

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL

**PROCESO DE NITRIFICACIÓN EN REACTORES
SECUENCIALES DISCONTINUOS SBR (SEQUENCING BATCH
REACTOR) CON BIOMASA GRANULAR**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AMBIENTAL.**

MARÍA JOSÉ POZO PROAÑO
mariposa_mjpp@yahoo.com

DIRECTOR: PROF. ING. MARCELO MUÑOZ M.Sc.
marcelo.munoz@epn.edu.ec

Quito, diciembre de 2008

DECLARACIÓN

Yo, María José Pozo Proaño, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

María José Pozo Proaño

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por María José Pozo Proaño, bajo mi supervisión.

Prof. Ing. Marcelo Muñoz M.Sc.

DIRECTOR DE PROYECTO

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a Dios por las oportunidades que me ha otorgado junto con la vida.

Luego a mi familia: Susana (mi mami), Fanny (mi abuelita), mis hermanos Sofía y Daniel, mis tíos: Carmen, Cumandá, Washington y Anita y mis primos, especialmente Claudia y Luis Andrés, por su apoyo incondicional, su comprensión, sus consejos y su amor.

Un profundo agradecimiento al Ing. Marcelo Muñoz de la Escuela Politécnica Nacional (Quito - Ecuador) y al Dr. Ramón Méndez Pampín de la Universidad de Santiago de Compostela (España) por hacer posible y gratificante la investigación realizada.

Al Proyecto Europeo ALFA por facilitar el financiamiento, que fue la base primordial para realizar este trabajo mediante la concesión de una estancia de 10 meses en el Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos de la Universidad de Santiago de Compostela.

A todos los miembros del BIOGRUP por su ayuda, gentileza y camaradería, en especial a Anuska Mosquera y José Luis Campos, por su apoyo y dirección científica y técnica.

Un agradecimiento especial a José Ramón Vázquez por su guía constante, su paciencia, su amistad, su buen humor y por hacer más fácil el aprendizaje y la comprensión de los temas investigados.

A Denisse Serrano, por ser más que una amiga, una hermana y confidente. Por sus consejos, su tolerancia y por haberse convertido en mi familia durante 10 intensos meses.

A Carmen Fajardo, por su extraordinario apoyo moral, su amistad incondicional y su cariño.

A Rocío Pena, por acogerme en su casa con calidez, cuando más lo necesité.

A Marisol, Claudia y Mayra, por los gratos momentos de convivencia.

A Renato Sánchez, Angy Fierro, Diego Zárate y Verónica Barbecho, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, por causarme a veces esos buenos y malos momentos y por demostrarme que los amigos de verdad si existen.

A mis compañeras y compañeros de la Carrera de Ingeniería Ambiental de la Escuela Politécnica Nacional: Verónica Bósquez, Catalina Ortiz, Diana Guerra, Paulina Villarroel y Miguel Ángel Caicedo, gracias por todos los momentos compartidos porque han sido muy enriquecedores.

Al Ing. Marcelo Muñoz, al Ing. Luis Jaramillo y a la Dra. Ana Lucía Balarezo por la paciencia y la gentileza con que realizaron las oportunas correcciones al presente Proyecto de Titulación.

Al Ing. Byron Arregui y a ECOPLADE, por su generosidad y ayuda al otorgarme los permisos requeridos para cumplir con los trámites del proceso de graduación y gran parte de los recursos necesarios para la impresión de este trabajo.

En fin, gracias a todos quienes han participado de una u otra forma en esta etapa de mi vida, porque en base a las experiencias compartidas se forjan el comportamiento y los logros de cada persona.

