,52 ± 0,76	4,09 ± 0,08
	VNE ^h (mg NH ₃ -N/(g SSV h))	4,14 ± 0,48	4,1 ± 0,44	1,33 ± 0,0
	VDNV ⁱ (mg NO ₃ ⁻ -N/(L h))	2,53 ± 0,96	3,73 ± 0,79	2,57 ± 0,36
	VDNE ^j (mg NO ₃ ⁻ -N/(gSSV h))	2,94 ± 1,1	2,34 ± 0,5	0,83 ± 0,1
	% NAS ^k	10,0 ± 1,0	16,7 ± 2,74	28,7 ± 0,5
	% SND ^l	0 ± 0	0 ± 0	9 ± 2
	% DN ^m	55 ± 3	61 ± 5	57 ± 2
	Ciclo total	% AR ⁿ	99 ± 1	99 ± 1
% NiR ^o		67 ± 2	70 ± 4	78 ± 1

a: relación entre la demanda química de oxígeno, nitrógeno y fósforo, **b:** tiempo de residencia celular, **c:** tiempo de residencia hidráulico, **d:** concentración de biomasa, **e:** concentración de oxígeno disuelto, **f:** potencial de óxido reducción, **g:** velocidad de nitrificación volumétrica, **h:** velocidad de nitrificación específica, **i:** velocidad de desnitrificación volumétrica, **j:** velocidad de desnitrificación específica, **k:** porcentaje de nitrógeno asimilado por bacterias heterótrofas, **l:** porcentaje de nitrificación y desnitrificación simultánea, **m:** porcentaje de desnitrificación, **n:** porcentaje de amonio removido, **o:** porcentaje de nitrógeno inorgánico removido.

4.3.2.2. Resultados del Ensayo OACM

El SBR presentó las mismas condiciones de operación del Ensayo OACB, excepto la mayor carga orgánica que fue de 585 mg DQO/(L día) y la de fósforo que fue de 29 mg P/(L día) respectivamente (Tabla 4.1). El SBR fue alimentado con el agua residual sintética ARS₄ (Tabla 4.2). Los factores ambientales mantuvieron la temperatura del reactor a 30 °C durante todos los ciclos de este ensayo. Teniendo en cuenta los resultados del ensayo previo, se planteó que el proceso de desnitrificación estuvo probablemente limitado en carbono intracelular durante la fase aeróbica. Por lo tanto se incrementó la carga orgánica conduciendo a una incremento de la relación DQO:N desde 100:10 hasta 100:7,5 (Tabla 4.1).

En condiciones de estabilidad se alcanzó una concentración de biomasa de 2082 ± 30 mg DQO_B/L. En la fase anóxica, el sustrato orgánico fue consumido totalmente y el nitrato residual proveniente del ciclo anterior fue rápidamente desnitrificado. Las condiciones oxidantes fueron similares a las registradas en el Ensayo OACB, conservándose los valores positivos de ORP. La eliminación de amonio fue del 100% sin observarse acumulación de nitrito en ningún momento del ciclo operativo (Fig. 4.2). Se determinaron valores de VNV= 6,52 mg NH₃-N/(L h) y VNE= 4,1 mg NH₃-N/(g SSV h). Esta velocidad de nitrificación específica fue similar a la obtenida en el ensayo previo. No se desarrolló el proceso SND, mientras que el porcentaje de desnitrificación fue del $61 \pm 5\%$ con una VDNV= 3,73 mg NO₃⁻-N/(L h) y una VDNE= 2,34 mg NO₃⁻-N/(g SSV h) (Tabla 4,3).

La concentración de Ni en el efluente final fue de $4,83 \pm 0,28$ mg N/L con una descarga media de 2,9 mg N/día y una eliminación de nitrógeno inorgánico del 70% (Fig. 4.2).

Cabe destacar que el incremento de la carga orgánica desde 440 hasta 585 mg DQO/(L día), es decir 1,3 veces mayor al Ensayo OACB, no mejoró significativamente la capacidad de desnitrificación del sistema. En consecuencia la remoción de nitrógeno inorgánico fue similar a la obtenida en el ensayo previo.

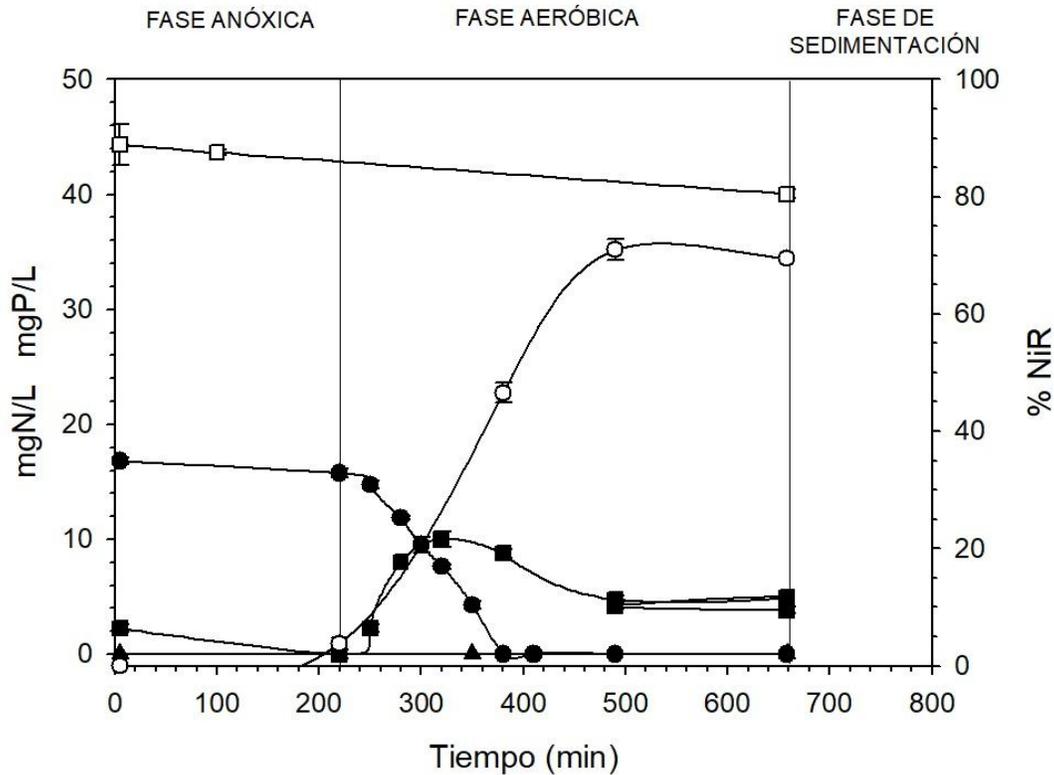


Figura 4.2. Remoción de especies químicas de nitrógeno y fósforo durante un ciclo de operación del SBR (Ensayo OACM). (□) Ortofosfato (PO₄-P, mg P/L); (●) N amoniacal (NH₃-N, mg N/L); (■) Nitrato (NO₃⁻-N, mg N/L); (▲) Nitrito (NO₂⁻-N, mg N/L); (○) % Remoción de N inorgánico (%NiR).

En condiciones de estado estable se determinó la concentración de carbohidratos totales (CT) de la biomasa, mediante el método de antrona descrito en la Sección 2.8, a lo largo del ciclo de operación de reactor. La concentración de CT aumentó ligeramente durante la fase anóxica y etapa inicial de la fase aeróbica y luego se mantuvo relativamente constante (Fig. 4.3). Estos cambios de CT no pueden atribuirse a los cambios cíclicos del glucógeno intracelular típicos de reactores con fases anaeróbica/aeróbica. En dichos sistemas, la comunidad microbiana se encuentra enriquecida con GAOs (organismos acumuladores de glucógeno) y/o PAOs (organismos acumuladores de polifosfatos), los cuales son responsables de la degradación y síntesis de glucógeno durante las etapas anaeróbica y aeróbica respectivamente. En el caso de GAOs, el glucógeno constituye la fuente primaria de energía para el consumo de carbono orgánico exógeno y síntesis de PHAs durante la etapa anaeróbica inicial (Oehmen y col., 2007; Muszyński y col., 2013). Luego, se genera el glucógeno a partir del PHA durante la

fase aeróbica. En el SBR anóxico/aeróbico bajo las condiciones del presente ensayo, GAOs con morfología tipo tétradas fueron observados por microscopía y tinción PHA positiva. No obstante, de acuerdo a los cambios de CT observados en Fig. 4.3, puede concluirse que el metabolismo GAO no fue el fenotipo microbiano representativo del sistema. Los cambios de CT pueden estar asociados principalmente al crecimiento microbiano, si bien no puede descartarse una mínima acumulación de glucógeno durante la fase anóxica. Estos resultados pueden atribuirse a las condiciones oxidantes prevalentes en la etapa anóxica causadas por la elevada transferencia de oxígeno durante la agitación.

Basado en este análisis puede inferirse que el proceso de desnitrificación observado en el Ensayo OACM se llevó a cabo a partir de las reservas intracelulares de PHA.

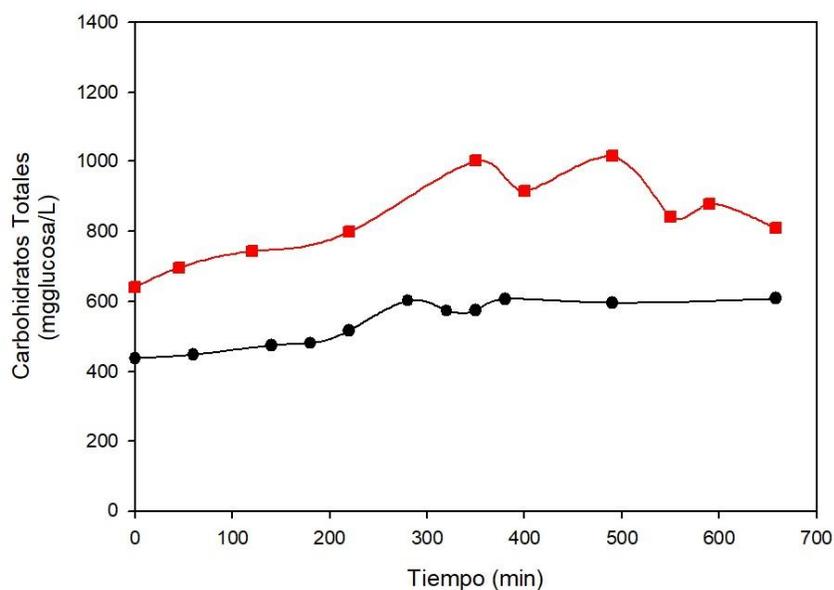


Figura 4.3. Cambio en la concentración de carbohidratos totales (mg glucosa/L) durante un ciclo de operación del SBR. (●) Ensayo OACM. (■) Ensayo OACA.