DEDICATORIA

A todos los amables lectores:

Que este trabajo incentive la investigación, la innovación y el desarrollo tecnológico, en base al respeto y cuidado del entorno que nos rodea.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	III
RESUMEN.....	V
SUMMARY	VI
PRESENTACIÓN	VII
CAPÍTULO I.....	1
1 Generalidades.....	1
1.1 Introducción	1
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	4
1.4 Alcance	5
1.5 Objetivos	6
1.5.1 Objetivo general	6
1.5.2 Objetivos específicos.....	6
1.6 Importancia	7
CAPÍTULO II.....	8
2 Revisión bibliográfica	8
2.1 Situación actual de la presencia de nutrientes en las aguas residuales domésticas en el Ecuador.	8
2.1.1 Características del agua residual doméstica.....	8
2.1.2 Distribución estimada de la población para el año 2008	9
2.1.3 Producción per-cápita de aguas residuales	11
2.1.4 Producción de nutrientes	12
2.2 Procesos de nitrificación y desnitrificación.	16
2.2.1 Nitrificación.....	17
2.2.2 Desnitrificación	24
2.2.3 Proceso ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXidation).....	26
2.3 Reactores Secuenciales Discontinuos: funcionamiento y características.	30
2.3.1 Funcionamiento.....	30
2.3.2 Ventajas y desventajas.....	33
2.4 Sistemas con biomasa granular.	37
2.4.1 Mecanismos de granulación aerobia	38
2.4.2 Transformaciones en el gránulo.....	44
2.4.3 Ventajas y desventajas de los procesos de granulación	46
CAPÍTULO III.....	47

3	Materiales y métodos	47
3.1	Descripción del montaje experimental y la etapa de operación	47
3.1.1	Montaje experimental	47
3.2	Técnicas analíticas para la determinación de los parámetros de operación	52
3.2.1	Fase líquida	52
3.2.2	Fase sólida	56
3.2.3	Determinación de la actividad Anammox	58
3.2.4	Identificación de la biomasa por FISH.....	60
3.2.5	Respirometría para determinación de la actividad específica	62
3.3	Cálculos	63
3.3.1	Velocidad de consumo de amonio y velocidad de producción de nitrato.....	63
3.3.2	Actividad específica bacteriana a partir de ensayos de respirometría	64
CAPÍTULO IV		66
4	Resultados y discusión.....	66
4.1	Reactor amonio oxidante	66
4.1.1	Análisis de los compuestos nitrogenados en la fase líquida.....	66
4.1.2	Análisis de la concentración de biomasa y aspectos de la fase sólida.....	69
4.2	Reactor nitrito oxidante R3	77
4.2.1	Análisis de los compuestos nitrogenados en la fase líquida.....	78
4.2.2	Análisis de la concentración de biomasa y aspectos de la fase sólida.....	80
4.3	Reactor pulsante Rp.....	87
4.3.1	Análisis de los compuestos nitrogenados en la fase líquida.....	88
4.3.2	Análisis de la concentración de biomasa y aspectos de la fase sólida.....	91
CAPÍTULO V		97
5	Conclusiones.....	97
5.1	Conclusiones generales	97
5.2	Reactor amonio oxidante	97
5.3	Reactor nitrito oxidante:	98
5.4	Reactor pulsante:	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		¡Error! Marcador no definido.
ANEXOS.....		¡Error! Marcador no definido.
Anexo 1:Fotografías del montaje experimental de R1.....		107
Anexo 2:Fotografías del montaje experimental de R3.....		108
Anexo 3:Fotografías del montaje experimental de Rp.....		109
Anexo 4:Fotografías de los equipos y materiales.....		111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1-1. Composición típica de agua residual doméstica no tratada.....	9
Tabla 2.1-2. Población del Ecuador por provincias para septiembre de 2008.	10
Tabla 2.1-3. Producción diaria de nitrógeno total (kg/d), por provincias en el Ecuador. ...	12
Tabla 2.1-4. Producción diaria de amonio libre (kg/d), por provincias en el Ecuador.....	13
Tabla 2.1-5. Producción diaria de fósforo total (kg/d), por provincias en el Ecuador.	14
Tabla 2.2-1. Coeficientes cinéticos para bacterias nitrificantes, a $T = 20^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH} = 8$	21
Tabla 2.2-2. Cinética del proceso Anammox.....	28
Tabla 3.1-1. Composición de la alimentación sintética para el reactor nitrito oxidante.	49
Tabla 3.1-2. Composición sintética para el reactor pulsante.	50
Tabla 3.1-3. Características geométricas e hidráulicas de los reactores.	51
Tabla 3.1-4. Características de operación de los reactores.....	52
Tabla 3.2-1. Sondas para la detección de bacterias	62
Tabla 4.1-1. Características iniciales de la biomasa granular en R1.	66
Tabla 4.2-1. Características iniciales de la biomasa granular en R3.	77
Tabla 4.2-2. Variación de la concentración de nitrito en R3.	77

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 2.2-1. El Ciclo del Nitrógeno en el tratamiento de aguas residuales	16
Gráfico 2.3-1. Fases de un ciclo de operación de un Reactor Secuencial Discontinuo. ...	32
Gráfico 2.4-1. Consumo de sustrato (materia orgánica) durante un ciclo en un SBR.....	41
Gráfico 2.4-2. Teoría de la selección cinética	42
Gráfico 2.4-3. Procesos en el gránulo.....	45
Gráfico 3.1-1. Duración de las etapas de un ciclo en R1.....	48
Gráfico 3.1-2. Duración de las etapas de un ciclo en R3.....	49
Gráfico 3.1-3. Duración de las etapas de un ciclo en R_p	51
Gráfico 3.2-1. Calibrado para determinar la concentración de nitrito.....	54
Gráfico 3.2-2. Calibración para determinar la concentración de nitrato	55
Gráfico 3.2-3. Calibrado para determinar la concentración de amonio.....	55
Gráfico 3.2-4. Segmentos mínimo y máximo de un gránulo para el cálculo del diámetro de "feret"	58
Gráfico 3.2-5. Procedimiento para los ensayos de actividad Anammox.	59
Gráfico 4.1-1. Evolución de las concentraciones de compuestos nitrogenados en el reactor R1.....	67
Gráfico 4.1-2. Evolución de las concentraciones de amonio libre y pH en el reactor R1. .	68
Gráfico 4.1-3. Actividad de la biomasa en el reactor R1.....	69
Gráfico 4.1-4. Evolución de la concentración de sólidos en R1.....	70

Gráfico 4.1-5. Evolución del tiempo de retención celular en R1.	71
Gráfico 4.1-6. Evolución del IVL y la densidad de la biomasa en R1.....	72
Gráfico 4.1-7. Diámetro medio (mm) y Esfericidad de la biomasa granular en R1.	73
Gráfico 4.1-8. Distribución porcentual de la frecuencia y volumen de diámetros de gránulo en R1.	74
Gráfico 4.1-9. Fotografías de la biomasa granular en R1, tomadas con estereomicroscopio.....	76
Gráfico 4.2-1. Evolución de las concentraciones de compuestos nitrogenados en el reactor R3.....	78
Gráfico 4.2-2. Actividad nitrificante y actividad específica de la biomasa en R3.....	79
Gráfico 4.2-3. Evolución de la concentración de sólidos en el reactor R3.	80
Gráfico 4.2-4. Tiempo de Retención Celular en el Reactor R3.....	81
Gráfico 4.2-5. Diámetro medio (mm) y Esfericidad de la biomasa granular en R1.	82
Gráfico 4.2-6. Distribución porcentual de la frecuencia y volumen de diámetros de gránulo en R3.	83
Gráfico 4.2-7. Fotografías de la biomasa en el reactor R3, tomadas con estereomicroscopio.....	86
Gráfico 4.3-1. Variación de las concentraciones de compuestos nitrogenados en el reactor pulsante: N-NH ₄ ⁺ inf (●), N-NH ₄ ⁺ efl (○), N-NO ₂ ⁻ efl (▲), N-NO ₃ ⁻ efl (✱) y DO (---).	88
Gráfico 4.3-2. Actividad Anammox y concentración de OD en el reactor pulsante.	90
Gráfico 4.3-3. Evolución de la concentración de sólidos en el reactor pulsante.	91
Gráfico 4.3-4. Diámetro medio (mm) y Esfericidad de la biomasa granular en Rp.	92
Gráfico 4.3-5. Distribución porcentual de la frecuencia y el volumen de diámetros de gránulo en el reactor pulsante.....	93
Gráfico 4.3-6. Fotografías de la biomasa en el reactor pulsante, tomadas con estereomicroscopio.....	94
Gráfico 4.3-7. Resultados de la técnica FISH para biomasa del reactor pulsante, 100x...96	96