4.3.2.3. Resultados del Ensayo OACA

En este ensayo se incrementó la carga orgánica desde 585 hasta 880 mg DQO/(L día), mientras que la carga de nitrógeno amoniacal se mantuvo constante (44 mg NH₃-N/(L día)), conduciendo a un incremento de la relación DQO:N desde 100:7.5 hasta 100:5. La carga volumétrica de fósforo fue 29 mg P/(L día). Las demás condiciones operativas fueron idénticas a las utilizadas en los ensayos previos OACB y OACM (Tabla 4.1). El SBR fue alimentado con el agua residual sintética ARS₅ (Tabla 4.2).

En estado estable, la biomasa se estabilizó en 4004 ± 90 mg DQO_B/L; en la fase anóxica el sustrato orgánico fue consumido totalmente y el nitrato residual proveniente del ciclo anterior fue desnitrificado rápidamente. La eliminación de amonio fue del 100%, mientras que no se encontró acumulación de nitrito en ningún momento del ciclo (Fig. 4.4). Las condiciones oxidantes fueron similares a las presentes en los Ensayos OACB y OACM, con valores positivos de ORP. Se registraron valores de VNV= 4,09 mg NH₃-N/(L h) y VNE= 1,33 mg NH₃-N/(g SSV h) (Tabla 4.3). Esta velocidad de nitrificación específica fue significativamente más baja que la correspondiente al Ensayo OACM. Este resultado fue atribuido al enriquecimiento en microorganismos heterótrofos debido a la mayor carga orgánica, lo que condujo a una concentración de biomasa que duplicó a la obtenida en el ensayo previo.

El proceso SND presentó escaso desarrollo ($9 \pm 2\%$). El porcentaje de desnitrificación fue similar al obtenido en los ensayos previos OACB y OACM, con una VDNV= 2,57 mg NO₃-N/(L h) y una VDNE= 0,83 mg NO₃-N/(g SSV h) (Tabla 4.3). Esta velocidad de desnitrificación específica fue significativamente menor a la observada en los ensayos previos (OACB y OACM).

La concentración de Ni en el efluente final fue de $3,8 \pm 0,28$ mg N/L con una descarga media de 2,2 mg N/día y una eliminación de nitrógeno inorgánico del 78 % (Fig. 4.4). La remoción de Ni fue significativamente mayor a la observada en los ensayos previos (OACB y OACM).

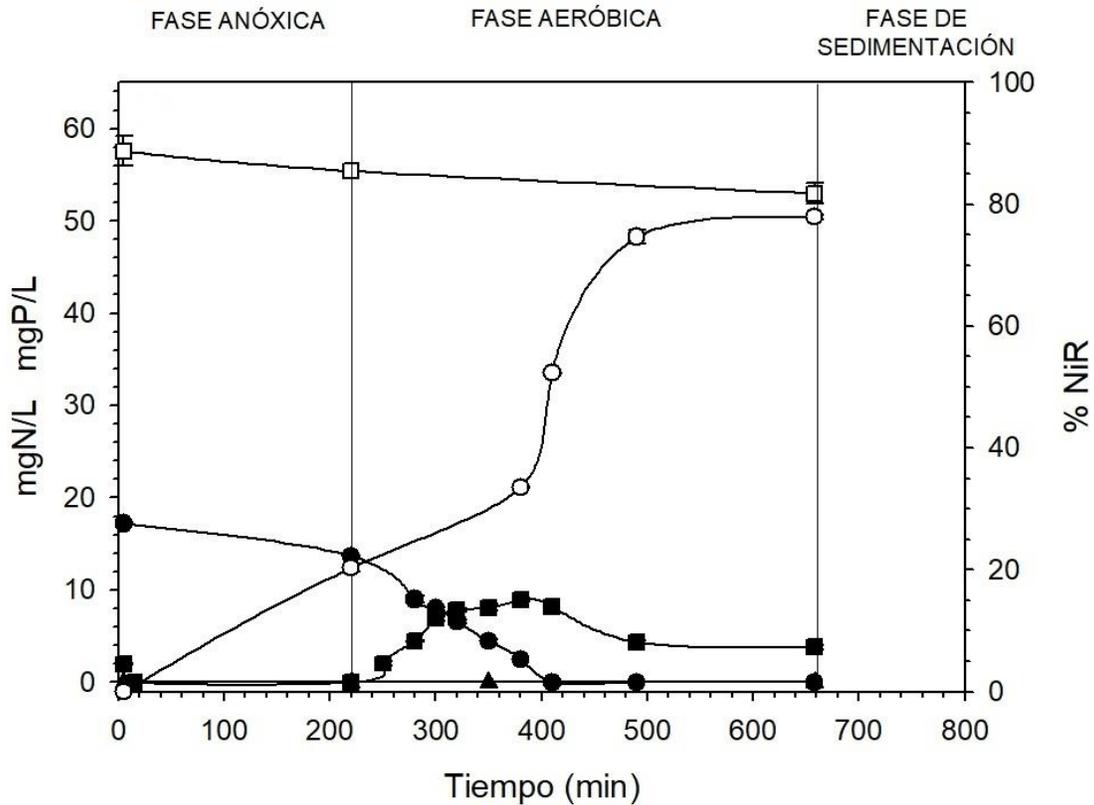


Figura 4.4. Remoción de especies químicas de nitrógeno y fósforo durante un ciclo de operación del SBR (Ensayo OACA). (□) Ortofosfato (PO₄-P, mg P/L); (●) N amoniacal (NH₃-N, mg N/L); (■) Nitrato (NO₃⁻-N, mg N/L); (▲) Nitrito (NO₂⁻-N, mg N/L); (○) % Remoción de N inorgánico (%NiR).

La concentración de carbohidratos totales aumentó gradualmente durante las primeras 6,5 hs del ciclo operativo (fase anóxica y etapa inicial de la fase aeróbica) y luego disminuyó ligeramente hacia el final del ciclo (Fig. 4.3). De manera semejante a lo observado en el Ensayo OACM, estos cambios de CT no pueden atribuirse a los cambios cíclicos del componente glucógeno intracelular característicos de reactores operados con fases anaeróbica/aeróbica. No obstante, el leve descenso de CT al final de la fase aeróbica puede vincularse al decaimiento de glucógeno que pudo ser utilizado como fuente de carbono y energía por bacterias desnitrificantes.

En el presente ensayo, la desnitrificación en fase aeróbica fue llevada a cabo principalmente a partir de las reservas endógenas de PHA. No obstante, el glucógeno intracelular pudo contribuir al proceso de desnitrificación pero en menor grado.

4.4. Modelado Matemático de la difusión de oxígeno en el flóculo

Diferentes estudios han demostrado que la desnitrificación tradicional se puede dar con niveles de oxígeno relativamente altos; generalmente se presenta en sistemas de lodos activados con flóculos de gran tamaño ($>125 \mu\text{m}$), donde el centro del flóculo presenta una zona anóxica y en su exterior una zona aeróbica (Li y Ganczarzyk, 1990, 1993; Pochana y Keller, 1999). La extensión de la zona anóxica depende del tamaño de los flóculos (Fig. 4.5)

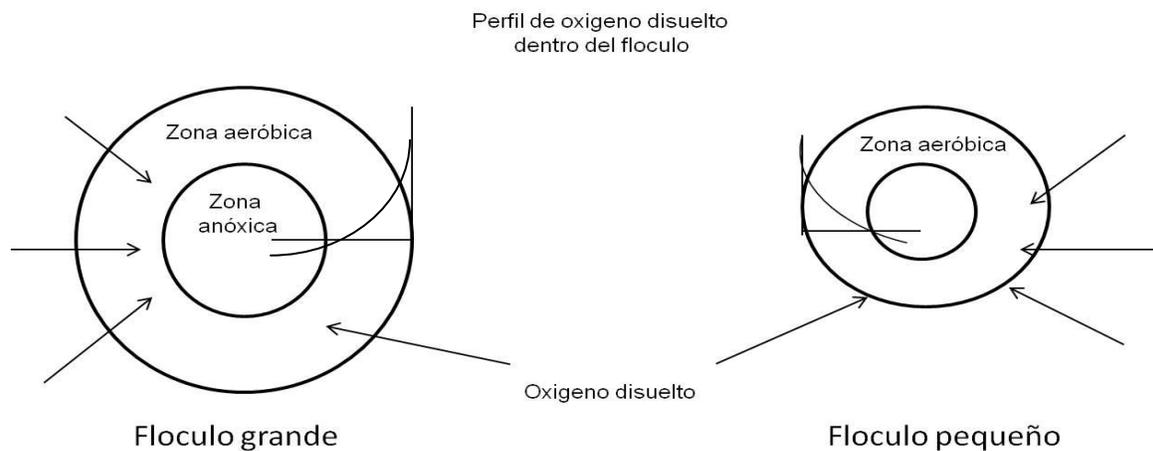


Figura 4.5. Influencia del tamaño del flóculo sobre el radio de la zona aeróbica y anóxica.