RESUMEN

Tres Reactores Secuenciales Discontinuos fueron operados bajo condiciones autótrofas aerobias para desarrollar biomasa granular con capacidad netamente nitrificante. Fueron aplicadas cargas de nitrógeno en el rango entre 50 a 500 mg/L incrementadas progresivamente. En el reactor R1 de condición amonio-oxidante se operó con cargas de nitrógeno amoniacal entre 250 y 400 mgN-NH₄⁺/L; en el reactor R3 (nitrito-oxidante) se operó con cargas de nitrógeno como nitrito comprendidas en el rango de 50 a 500 mgN-NO₂⁻/L, y en el reactor Rp (pulsante) de condición amonio y nitrito oxidante las cargas aplicadas de nitrógeno amoniacal fueron de 100 a 350 mgN-NH₄⁺/L.

Se obtuvieron altas eficiencias de remoción de nitrógeno amoniacal y de nitritos, para el reactor R1 se alcanzó el 85%, para el reactor R3 se logró un porcentaje de 90% a 100%, y para el reactor pulsante se logró un valor próximo al 100%.

En los últimos meses de operación los reactores R1 y Rp lograron desarrollar biomasa Anammox a partir de la inoculación de un lodo con bacterias de este tipo, adecuando previamente los sistemas a las condiciones necesarias para el proceso, esto es reduciendo progresivamente la concentración de oxígeno disuelto hasta alcanzar una nitrificación parcial. En el reactor pulsante se consiguió establecer el proceso CANON. Se confirmó mediante la técnica FISH, la presencia de bacterias tipo Anammox.

En los tres reactores se obtuvieron gránulos nitrificantes cuyo tamaño varió entre 0,4 y 4 mm de diámetro, de aspecto liso, de forma ovalada a redonda y de buenas características de sedimentación.

Finalmente se consiguieron sistemas estables, flexibles a las variaciones operacionales, con biomasa de alta actividad nitrificante para los tres reactores y con alta capacidad desnitrificante para los reactores R1 y Rp.

SUMMARY

Three Sequencing Batch Reactors were operated under autotrophic aerobic conditions to develop granular biomass with entirely ability to nitrification. Nitrogen loads between 50 and 500 mg/L were applied and increased progressively. The R1 reactor, with ammonium oxidative condition was operated with ammonium nitrogen loads between 250 and 400 mg N-NH₄⁺/L; the R3 reactor (of nitrite oxidative condition), was operated with nitrogen as nitrite loads between 50 and 500 mg N-NO₂⁻/L; and in Rp reactor (air pulsating reactor) of ammonium and nitrite oxidative condition, were applied ammonium nitrogen loads of 100 to 350 mg N-NH₄⁺/L.

High removal rates of ammonium and nitrite nitrogen were obtained, thus, to R1 reactor the efficiency was around 85%, to R3 reactor the maximal achieved efficiency was between 90 and 100%, finally to Rp reactor it was achieved efficiency nearly 100%.

During latest operation months, into R1 and Rp reactors, the dissolved oxygen concentration was progressively lowering until reaching partial nitrification and afterwards, was added an inoculum of sludge with Anammox bacteria. Both reactors managed to develop Anammox granular biomass, but previously the systems were adequate in top shape to occur the process. Inside the pulsating reactor was established the CANON process. It was confirmed by means of FISH technique, the presence of Anammox bacteria.