Adaptado de Pochana y Keller (1999)

4.4.1. Resolución de las ecuaciones diferenciales

Para modelar matemáticamente los perfiles de concentración de oxígeno ($\text{CA mgO}_2 \text{ cm}^{-3}$) en los flóculos del reactor de lodos activados se aplicó la segunda ley de Fick considerando el flóculo de geometría esférica (radio= R) en estado estacionario, y suponiendo un consumo de oxígeno por parte de los microorganismos que forman el

flóculo que se representa por Q_{O_2} (g O_2 /(m³ h)) (se supone consumo de orden cero) de acuerdo con:

$$D_{O_2} \left(\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dC_A}{dr} \right) \right) = Q_{O_2} \quad (4.1)$$

donde D_{O_2} es el coeficiente de difusión del oxígeno en el flóculo (m² s⁻¹)

Si se desarrolla en la ecuación 4.1 la derivada del producto resulta:

$$D_{O_2} \left(\frac{d^2 C_A}{dr^2} + \frac{dC_A}{dr} \frac{2}{r} \right) = Q_{O_2} \quad (4.2)$$

Las condiciones de contorno del problema son:

$C_A = C_{AS}$ (concentración de oxígeno disuelto en el reactor= 5,5 10⁻³ mgO₂ cm⁻³)
en $r = R$ (interfase flóculo-líquido)

$dC_A/dr = 0$ en $r=0$ (condición de simetría en el centro del flóculo esférico)

Introduciendo un cambio de variables $u = C_A \cdot r$ se obtiene la siguiente ecuación diferencial

$$D_{O_2} \left(\frac{d^2 u}{dr^2} \right) \frac{1}{r} = Q_{O_2} \quad (4.3)$$

Luego de integrar la ecuación 4.3 y retornando a las variables originales se obtiene la solución de la ecuación diferencial original que conduce al siguiente perfil de concentraciones de oxígeno en el flóculo esférico:

$$C_A = C_{AS} - \frac{Q_{O_2}(R^2 - r^2)}{6D_{O_2}} \quad (4.4)$$

A partir del perfil se puede determinar la concentración de oxígeno en el centro del flóculo ($r=0$):

$$CA = CAS - \frac{Q_{O_2}(R^2)}{6DO_2} \quad (4.5)$$

Para estimar el perfil de oxígeno CA deben introducirse en la ecuación 4.4 los valores experimentales de consumo de oxígeno (Q_{O_2}) y el coeficiente de difusión DO_2 .

4.4.2. Medición de la velocidad de consumo de oxígeno

La velocidad de consumo de oxígeno (VCO) $mgO_2/(L h)$ se determinó a través de mediciones de concentración porcentual de oxígeno disuelto (respirometría cerrada) utilizando un electrodo polarográfico (ver Capítulo 2). El electrodo se calibró previamente al 100% de saturación de oxígeno en agua destilada y a la temperatura de trabajo. Para ello se procedió en la fase aeróbica a detener el suministro de aire en el reactor, registrándose medidas cada 20 segundos durante 3 minutos. La VCO se calculó a partir de la pendiente de la curva de decaimiento de oxígeno disuelto en función del tiempo.

El porcentaje de oxígeno se registró para el cultivo mixto del experimento OACM, descrito en el presente Capítulo, bajo las siguientes condiciones: temperatura de 28 °C, concentración de biomasa de 2,1 g DQO_B/L , velocidad de agitación= 100 rpm, pH = 7,5. El registro se tomó de manera automática mediante el sistema de control del SBR; el procedimiento se repitió a diferentes tiempos durante toda la fase aeróbica.

Para convertir la respuesta del electrodo registrada como % de OD a concentración en mgO_2/L , se empleó un valor de solubilidad del oxígeno en agua de 7,75 mgO_2/L a 28°C y 1 atm de presión. La concentración de oxígeno disuelto se calculó a partir de la ecuación 4.6.

$$OD (mgO_2/L) = \text{Lectura del sensor (\%)} * 7,75 mgO_2/L / 100 \quad (4.6)$$

En la figura 4.6 se muestra la velocidad de consumo de oxígeno para el experimento OACM. La velocidad específica de consumo de oxígeno se determinó a través de la siguiente expresión:

$$q_{O_2} = \frac{VCO}{X} \quad (4.7)$$

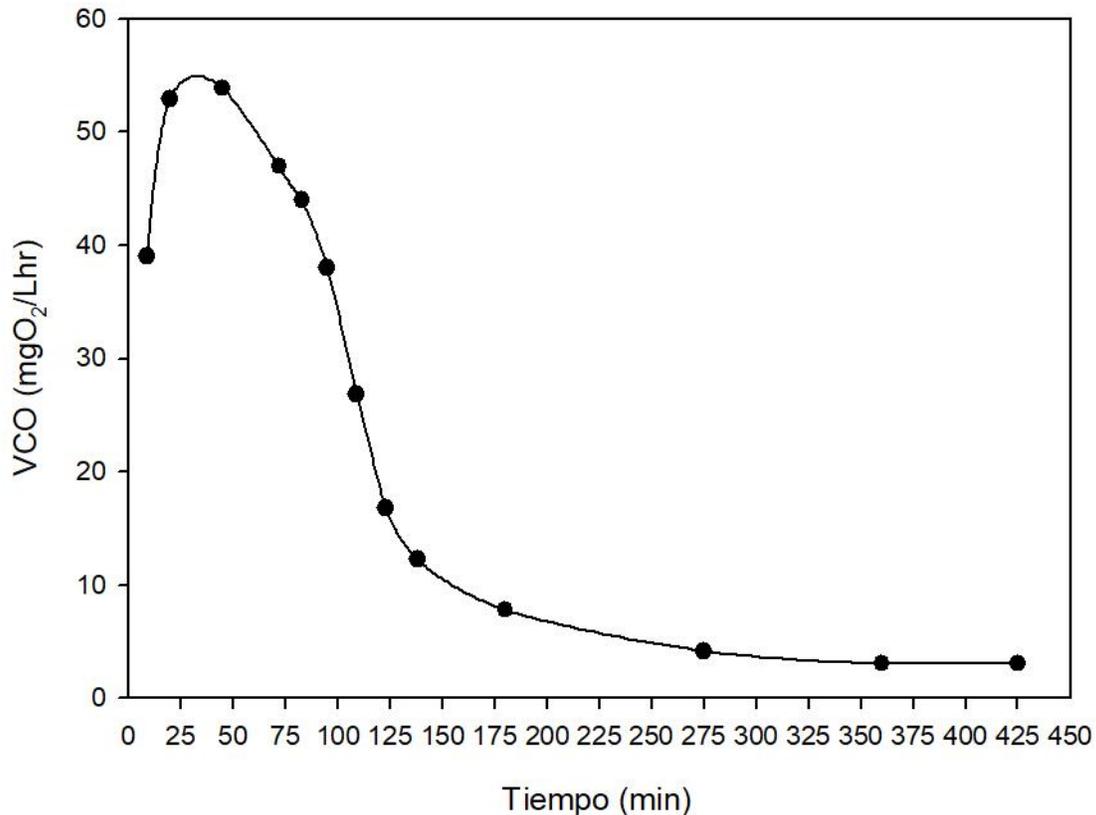


Figura. 4.6. Velocidad de consumo de oxígeno durante la fase aeróbica

Donde q_{O_2} es la velocidad específica del consumo de oxígeno ($mgO_2/(gDQO_B h)$) y X es la concentración de biomasa ($gDQO_B/L$).

Los valores de q_{O_2} ($mgO_2/(g DQO_B h)$) se muestran en la Tabla 4.4.

Para poder utilizar este dato de q_{O_2} en la ecuación 4.4, en la cual q_{O_2} debe estar expresada por cm^3 de flóculo ($Q_{O_2}, mgO_2/(cm^3 h)$), se tuvo en cuenta que la concentración de biomasa de los lodos activados era de $2,1 gDQO_B/L$. Se consideró además un valor

medio de la densidad de la biomasa $\rho = 50 \text{ mg/cm}^3$ de acuerdo a Beccari y colaboradores (1992).

Se tiene además como dato el siguiente factor para la biomasa = $1,3 \text{ g DQO}_B/\text{g SSV}$.

Los valores de q_{O_2} se afectaron por la densidad de la biomasa $\rho = 50 \text{ mg/cm}^3$ y por el factor $1,3 \text{ g DQO}_B/\text{g SSV}$ obteniéndose para el caso más desfavorable de máximo consumo de oxígeno ($25,66 \text{ mgO}_2/(\text{g DQO}_B \text{ h})$) un valor de $Q_{O_2} = 1,667 \text{ mgO}_2/(\text{cm}^3 \text{ h})$.

Tabla 4.4. Velocidad volumétrica y específica de consumo de oxígeno en el reactor

Tiempo (min)	VCO ($\text{mgO}_2/(\text{Lh})$)	q_{O_2} ($\text{mgO}_2/(\text{gDQO}_B \text{ h})$)
9	39,06	18,6
20	52,89	25,18
45	53,9	25,66
72	46,98	22,37
83	43,97	20,98
95	38,05	18,11
10	26,8	12,76
123	16,79	7,99
138	12,27	5,84
180	7,81	3,71
275	4,16	1,98
360	3,06	1,45
425	3,07	1,46

4.4.3. Medición de tamaño del flóculo por observación microscópica

Se tomaron 2 alícuotas de $30 \mu\text{L}$ del SBR. Las muestras fueron extendidas sobre portaobjetos de vidrio para microscopía y cubiertas con cubreobjetos. Los preparados fueron observados con un microscopio óptico Leica DMLB (Alemania) con cámara fotográfica incorporada (Fig. 2.7). Se tomaron 500 micrografías de diferentes campos de observación de los preparados microscópicos (Fig. 4.7a). Para la determinación del diámetro de los flóculos microbianos se utilizó el software de análisis de imágenes Image-

Pro Plus 6.0. Para su calibración se empleó un portaobjetos con una escala micrométrica (1 mm) con una graduación de 1/100 mm (Fig. 4.7b).