Into three reactors, R1, R3 and Rp, were obtained nitrifying granules with average size of diameter between 0.4 and 4.0 mm, moreover these granules shown smooth and oval to round shape and good settling characteristics.

In short, at the end of investigation, steady systems were developed, flexible to operate variations, with high nitrifying biomass activity inside the three reactors and high denitrifying capacity inside the R1 and Rp reactors.

PRESENTACIÓN

Existen indicios de que las antiguas civilizaciones Hitita y Romana, aproximadamente en el año 650 a.c., ya emplearon sistemas de lagunaje para la depuración de sus aguas residuales (Aspegren *et al.*, 1997), sin embargo en Europa hasta hace un poco más de un siglo, los desechos de origen antrópico y animal se almacenaban bajo tierra, eliminándose de tarde en tarde. Las condiciones sanitarias de la población eran precarias, pero como en la época no se conocía el rol de los microorganismos como patógenos, las razones que motivaron la construcción de redes de alcantarillado fueron la necesidad de agua limpia para las actividades industriales y las epidemias de cólera y peste que cobraron 60.000 vidas en Europa el siglo anterior (Bitton, 1994).

Los sistemas de alcantarillado no fueron suficientes para cumplir estos objetivos, por lo que el agua empezó a ser tratada antes de ser vertida a los ríos. Los primeros sistemas consistían en filtración mecánica y floculación química; más tarde al observar ciertas tendencias de las técnicas aplicadas, se fue comprendiendo el rol de las bacterias y se desarrollaron los lechos bacterianos. Las primeras instalaciones depuradoras de aguas residuales consistieron en sistemas de biopelícula fija.

En Estados Unidos, el tratamiento de las aguas residuales no fue atendido seriamente hasta fines del siglo XIX, porque simplemente eran dispuestas en grandes terrenos para ser evacuadas.

Desde entonces, los daños ambientales causados y las condiciones sanitarias han impulsado el desarrollo de sistemas cada vez más eficientes para la gestión de las aguas residuales, uno de los propósitos es la protección de la calidad de los recursos hídricos mediante alternativas que permitan la conservación y uso racional de los mismos.

Un aspecto importante para los diversos problemas que generan las aguas residuales es la presencia de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo y su relación con los estados eutróficos de las aguas y/o la toxicidad en los organismos. Los sistemas tradicionales no son lo suficientemente efectivos para eliminar estos compuestos, y esta ha sido la principal motivación para que un

sin número de investigaciones, entre ellas la presente, se hayan enfocado en tecnologías modernas para la eliminación de nutrientes y especialmente del nitrógeno.

Mediante estudios anteriores ya se han observado los buenos resultados al emplear Reactores Secuenciales Discontinuos, sin embargo, como para los procesos inherentes al nitrógeno son necesarias altas concentraciones de biomasa nitrificante, nuevas investigaciones sobre la agregación bacteriana en este tipo de reactores han resultado novedosas. A esto se suma el hecho de que, por aplicar los principios de sostenibilidad son necesarias las tecnologías de bajo costo y cada vez más eficientes, que además no generen fangos en exceso, se ha tratado de reducir la demanda de carbón orgánico en los procesos de desnitrificación, planteando para los investigadores un gran reto, al que han respondido con el estudio de biomasa autótrofa en sistemas conjuntos de nitrificación-desnitrificación.

Por lo tanto, el presente trabajo es una aplicación del conjunto de los principios que hasta ahora han resultado los más adecuados para un proceso completo de nitrificación-desnitrificación en el cual se conjugan: el uso de reactores multifásicos de poco volumen, los mecanismos de retención de altas concentraciones de biomasa específica, el desarrollo de bacterias netamente autótrofas para disminuir los requerimientos de carbono y las condiciones necesarias para la ocurrencia del proceso conjunto de nitrificación-desnitrificación.

Es deseable que este estudio sea de utilidad para encaminar las acciones necesarias que ayuden a solucionar los problemas graves de contaminación de los ríos que está sufriendo el Ecuador, y que sea también una herramienta de consulta enriquecedora para futuros investigadores en el tema.

CAPÍTULO I

1 GENERALIDADES

1.1 INTRODUCCIÓN

En los tradicionales sistemas de tratamiento biológico de lodos activos para la depuración de aguas residuales e industriales, existen grandes dificultades originadas por los fenómenos de flotación y formación de espumas. Estos problemas se conocen desde comienzos del siglo pasado y generalmente están asociados con la proliferación de microorganismos filamentosos, por lo que se han realizado muchas investigaciones para descubrir los motivos asociados a su crecimiento, y como evitarlos (Chudoba *et al.* 1994).

Los científicos han observado que los microorganismos filamentosos pertenecen a una amplia diversidad de especies, que se diferencian por aspectos como el comportamiento metabólico, morfología, afinidad de sustrato y oxígeno, velocidad de crecimiento y resistencia a la ausencia de sustrato. Estas diferencias impiden establecer un patrón general para concentraciones similares de distintas clases de estos microorganismos. Por otra parte, entre las causas que influyen en su proliferación se pueden citar: la edad del lodo, la concentración de sustrato soluble, la capacidad de acumulación de sustratos por parte de las bacterias, la composición del agua residual, la concentración de oxígeno disuelto y el régimen hidráulico en el tanque de aireación, entre otras. En honor a la variedad de parámetros que influyen en los fenómenos de flotación, es evidente que no es nada fácil identificar cuál de ellos es el responsable en cada caso, incluso se ha observado que un ligero cambio en la operación del sistema puede desembocar en la presencia de bacterias filamentosas.

Otra limitación importante de los sistemas tradicionales es la baja eficiencia en cuanto a la retención de biomasa al interior de la unidad de reacción, haciendo necesaria la implementación de una unidad adicional de sedimentación donde el lodo seleccionado por gravedad es recirculado al reactor. La clave para que exista una elevada concentración de biomasa es que el lodo tenga buena capacidad de sedimentación.

En respuesta a las mencionadas dificultades, el recién descubierto proceso de granulación de biomasa en condiciones aerobias, se ha propuesto como una

novedosa alternativa para el tratamiento de aguas residuales con el fin de solucionar los problemas de flotación (bulking), comunes en las plantas depuradoras con lodos activos. Sin embargo, actualmente aún no se dispone de suficiente información sobre el nuevo proceso de granulación aerobia, por lo cual, no se puede explicar con exactitud las razones por las que se generan los agregados microbianos ni las diferentes características que presentan en cada caso. Un aspecto clave para entender los mecanismos de estos complejos sistemas, es conocer con exactitud el tipo de microorganismos implicados y su relación con las características del medio en el que se desarrollan.

1.2 JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial y particularmente en el Ecuador es creciente el problema de la contaminación de las fuentes de agua como consecuencia de los asentamientos humanos y la actividad industrial no controladas. Uno de los tipos de contaminación más frecuente es la causada por la concentración excesiva de nutrimentos, especialmente de nitrógeno y fósforo. En condiciones normales estos compuestos provienen fundamentalmente de la degradación de la materia orgánica muerta y son esenciales para mantener los ecosistemas acuáticos; pero en condiciones del medio alteradas, los aportes adicionales proceden mayoritariamente de vertidos residuales urbanos y de ciertas instalaciones industriales, así como del uso creciente de fertilizantes y pesticidas en la agricultura, lo cual causa serios problemas de eutrofización de lagos, lagunas y ríos.