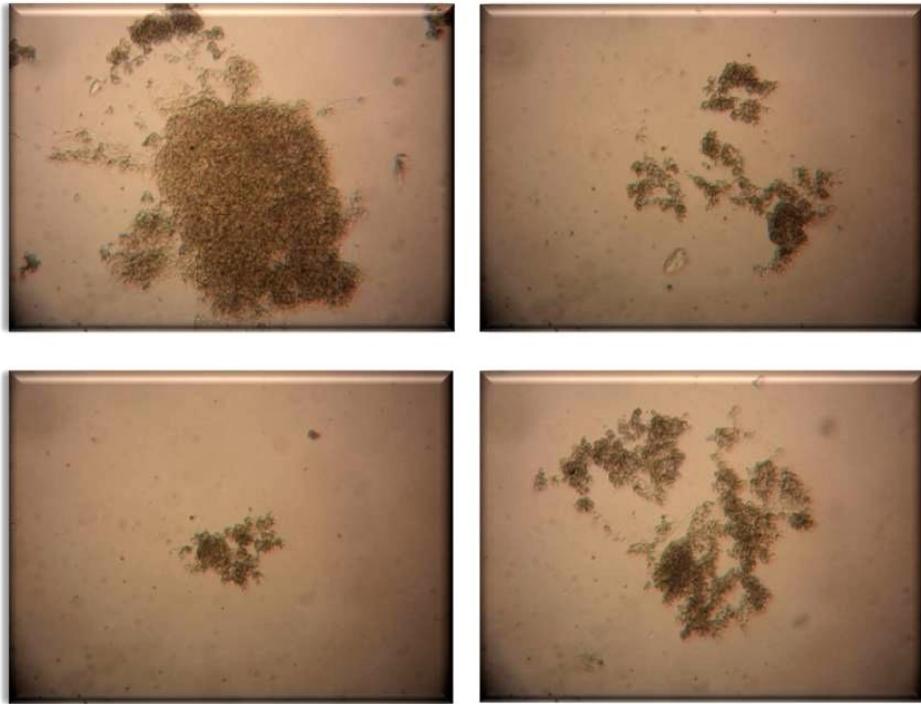


Figura 4.7a. Micrografías de lodos activados

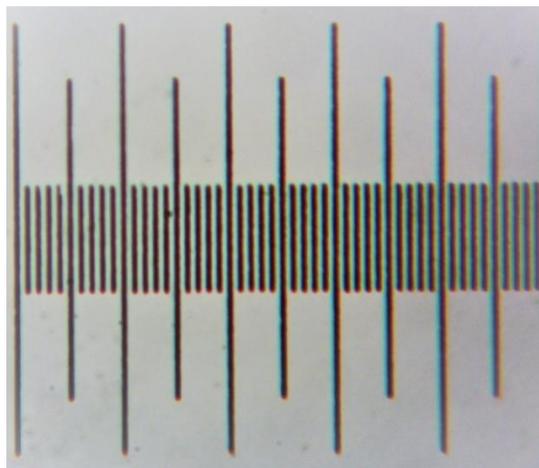


Figura 4.7b. Portaobjeto con escala micrométrica 1/100 mm

4.4.3.1. Distribución de tamaño de flóculos

El estudio del tamaño de los flóculos se realizó mediante el análisis de micrografías. De un total de 500, fueron escogidas 252 micrografías para ser analizadas con el software Image-Pro Plus 6.0. Para ello se seleccionaban los flóculos y se determinaba su radio medio de manera automática.

Para determinar la frecuencia de las muestras se utilizó el método de Sturges, el cual es un método empírico muy utilizado en la estadística descriptiva para determinar el número de clases que deben existir en un histograma de frecuencias.

$$k = 1 + 3,322 * \log_{10}(N) \quad (4.8)$$

Donde:

K = número de clases

N = número total de observaciones de la muestras

Log₁₀ = logaritmo común en base 10

La amplitud se define mediante la siguiente expresión:

$$a = \frac{(\text{limite superior} - \text{limite inferior})}{K} \quad (4.9)$$

Donde:

a = amplitud

k = número de clases

En las tablas 4.5 y 4.6 se presentan los parámetros y el análisis de frecuencias del tamaño de los flóculos respectivamente. En la Figura 4.8 se presenta el histograma correspondiente.

Tabla 4.5. Parámetros para el análisis de frecuencias

Radio máximo	Radio mínimo	Radio promedio	Numero de datos	Rango	Numero de clases	Amplitud
172,5 μm	9 μm	38,7 μm	252	163,5 μm	9	18,2 μm

Tabla 4.6. Análisis de frecuencias del tamaño de los flóculos de lodos activados

Clase	Intervalo de clase		mi	ni	Ni	fi	Fi
	Límite inferior	Límite superior					
1	9	27,2	18,1	91	91	0,36	0,36
2	27,2	45,3	36,3	78	169	0,31	0,67
3	45,3	63,5	54,4	54	223	0,21	0,88
4	63,5	81,7	72,6	20	243	0,08	0,96
5	81,7	99,8	90,8	4	247	0,02	0,98
6	99,8	118,0	108,9	3	250	0,01	0,99
7	118,0	136,2	127,1	0	250	0,00	0,99
8	136,2	154,3	145,3	0	250	0,00	0,99
9	154,3	172,5	163,4	2	252	0,01	1,00

donde m_i es la marca de clase, n_i es la frecuencia, N_i es la frecuencia absoluta acumulada, f_i es la frecuencia relativa, F_i frecuencia relativa acumulada.

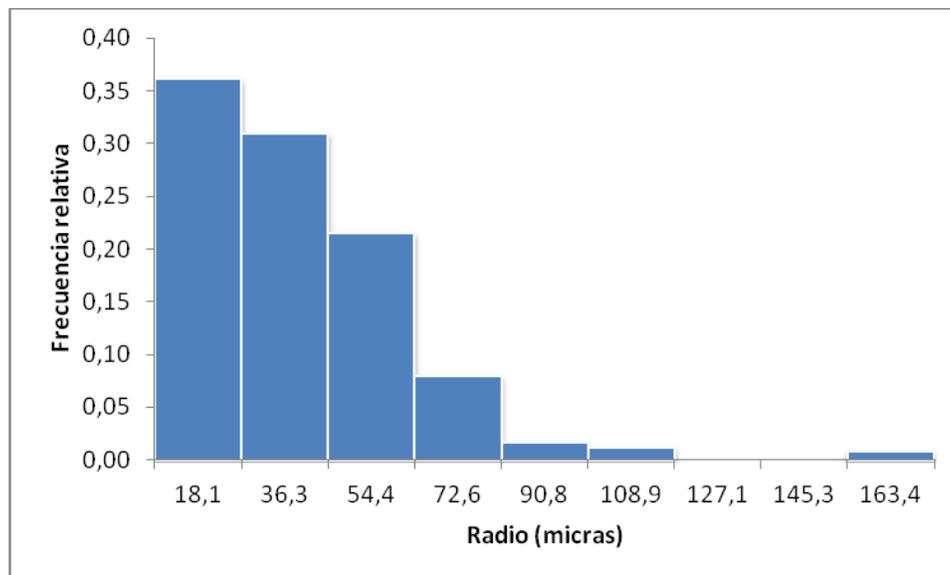


Figura 4.8. Histograma de tamaños de flóculo

4.5. Perfiles de concentración de oxígeno en el flóculo

Experimentalmente se determinó las distribución de tamaños de los flóculos con valores máximos de radios de los flóculos $R=172,5 \mu\text{m}$ y mínimos de $R=9 \mu\text{m}$. La máxima frecuencia en la distribución corresponde a $R=18,1 \mu\text{m}$ (Tabla 4.6, Fig. 4.8).

La concentración de oxígeno en la superficie del flóculo CAS fue $5,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$. Para estimar el coeficiente de difusión de oxígeno se adoptó el valor $Do_{2\text{-flóculo}}=1,025 \text{ cm}^2/\text{dia}$ sugerido por Daigger y col. (2007). El consumo máximo de oxígeno fue $Q_{O_2}=1,667 \text{ mg O}_2 /(\text{cm}^3 \text{ h})$ (Sección 4.4.2).

Se muestran a continuación el perfil de concentraciones de oxígeno en función del radio adimensional r/R para un flóculo del mayor tamaño $R=172,5 \mu\text{m}$ con el mayor consumo de oxígeno y también para un flóculo de radio $R=18,1 \mu\text{m}$ (que corresponde a la mayor frecuencia en la distribución de tamaños) (Figura 4.9).

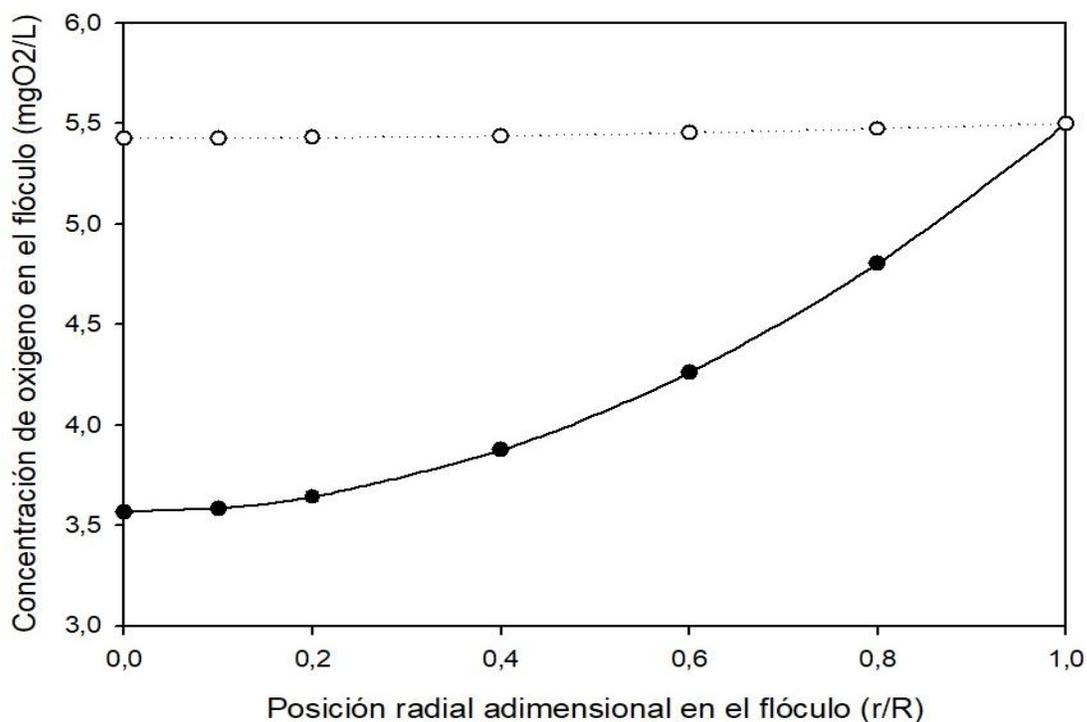


Figura 4.9. Perfil de concentración de oxígeno en el flóculo. ○ flóculo de radio= $18,1 \mu\text{m}$ ● flóculo de radio= $172,5 \mu\text{m}$

Los resultados muestran que para el flóculo cuyo radio corresponde a la máxima frecuencia (18,1 micrones) no hay gradientes de concentración de oxígeno, registrándose en el centro la misma concentración que en la interfase ($CAS = 5,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$).

Aun en el caso del máximo tamaño de flóculo, la concentración de oxígeno en el centro del mismo es de $3,6 \text{ mgO}_2/\text{L}$, lo que demuestra que en el proceso predominan las condiciones aeróbicas en el flóculo.

4.6. Discusión de los resultados

En el presente capítulo se ha evaluado el efecto de la carga orgánica sobre el proceso de desnitrificación a partir de fuente de carbono intracelular en condiciones aeróbicas. El SBR fue operado con régimen anóxico/aeróbico con el propósito de lograr los procesos de nitrificación y desnitrificación conjuntamente en la fase aeróbica. Por ello resulta sumamente importante mantener el sistema estable y en condiciones operativas óptimas para lograr un proceso eficiente de remoción de nitrógeno.

En todos los ensayos el sustrato orgánico externo se agotó en la fase anóxica y no se utilizaron pulsos de fuente de carbono extracelular en la fase aeróbica, por lo tanto el carbono utilizado para la desnitrificación en condiciones aeróbicas provino de reservas intracelulares. Esto fue comprobado mediante tinciones específicas para PHA, con Sudan Black, que demostraron acumulación de este biopolímero en la fase anóxica y posterior oxidación en la fase aeróbica. Otra posible reserva intracelular en estos sistemas corresponde al glucógeno. No obstante, la concentración de glucógeno no pudo ser estimada mediante la determinación de la concentración de carbohidratos totales (CT) utilizando el método de antrona, pues el incremento observado en CT durante la fase anóxica y etapa inicial de la fase aeróbica correspondió principalmente al crecimiento de la biomasa microbiana (OACM y OACA). En la etapa anóxica no puede descartarse una leve acumulación de glucógeno intracelular; no obstante no pudo corroborarse con la técnica utilizada. En base a este análisis, el proceso de desnitrificación en el Ensayo OACM ocurrió probablemente a partir de las reservas intracelulares de PHA. En el caso del Ensayo OACA, se apreció una leve disminución de CT al final de la fase aeróbica probablemente asociada al decaimiento de glucógeno por actividad desnitrificante. En

consecuencia en este último ensayo, la desnitrificación en fase aeróbica pudo ocurrir principalmente a partir de PHA y en menor medida de glucógeno.

El porcentaje y velocidad de desnitrificación así como la remoción de nitrógeno inorgánico alcanzada en el Ensayo OACM ($70 \pm 4\%$) fueron similares a las del Ensayo OACB ($67 \pm 2\%$). Estos resultados permiten inferir que el incremento de la carga orgánica desde 440 hasta 585 mg DQO/(L día) no generó a una mejoría en la remoción de Ni.

Sin embargo una mayor carga orgánica (880 mg DQO/(L día) (Ensayo OACA) condujo a una remoción de Ni ($78 \pm 1\%$) significativamente mayor a la obtenida en los ensayos previos. Cabe destacar que la mayor carga orgánica generó una mayor producción de PHA, según pudo estimarse mediante balances de materia, implicando una mayor disponibilidad de fuente de carbono endógena para que tenga lugar el proceso de desnitrificación. No obstante, la mayor eficiencia de remoción de nitrógeno inorgánico obtenida bajo condiciones de relativamente alta carga orgánica fue atribuida a una mayor asimilación de nitrógeno por bacterias heterótrofas (Tabla 4.3).

A partir de estos resultados se puede concluir que no hubo una limitación de carbono intracelular en el proceso de desnitrificación que tuvo lugar bajo condiciones aeróbicas.

En sistemas operados con régimen feast/famine, DPAO y DGAO tienen la capacidad de desnitrificar usando reservas intracelulares de carbono. En el SBR anóxico/aeróbico y bajo las condiciones operativas utilizadas en todos los ensayos del presente Capítulo (OACB, OACM, OACA) se detectaron microscópicamente microorganismos GAO con morfología tipo tétradas y tinción PHA positiva. Sin embargo, no fue observado el metabolismo típico de los GAOs con respecto al ciclado de glucógeno intracelular dado por la degradación y síntesis en fases anóxica y aeróbica respectivamente. En consecuencia, la actividad GAO no fue el proceso metabólico dominante en este sistema, es decir que el fenotipo GAO no fue representativo del mismo. Tampoco se observó actividad PAO, siendo las tinciones de poli-P negativas. La ausencia de PAO fue asociada a las condiciones oxidantes durante la fase anóxica más que a la competencia entre PAO-GAO. Basado en este análisis, se puede postular que la

desnitrificación durante la fase aeróbica pudo ser realizada en parte por GAO desnitrificantes (DGAO) con morfología TFO. No obstante, otros grupos microbianos funcionales probablemente contribuyeron a la elevada capacidad de desnitrificación obtenida en el sistema biológico de la presente tesis.

El proceso de desnitrificación observado en las fases anóxica y aeróbica se produjo a valores de ORP superiores a +175 mV (Tabla 4.3). Estos valores son significativamente más altos que los encontrados en los reactores anóxicos de plantas típicas de remoción biológica de nitrógeno (-100 - +100 mV, Dabkowski, 2008). Este resultado sugiere que el proceso de desnitrificación observado en el presente estudio es diferente del proceso anóxico exhibido por los sistemas tradicionales.

Las velocidades de desnitrificación específica (VDNE), determinadas una vez finalizado el proceso de nitrificación, fueron significativamente mayores a los valores típicos por decaimiento endógeno informados en literatura, los cuales varían entre 0,2 a 0,6 mg NO₃⁻-N/(g SSV h) (Kujawa y Klapwijk, 1999).

La VDNE presentó valores promedio de 2,94 y 2,34 mg NO₃⁻-N/(g SSV h) en los Ensayos OACB y OACM respectivamente. Estos valores fueron 3 a 9 veces más altos que los informados por Winkler y col (2011), quienes lograron desnitrificación post-anóxica utilizando un SBR operado en condiciones anaeróbico/aeróbico/anóxico (ANA/AE/AN). Estos autores sugirieron que el proceso de desnitrificación fue llevado a cabo por PAOs a partir de su metabolismo de mantenimiento utilizando glucógeno. Del mismo modo, Coats y col. (2011) trabajando con un SBR bajo régimen AN/AE/AN informaron VDNE post-anóxica comprendidas entre 0,53 a 1,36 mg NO₃⁻-N/(g SSV h), las cuales fueron 2 a 5 veces más bajas que las obtenidas en los Ensayos OACB y OACM. En el trabajo de Coats y col. (2011), la biomasa estuvo enriquecida en PAOs y la desnitrificación fue principalmente impulsada por glucógeno. Vocks y col. (2005) utilizando un biorreactor de membrana a escala de banco bajo régimen ANA/AE/AN logró una VDNE (2,2 mg NO₃⁻-N/(g SSV h)) similar a la obtenida en los Ensayos OACB y OACM. Estos autores sugirieron que la denitrificación post-anóxica tuvo lugar probablemente a partir de glucógeno almacenado como fuente interna de carbono. Asimismo propusieron a DGAO como responsables de la post-desnitrificación, siempre que los PAO denitrificantes

(DPAO) no puedan desnitrificar sin la eliminación de P (Vocks y col., 2005). DGAOs pueden desempeñar el papel principal en el proceso de desnitrificación post-anóxica. Al respecto, Li y col. (2014), trabajando en un SBR ANA/AE/AN en condiciones operativas favorables para el enriquecimiento de GAO, informaron una VDNE post-anóxica de 1,24 y 0,5 mg NO₃⁻-N/(g SSV h) para PHA y glucógeno respectivamente. Zhu y col. (2013) en un sistema post-anóxico informaron VDNE de 2,97 y 1,22 mg NO₃⁻-N/(g SSV h) para las mismas fuentes de carbono.

En el Ensayo OACA, la velocidad de desnitrificación específica fue 0,83 mg NO₃⁻-N/(g SSV h), siendo significativamente menor a la obtenida en ensayos previos. Este resultado fue atribuido al enriquecimiento de la biomasa con bacterias heterótrofas debido a la mayor carga orgánica, lo que condujo a una concentración de biomasa que duplicó a la obtenida en el Ensayo OACB. La VDNE obtenida en el Ensayo OACA se encuentra dentro del rango de valores informados por Coats y col. (2011) y Li y col. (2014).

Con respecto al efecto del oxígeno sobre la capacidad de desnitrificación, Oh y Silverstein (1999) informaron que las velocidades de desnitrificación para condiciones de OD de 0,4 mg/L y 5,6 mg/L representaron el 50 % y 4 % respectivamente respecto de la condición anóxica. Sin embargo, en el presente trabajo de tesis, bajo condiciones de OD entre 3,9 y 5,5 mg/L, se lograron velocidades de desnitrificación específicas similares o mayores a las informadas en literatura para condiciones anóxicas conforme fue discutido previamente. Es ampliamente aceptado que en un ambiente aeróbico, las bacterias desnitrificantes pueden sobrevivir en el centro anaeróbico/anóxico de los flóculos microbianos. Si este no es el caso, los desnitrificantes podrían tolerar el oxígeno y en consecuencia no resultaría afectado el proceso de desnitrificación. Cabe destacar que los desnitrificantes aeróbicos pueden usar alternativamente nitrato u oxígeno como aceptor final de electrones. En el presente capítulo se atribuyó la actividad desnitrificante al proceso de desnitrificación aeróbico. El perfil de la concentración de oxígeno en el flóculo, determinado a partir del modelo matemático propuesto, permitió establecer que el flóculo fue completamente aeróbico, sin zonas anóxicas en sus interior, corroborando que el proceso de desnitrificación ocurrió bajo condiciones aeróbicas.

4.7. Conclusiones del Capítulo

En el presente capítulo se evaluó el efecto de la carga volumétrica de sustrato orgánico sobre el proceso de desnitrificación bajo condiciones aeróbicas. Se utilizó un reactor biológico secuencial (SBR) a escala laboratorio operado únicamente con dos fases de reacción, anóxica inicial seguida de una etapa aeróbica con elevada concentración de oxígeno disuelto (OD). El proceso de nitrificación seguido de desnitrificación tuvo lugar en la fase aeróbica. La fuente de carbono (acetato) que presentaba el efluente sintético fue removida completamente en la fase anóxica conduciendo a la formación de polihidroxicarboxilatos (PHA) y probablemente algo de glucógeno. Estas reservas intracelulares de carbono orgánico y energía impulsaron la desnitrificación en la etapa aeróbica. La mayor remoción de nitrógeno inorgánico (78%) fue obtenida a pH de 7,5, concentración de OD en fase aeróbica superior a 3,9 mg/L, relación anóxica/aeróbica (AN/AE) de 0,5:1,0 y carga orgánica de 880 mg DQO/(L día) (Ensayo OACA).

Las condiciones oxidantes del sistema (ORP > +170 mV) favorecieron el crecimiento de GAOs con morfología tipo tétradas. Estas condiciones fueron desfavorables para el crecimiento de PAOs. Los GAOs presentaron la capacidad de ciclar PHA a lo largo del ciclo de operación según pudo detectarse por tinción específica y observación microscópica. Sin embargo, no fue observado el ciclado de glucógeno intracelular característico de estos microorganismos, por lo tanto puede concluirse que el metabolismo GAO no fue dominante en el sistema. El proceso de desnitrificación bajo condiciones aeróbicas podría atribuirse a GAOs desnitrificantes (DGAOs) con morfología TFO. No obstante, otros grupos funcionales contribuyeron probablemente con dicho proceso.

A partir del modelo matemático propuesto se permite sugerir que el flóculo en su interior presentó condiciones aeróbicas, comprobando que el proceso de desnitrificación fue aeróbico, incluyendo a los flóculos de mayor tamaño que presentaron una frecuencia mínima.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

En el presente trabajo de tesis se analizó el efecto de diferentes factores operativos y físico-químicos sobre el proceso de remoción de nitrógeno por nitrificación y desnitrificación aeróbica en un reactor de cargas secuenciales (SBR); utilizando la reserva de carbono intracelular como fuente de carbono y energía para el proceso de desnitrificación. Se realizaron diferentes ensayos para evaluar el efecto de la carga orgánica sobre el proceso de nitrificación y desnitrificación aeróbica.

En sistemas con baja concentración de oxígeno disuelto se logró demostrar la influencia de la carga orgánica sobre la eficiencia del proceso de nitrificación. Se logró determinar la influencia de las bacterias heterótrofas en el deterioro del proceso de nitrificación; se logró demostrar que en sistemas con baja concentración de oxígeno disuelto y carga orgánica relativamente alta se genera competencia por el oxígeno entre organismos heterótrofos y autótrofos generando una baja actividad nitrificante, como se puede observar en el ensayo OBCA. En este experimento, el reactor fue operado con una carga orgánica de 880 mg DQO/(L día), concentración de OD < 2,0 mg O₂/L, relación DQO:N:P= 100:10:5, pH= 7,0 y relación anóxica/aeróbica AN/AE= 1,0:1,0. En dicho ensayo, el efluente final presentó mala calidad en términos de su elevada concentración de nitrógeno inorgánico (43,5 ± 0,20 mgN/L) con descarga media de 52,2 mg N/día y pobre eliminación de nitrógeno inorgánico (8%).

En el ensayo OBCB se mantuvieron las mismas condiciones de operación a las utilizadas en el experimento OBCA, a excepción de la carga orgánica que fue reducida a la mitad obteniéndose 440 mg DQO/(L día). Este sistema presentó una buena actividad nitrificante, presentando una remoción de nitrógeno amoniacal mayor al 99%, del cual el 70% fue utilizado como fuente de energía por bacterias nitrificantes. La velocidad de nitrificación volumétrica y específica fue de 3,96 mg NH₃-N/(L h) y 4,22 mg NH₃-N/(g SSV h) respectivamente. El posterior proceso de desnitrificación fue muy bajo. El efluente final presentó una concentración de nitrógeno inorgánico de 4,5 mg N/L, lo que resulta en una descarga media de 5,94 mg N/día y una remoción de nitrógeno inorgánico de 45 ± 2%. Esta pobre remoción de nitrógeno inorgánico fue asociada a la baja capacidad desnitrificante del sistema.

Posteriormente, en sistemas con alta concentración de oxígeno disuelto, se evaluó el efecto de la carga orgánica sobre el proceso de desnitrificación bajo condiciones aeróbicas. El proceso de nitrificación seguido de desnitrificación tuvo lugar en la fase aeróbica. La fuente de carbono (acetato) del efluente sintético fue removida completamente en la fase anóxica conduciendo a la formación de polihidroxialcanoatos (PHA). Se logró obtener un proceso de desnitrificación en condiciones aeróbicas impulsado por reservas intracelulares (PHA), evitando la adición de fuente de carbono y/o recirculación del licor mixto. Cabe destacar que en sistemas con desnitrificación anóxica, se ha demostrado que la recirculación puede generar condiciones micro-aeróbicas que conlleva a inhibir las enzimas encargadas de convertir los óxidos de nitrógeno a nitrógeno gaseoso, especialmente la Nir reductasa conduciendo a la generación de óxidos de nitrógeno por desnitrificación incompleta. En el presente trabajo de tesis, la mayor remoción de nitrógeno inorgánico (78%) fue obtenida a pH de 7,5, concentración de OD en fase aeróbica mayor a 3,9 mg/L, relación anóxica/aeróbica (AN/AE) de 0,5:1,0 y carga orgánica de 880 mg DQO/(L día) (Ensayo OACA). Las condiciones oxidantes del sistema (ORP > +170 mV) favorecieron el crecimiento de GAOs con morfología tipo tétradas. Los GAOs presentaron la capacidad de ciclar PHA a lo largo del ciclo de operación; sin embargo, no fue observado el ciclado de glucógeno intracelular característico de estos microorganismos. Por lo tanto se concluyó que la actividad metabólica GAO no fue dominante en el sistema.

En los ensayos realizados no se observó acumulación de nitrito. Esto puede ser debido a que en el proceso de nitrificación la velocidad de oxidación de amonio a nitrito es más baja que la velocidad de oxidación de nitrito a nitrato; mientras que en el proceso de desnitrificación, la velocidad de reducción de nitrato a nitrito es más baja que la velocidad de reducción de nitrito a nitrógeno gaseoso. La ausencia de nitrito en sistemas con remoción biológica de nitrógeno resulta altamente conveniente en términos de sustentabilidad ambiental, pues es bien conocido que las elevadas concentraciones de nitrito favorecen la producción de óxido nitroso (N₂O) durante los procesos de nitrificación y desnitrificación.

Mediante un modelo matemático de difusión de oxígeno se permite sugerir que el flóculo microbiano, desde la periferia hasta el centro del mismo, se encontraba gobernado por condiciones aeróbicas. Esto fue válido para todos los flóculos, desde los más pequeños hasta los de mayor tamaño. Estos resultados permitieron confirmar que el proceso de desnitrificación tuvo lugar bajo condiciones aeróbicas. La desnitrificación aeróbica constituye una alternativa al proceso de desnitrificación anóxico tradicional, destacándose por ser más amigable con el ambiente por su baja producción de óxidos de nitrógeno.

El sistema AN/AE propuesto constituye un proceso sencillo para la eliminación biológica de nitrógeno y potencialmente respetuoso del medio ambiente, con respecto a los procesos convencionales, pues disminuiría la formación de N_2O , un gas de invernadero que tiene una importante influencia en el calentamiento de la atmósfera.

Bibliografía

- Ahn, Y. H. (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, 41(8), 1709-1721. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.033>.
- Akunna, J.C., Bizeau, C. and Moletta, R. (1993) Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Water Res.* 27, 1303–1312.
- Al-Ahmady, K.K., 2006. Analysis of oxygen transfer performance on sub-surface aeration systems. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 3, 301–308.
- Beccari, M., Pinto, A. C. D., Ramadori, R., & Tomei, M. . (1992). Effects of dissolved oxygen and diffusion resistances on nitrification kinetics. *Water Research*, 26(8), 1099-1104. [http://doi.org/10.1016/0043-1354\(92\)90146-U](http://doi.org/10.1016/0043-1354(92)90146-U).
- Beun, J.J., Dircks, K., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 2002. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. *Water Res.* 36, 1167–1180
- Breisha, G. Z., & Winter, J. (2010). Bio-removal of nitrogen from wastewaters-A review, 6(12), 508-528.
- Busse, L. B., Venrick, E. L., Antrobus, R., Miller, P. E., Vigilant, V., Silver, M. W., ... Prezelin, B. B. (2006). Domoic acid in phytoplankton and fish in San Diego, CA, USA. *Harmful Algae*, 5(1), 91-101. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2005.06.005>
- Camargo, J.A. and Alonso A. (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environ. International* 32, 831–849.
- Capone, D. G. (2006). GEOCHEMISTRY: Follow the Nitrogen. *Science*, 312(5774), 708-709. <http://doi.org/10.1126/science.1111863>
- Carrera, J., Baeza, J. A., Vicent, T., Lafuente, J. (2003), Biological Nitrogen Removal of High-Strength Ammonium Industrial Wastewater with Two-Sludge System, *Water Research*, 37(17): 4211-4221.
- Carrera, J., Vicent, T., & Lafuente, J. (2004). Effect of influent COD / N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater, 39, 2035-2041. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.005>
- Carvalho, G., Lemos, P. C., Oehmen, A., & Reis, M. a M. (2007). Denitrifying phosphorus

- removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water research*, 41(19), 4383-96. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.065>
- Cassidy, D.P. y Belia, E. (2005). Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. *Wat. Res.* 39(19), 4817-4823.
- Cervantes, F.J. (2009). *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, IWA Publishing, London.
- Chen, Q., & Ni, J. (2012). Ammonium removal by *Agrobacterium* sp . LAD9 capable of heterotrophic nitrification – aerobic denitrification. *JBIOSC*, 113(5), 619-623. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.012>.
- Chen, S., Ling, J., & Blancheton, J. P. (2006). Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacultural Engineering*, 34(3), 179-197. <http://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.09.004>
- Coats, E. R., Mockos, A., & Loge, F. J. (2011). Post-anoxic denitrification driven by PHA and glycogen within enhanced biological phosphorus removal. *Bioresource Technology*, 102(2), 1019-1027. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.104>
- Colliver, B.B., Stephenson, T., 2000. Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers. *Biotechnology Advances* 18 (3), 219e232.
- Conzonno V.H. (2009) *Limnología Química*. 1era edición. Editorial de La Universidad Nacional de La Plata.
- Cuervo-López, F.M., Martínez, F. Gutierrez-Rojas, M. Noyola, R.A. and Gomez, J. (1999) Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in UASB reactors. *Water Sci. Technol.* 40(8), 123–130.
- Cui, Y., Wang, S., & Li, J. (2009). On-line Monitoring for Phosphorus Removal Process and Bacterial Community in Sequencing Batch Reactor. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17(3), 484-492. [http://doi.org/10.1016/S1004-9541\(08\)60235-9](http://doi.org/10.1016/S1004-9541(08)60235-9).
- Dabkowski, B., 2008. Applying oxidation–reduction potential sensors in biological nutrient removal systems. In: *Proceedings of the Water Environment Federation, WEFTEC 2008*, pp. 3033–3042.
- Daigger GT, Adams CD, Steller HK. (2007) Diffusion of oxygen through activated sludge flocs: experimental measurement, modeling, and implications for simultaneous nitrification and denitrification. *Water Environ Res.* 79(4):375-87.
- Dias, J.M.L., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M.G.E., Ramos, A.M., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2006. Recent advances in

- polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* 6, 885–906.
- Driscoll, C.T., et al. (2003). *Nitrogen Pollution: From the Sources to the Sea*. Hubbard Brook Research Foundation; Science Links Publication, 3755(603), 1-28.
- Eikelboom, D. H. (1981). *MICROSCOPIC SLUDGE INVESTIGATION MANUAL*.
- EPA. (1999). *Wastewater Technology Fact Sheet Sequencing Batch Reactors*. United States Environmental Protection Agency, Washington D.C., EEUU.
- EPA. (2010). *Nutrient control design manual*. EPA/600/R-10/100. United States Environmental Protection Agency, Washington D.C., EEUU.
- Ferraz, F.M., Povinelli, J., Pozzi, E., Vieira, E.M., Trofino, J.C., 2014. Co-treatment of landfill leachate and domestic wastewater using a submerged aerobic biofilter. *J. Environ. Manag.* 141, 9–15.
- Ferrer, J., Seco, A. *Tratamiento biológico de aguas residuales* (2018). Universidad politecnica de Valencia. Alfaomega
- Fewtrell, L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: A discussion. *Environmental Health Perspectives*, 112(14), 1371-1374. <http://doi.org/10.1289/ehp.7216>
- Fields, S. (2004). Global Nitrogen: Cycling out of control. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 556-563. <http://doi.org/10.1289/ehp.112-a556>
- Freitas, F., Temudo, M. F., Carvalho, G., Oehmen, A., & Reis, M. a M. (2009). Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Bioresource technology*, 100(6), 1969-76. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.031>
- Gabarró, J., González-Cárcamo, P., Rusalleda, M., Ganigué, R., Gich, F., Balaguer, M. D., & Colprim, J. (2014). Anoxic phases are the main N₂O contributor in partial nitrification reactors treating high nitrogen loads with alternate aeration. *Bioresource Technology*, 163(2), 92-99. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.019>
- Gerardi, M. H. (2003). *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*. <http://doi.org/10.1002/0471216682>
- Gijzen, H.J. y Mulder, A. (2001). The nitrogen cycle out of balance. *Water* 21 8, 38–40
- Guerrero, J., Tayà, C., Guisasola, A., & Baeza, J. a. (2012). Understanding the detrimental effect of nitrate presence on EBPR systems: Effect of the plant configuration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(10), 1508-1511. <http://doi.org/10.1002/jctb.3812>.

- Gumaelius, L., Magnusson, G., Pettersson, B. and Dalhammar, G. (2001) *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated Sludge. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 51, 999–1006.
- Gupta, S. K., Gupta, R. C., Gupta, a B., Seth, a K., Bassin, J. K., & Gupta, a. (2000). Recurrent acute respiratory tract infections in areas with high nitrate concentrations in drinking water. *Environmental health perspectives*, 108(4), 363-366.
- Huang, H.K., Tseng, S.K., 2001. Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 90–94.
- Huang, T.-L., Zhou, S.-L., Zhang, H.-H., Bai, S.-Y., He, X.-X., & Yang, X. (2015). Nitrogen removal characteristics of a newly isolated indigenous aerobic denitrifier from oligotrophic drinking water reservoir, *Zoogloea* sp. N299. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 10038-10060. <http://doi.org/10.3390/ijms160510038>
- Hibiya, K., Terada, A., Tsuneda, S., Hirata, A. (2003). Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor. *Journal of Bacteriology* 100, 23–32
- Irvine, R., Wilderer, P., & Flemming, H. (1997). Controlled unsteady state processes and technologies - An overview. *Water Science and Technology*, 35(1), 1-10. [http://doi.org/10.1016/S0273-1223\(96\)00872-4](http://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00872-4)
- Isnansetyo, A., Getsu, S., Seguchi, M., & Koriyama, M. (2014). Independent Effects of Temperature, Salinity, Ammonium Concentration and pH on Nitrification Rate of the Ariake Seawater Above Mud Sediment. *HAYATI Journal of Biosciences*, 21(1), 21-30. <http://doi.org/10.4308/hjb.21.1.21>
- Jenkins, K., Richard, M.G., Daigger, G.T., 1993. *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*, 2nd ed. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Jensen, V. B., Darby, J. L., Seidel, C., & Gorman, C. (2012). *Drinking Water Treatment for Nitrate. Technical Report 6. Addressing Nitrate in California's Drinking Water with a Focus on Tulare Lake Basin and Salinas Valley Groundwater. Report for the State Water Resources Control Board Report to the Legislature.* Recuperado a partir de <http://groundwaternitrate.ucdavis.edu>
- Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J., & Zhang, H. (2015). Aerobic Denitrification: A Review of Important Advances of the Last 30 Years. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(4), 643-651. <http://doi.org/10.1007/s12257-015->

0009-0.

- Ji, B., Wang, H., Yang, K., 2014. Nitrate and COD removal in an upflow biofilter under an aerobic atmosphere. *Bioresour. Technol.* 158, 156–160.
- Jones, R. D., & Hood, M. A. (1980). Effects of temperature, pH, salinity, and inorganic nitrogen on the rate of ammonium oxidation by nitrifiers isolated from wetland environments. *Microbial Ecology*, 6(4), 339-347. <http://doi.org/10.1007/BF02010496>
- Joo, H., Hirai, M., & Shoda, M. (2005). Characteristics of Ammonium Removal by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4, 100(2), 184-191. <http://doi.org/10.1263/jbb.100.184>
- Raunkjær, K., Hvitved-Jacobsen, T., Nielsen P. (1994). Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic, 28(2), 251-262.
- Kampschreur, M. J., Temmink, H., Kleerebezem, R., Jetten, M. S. M., & van Loosdrecht, M. C. M. (2009). Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research*, 43(17), 4093-4103. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.001>
- Kim, M., Jeong, S.-Y., Yoon, S. J., Cho, S. J., Kim, Y. H., Kim, M. J., ... Lee, S.-J. (2008). Aerobic Denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at Different C/N Ratios. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(5), 498-502. <http://doi.org/10.1263/jbb.106.498>
- Knowles, R. (1982) Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46(1): 43–70.
- Komorowska-Kaufman, M., Majcherek, H., & Klaczyński, E. (2006). Factors affecting the biological nitrogen removal from wastewater. *Process Biochemistry*, 41(5), 1015-1021. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.11.001>.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1996. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two sludge system. *Water Res.* 30, 1702–1710.
- Kujawa, K., Klapwijk, B., 1999. A method to estimate denitrification potential for predenitrification systems using NUR batch test. *Water Res.* 33, 2291–2300.
- Lee, H., Min, Y.M., Park, C.H., Park, Y.H. (2004). Automatic control and remote monitoring systems for biological nutrient removal on small wastewater treatment plants in Korea. *Wat. Sci. Tech.* 50 (6), 199-206.
- Li, D.H. y Ganczarczyk, J.J. (1990). Structure of activated sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering* 11, 127–138.

- Li, D.H. y Ganczarczyk, J.J. (1993). Factors affecting dispersion of activated sludge flocs. *Water Environmental Research* 65, 258–263.
- Li, Z., Wang, S., Zhang, W., Miao, L., Cao, T., & Peng, Y. (2014). Nitrogen removal from medium-age landfill leachate via post-denitrification driven by PHAs and glycogen in a single sequencing batch reactor. *Bioresource technology*, 169, 773-7. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.076>
- Liang, S., Zhao, M., Lu, L., Wang, C., Zhao, L., & Liu, W. (2011). Isolation and characteristic of an aerobic denitrifier with high nitrogen removal efficiency, 10(52), 10648-10656. <http://doi.org/10.5897/AJB11.569>
- Liu, Y., Chen, Y., & Zhou, Q. (2007). Effect of initial pH control on enhanced biological phosphorus removal from wastewater containing acetic and propionic acids. *Chemosphere*, 66(1), 123-9. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.004>
- Lobo, C.C., Bertola, N.C., Contreras, E.M., 2013. Stoichiometry and kinetic of the aerobic oxidation of phenolic compounds by activated sludge. *Bioresour. Technol.* 136, 58–65.
- Magrama. (2003). Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. Manual de interpretación y elaboración de informes, 133. Recuperado a partir de http://www.magrama.gob.es/ca/agua/publicaciones/03_Manual_Directiva_91_271_CEE_tcm8-28959.pdf
- Martínez, S., Cuervo-López, F.M. and Gómez, J. (2007) Toluene mineralization by denitrification in an up flow anaerobic sludge (UASB) reactor. *Biores. Technol.* 98, 1717–1723
- Metcalf & Eddy (1995). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. Tercera edición. McGraw-Hill, New York.
- Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th ed.; McGraw-Hill: New York.
- Miranda, J., Balachandran, K. K., Ramesh, R., & Wafar, M. (2008). Nitrification in Kochi backwaters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78(2), 291-300. <http://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.12.004>
- Mino, T., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* 32, 3193– 3207.
- Mosier, A., Kroeze, C., Nevison, C., Oenema, O., & Seitzinger, S. (1998). Closing the global N₂O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle

- inventory methodology, 225-248.
- Münch, E. V., Lant, P., & Keller, J. (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Research*, 30(2), 277-284. [http://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00174-3](http://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00174-3)
- Muszyński, A., Łebkowska, M., Tabernacka, A., & Miłobędzka, A. (2013). From macro to lab-scale: Changes in bacterial community led to deterioration of EBPR in lab reactor. *Central European Journal of Biology*, 8(2), 130-142. <http://doi.org/10.2478/s11535-013-0116-2>
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., Reis, M.A.M., 2007. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res.* 41, 2271–2300.
- Orhon, D. y Artan, N. (1994). "Modelling of activated sludge systems." Technomic Publishing Company, INC. Lancaster, USA 2da Edición.
- Orozco, A (2005). Bioingeniería de aguas residuales. Teoría y diseño.
- Orozco Barrenetxea C., Pérez Serrano A., González Delgado Ma. N., Rodríguez Vidal F.J. y Alfayate Blanco J.M. (2002) Contaminación ambiental. Una visión desde la química. Ed Thomson Paraninfo S.A., Madrid, España.
- Organization, W. H. (2004). Guidelines for Drinking-water Quality, 1(Edition, Third).
- Vocks, M., Adam, C., Lesjean, B., Gnirss, R., Kraume, M., 2005. Enhanced post-denitrification without addition of an external carbon source in membrane bioreactors. *Water Res.* 39, 3360–3368.
- Oh, J., Silverstein, J., 1999. Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Water Res.* 33, 1925–1937.
- Papadakis, N., Veranis, N., & Arvanitidis, N. D. (2007). Sustainable development of natural resources in Northern Greece, focusing on water supply reliability and public health protection. *Desalination*, 213(1-3), 199-204. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.608>
- Patureau, D., Godon, J., Dabert, P., Bouchez, T., Bernet, N., Delgenes, J. P., & Moletta, R. (1998). *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new Gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions.
- Peña-Calva, A, Olmos, D.A, Viniegra, G.G, Cuervo, L.F., Gomez, J. (2004). Denitrification in presence of benzene, toluene, and m-xylene. *Appl. Biochem. Biotech.* 119, 195-

- Pitman AR (1991) Design considerations for nutrient removal plants. *Water Science and Technology* 23:781-790
- Pochana, K. y Keller, J. (1999). Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Wat. Sci. Tech.* 39(6), 61–68.
- Plósz, B.G., Jobbágy, A., Grady Jr., C.P.L., 2003. Factors influencing deterioration of denitrification by oxygen entering an anoxic reactor through the surface. *Water Res.* 37, 853–863
- Puig, S., Corominas, L.I., Balaguer, M.D., Colprim, J. (2005). Development and implementation of a real-time control system for nitrogen removal using OUR and ORP as endpoints. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (9), 3367-3373
- Randall, C. W., & Buth, D. (1984). Nitrite build-up in activated sludge resulting from temperature effects. *Water Pollution Control Federation*, 56(9), 1039-1044.
- Ramalho, R. S. (1993). *Tratamiento de aguas residuales*. Reverté S.A. Barcelona, España.
- Rezouga, F., Hamdi, M. y Sperandio, M. (2009). "Variability of kinetic parameters due to biomass acclimation: Case of para-nitrophenol biodegradation." *Bioresource Technology* 100(21): 5021-5029.
- Robertson LA & Kuenen JG (1984) Aerobic denitrifying: a controversy revived. *Arch Microbiol* 139: 351–354.
- Robertson, LA., Dalsgaard, T., Revsbech, N.P., Kuenen, J.G., 1995. Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry. *FEMSMicrobiol. Ecol.* 18, 113–120.
- Rijn, J.V., Tal, Y. and Barak, Y. (1996) Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas Stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7), 2615–2620.
- Ronzano, E., Dapena J.L. (2002). *Tratamiento biológico de las aguas residuales*. Ediciones Díaz de Santos, S.A.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H., Reis, M.A.M., 2002. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 51, 1–18.
- Seviour, R. J.; Blackall, L. L. (1999) *The Microbiology of Activated Sludge*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands; 219-220.
- Schmidell, W.; Moreira, H.; Etchebehere, C.; (2007). *Tratamiento biológico de aguas*

residuarias.

- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., Strous, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(4), 481-492. [http://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00039-1](http://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00039-1)
- Schuurkes JAAR, Mosello R. The role of external ammonium inputs in freshwater acidification. *Schweiz Z Hydrol* 1988;50:71–86.
- Shammas. (1986). Interactions of Temperature, pH, and Biomass on the Nitrification Process. *Water Pollution Control Federation*, 58(1), 7. [http://doi.org/10.1016/S0262-1762\(99\)80122-9](http://doi.org/10.1016/S0262-1762(99)80122-9)
- Stenstrom, M.K., Song, S., 1991. Effects of oxygen transport limitation on nitrification in the activated sludge process. *Res. J. Water Pollution Control Fed.* 63 (3), 208–219.
- Stouthamer, A.H. 1992. Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 61: 1-33.
- Stüven, R., Vollmer, M., Bock, E., 1992. The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology* 158 (6), 439e443.
- Surampalli, R. Y., Tyagi, R. D., Scheible, O. K., & Heidman, J. a. (1997). Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors. *Bioresource Technology*, 61(2), 151-157. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00034-5](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00034-5).
- Takaya, N., Catalan-Sakairi, M. A. B., Sakaguchi, Y., Kato, I., Zhou, Z., & Shoun, H. (2003). Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3152-7. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3152>
- Takenaka, S., Zhou, Æ. Q., Kuntiya, Æ. A., & Seesuriyachan, Æ. P. (2007). Isolation and characterization of thermotolerant bacterium utilizing ammonium and nitrate ions under aerobic conditions, 385-390. <http://doi.org/10.1007/s10529-006-9255-8>.
- Tallec, G., Garnier, J., Billen, G., Gossiaux, M., 2008. Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation. *Bioresour. Technol.* 99, 2200–2209.
- Teske, A, Alm, E, Regan, JM, Toze, S, Rittmann, BE, Stahl, DA. (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*. 176, 6623-6630. DOI: 10.1128/jb.176.21.6623-6630.1994.

- Tchobanoglous G., Burton F.I. (1991) *Wastewater Engineering*, 3rd edn. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Third, K. a. (2003). Oxygen Management for Optimisation of Nitrogen Removal in a Sequencing Batch Reactor Katie Third, (January), 222.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Salem, S., 2006. Biological treatment of sludge digester liquids. *Water Science and Technology* 53 (12), 11–20.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecol Appl* 1997;7:737–50.
- Vives, M.T., Balaguer, M.D., García, S., García, R., Colprim, J. (2003). Textile dyeing wastewater treatment in a sequencing batch reactor system. *Journal of Environmental science and health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* A38(10), 2089-2099.
- Vollack, K.U., Xie, J., Härtig, E., Römling, U. & Zumft, W.G. 1998. Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 144: 441-8.
- Wang, J., 2012. Fundamentals of biological processes for wastewater treatment. In: Etienne, Paul, Yu, Liu (Eds.), *Biological Sludge Minimization and Biomaterials/Bioenergy Recovery Technologies*, first ed. John Wiley and Sons Inc, Hoboken, New Jersey, pp. 1–80.
- Wanner J. (1994) *Activated sludge bulking and foaming control*. Technomic Publishing Company, Inc., USA.
- Watanabe, Y., Okabe, S., Hirata, K. and Masuda, S. (1995) Simultaneous removal of organic materials and nitrogen by micro-aerobic biofilms. *Water Sci. Technol.* 31(1), 195–203.
- Wei, D., Xue, X., Yan, L., Sun, M., Zhang, G., Shi, L., & Du, B. (2014). Effect of influent ammonium concentration on the shift of full nitrification to partial nitrification in a sequencing batch reactor at ambient temperature. *Chemical Engineering Journal*, 235, 19-26. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2013.09.005>.
- Wentzel M.C. (1990) "Phosphorous removal from sewage in activated sludge systems". Seminar of Association of Water Treatment Personnel. Western Cape Group.
- Wetzel RG. *Limnology*. 3rd edition. New York: Academic Press; 2001.

- Winkler M.A. (1999) Tratamiento biológico de aguas de desecho. Limusa S.A., Grupo Noriega Editores, México D.F.
- Winkler, M., Coats, E.R., Brinkman, C.K., 2011. Advancing post-anoxic denitrification for biological nutrient removal. *Water Res.* 45, 6119–6130.
- Wolfe, A. H., & Patz, J. a. (2002). Reactive Nitrogen and Human Health:Acute and Long-term Implications. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 120-125. <http://doi.org/10.1579/0044-7447-31.2.120>
- Wrage, N., Velthof, G.L., van Beusichem, M.L., Oenema, O., 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry* 33 (12e13), 1723e1732.
- Wunderlin, P., Mohn, J., Joss, A., & Emmenegger, L. (2011). Mechanisms of N₂O production in biological wastewater treatment under nitrifying and denitrifying conditions. *Water Research*, 46(4), 1027-1037. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.080>
- Yan, D., Wang, Q., Mao, L., Ma, T., Li, Y., Ouyang, C., ... Cao, A. (2015). Interaction between nitrification, denitrification and nitrous oxide production in fumigated soils. *Atmospheric Environment*, 103, 82-86. <http://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.09.079>
- Yu, T., Qi, R., Li, D., Zhang, Y., & Yang, M. (2010). Nitrifier characteristics in submerged membrane bioreactors under different sludge retention times. *Water Research*, 44(9), 2823-2830. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.021>
- Yung, M. B. M. (1979). Fixation of Nitrogen in the Prebiotic Atmosphere. *Science*, 203(March), 1002-1004
- Zeghal S, Puznava N, Subra JP, Sauvegrain P, Vignoles C (1997b) Methanol dosing feedback control for denitrification. Part 2. BNR 3 Conference Biological Nutrient Removal, Convention Centre, Brisbane, AWA Australia, December:321-328
- Zeng, R.J., Lemaire, R., Yuan, Z., Keller, J., 2003. Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 170–178.
- Zeng, R. J., Yuan, Z., & Keller, J. (2004). Improved understanding of the interactions and complexities of biological nitrogen and phosphorus removal processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3(3), 265-272. <http://doi.org/10.1007/s11157-004-7459-8>
- Zheng, X., Tong, J., Li, H., & Chen, Y. (2009). The investigation of effect of organic carbon

- sources addition in anaerobic-aerobic (low dissolved oxygen) sequencing batch reactor for nutrients removal from wastewaters. *Bioresource technology*, 100(9), 2515-20. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.003>
- Zhang, Q.-L., Liu, Y., Ai, G.-M., Miao, L.-L., Zheng, H.-Y., & Liu, Z.-P. (2012). The characteristics of a novel heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology*, 108, 35-44. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.139>.
- Zhang, Y., Ji, G., & Wang, R. (2015). *Bioresource Technology* Genetic associations as indices of nitrogen cycling rates in an aerobic denitrification biofilter used for groundwater remediation. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 194, 49-56. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.014>
- Zumft, W. G. (1997). *Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification*, 61(4), 533-616.
- Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S. (2008) Biological nitrogen removal from wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192,159–195.
- Zhu, L., Ding, W., Feng, L., Kong, Y., Xu, J., & Xu, X. (2012). *Bioresource Technology* Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem. *Bioresource Technology*, 108, 1-7. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.033>.
- Zhu, R., Wang, S., Li, J., Wang, K., Miao, L., Ma, B., Peng, Y., 2013. Biological nitrogen removal from landfill leachate using anaerobic–aerobic process: denitrification via organics in raw leachate and intracellular storage polymers of microorganisms. *Bioresour. Technol.* 128, 401–408.