La remoción del fósforo no presenta seria preocupación debido a que se están eliminando las principales fuentes que lo originan, es decir, los detergentes y los pesticidas fosfatados, sin embargo el nitrógeno amenaza con incrementarse, sobre todo en zonas industriales como conserveras de mariscos y en zonas densamente pobladas. Un problema asociado, es que los compuestos nitrogenados presentes en el agua no solo causan eutrofización sino que además, forman parte del grupo de sustancias tóxicas para el ser humano. En el Ecuador, la necesidad de preocupación por este tema es urgente debido a que son contadas las plantas depuradoras de aguas residuales y prácticamente escasas aquellas que cuentan con tratamientos terciarios como es el caso del nitrógeno.

Por otra parte, es necesario aportar conocimientos sobre el tema de la nitrificación ya que en el país se han realizado muy pocos estudios al respecto, y es aún más importante si se estudian mecanismos y procesos novedosos, eficaces y viables, pues es vital que en el Ecuador se empiecen a establecer políticas de protección a las fuentes de agua y se realicen acciones para cumplirlas; la investigación en todos los aspectos relacionados con la depuración de aguas es un aspecto clave para el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan atenuar el grave problema de contaminación del recurso hídrico y las dificultades consecuentes como son la escasez y los conflictos sociales, las afecciones a la salud, la destrucción de ecosistemas, y otros problemas asociados.

1.3 HIPÓTESIS

Durante la operación de tres reactores SBR con biomasa en proceso de granulación, alimentada con una composición sintética y con otra procedente de una depuradora de aguas residuales; se aplican diferentes cargas nitrogenadas progresivamente y se varían las condiciones de operación, para obtener gránulos compactos que decanten o sedimenten fácilmente en un lapso de tiempo corto (entre diez y treinta minutos) y con una eficaz remoción del nitrógeno amoniacal y los nitritos (entre 50 y 100%). Además, se busca lograr la estabilización de los tres sistemas con altas cargas de nitrógeno en la alimentación (entre los 150 y 500 mg N/L).

En los casos en que exista biomasa oxidante de amonio se espera desarrollar el proceso conjunto de nitrificación-desnitrificación con biomasa autótrofa amonio oxidante y Anammox.

1.4 ALCANCE

Cada vez que se empieza a investigar un proceso que no es lo suficientemente comprobado ni conocido es necesario y recomendable empezar a escalas pequeñas, como la de laboratorio en investigaciones similares a la presente, y una vez logrados los objetivos planteados es factible realizar el escalado a experimentaciones piloto y luego a nivel industrial, de esta manera se optimizan los recursos económicos y se obtienen resultados más confiables. Esto es recomendable especialmente en casos en que se estudian procesos biológicos debido a las innumerables condiciones y factores que intervienen en dichos procesos.

La presente investigación, se ha llevado a cabo con la operación de reactores a escala de laboratorio, este aspecto simplifica la toma de muestras para los análisis de las mismas, así como la vigilancia de los reactores y los procesos que se efectúan en ellos. Por otra parte, el funcionamiento de un reactor secuencial discontinuo, está apoyado por un equipo automático denominado Controlador Lógico Programable (PLC) que permite al reactor cambiar de una etapa a otra automáticamente según los requerimientos del investigador, facilitando cualquier cambio de las condiciones del sistema para evaluar la sensibilidad del proceso a los incrementos de carga (nitrogenada en este caso), y en general, a la variación de las características de operación.

Los datos necesarios para la investigación han sido obtenidos gracias a una estancia de diez meses realizada en la Universidad de Santiago de Compostela (España), donde se contó con el material, equipo, recursos de toda índole y asesoramiento necesarios para efectuar el estudio.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar las ventajas y desventajas de la operación de reactores SBR para el proceso de nitrificación con biomasa granular bajo diferentes condiciones de operación.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener biomasa granular nitrificante a partir de inóculos de biomasa nitrificante heterótrofa responsable de la oxidación de la materia orgánica y de la desnitrificación, mediante la operación de tres reactores SBR en condiciones autótrofas y con distintos mecanismos.

Controlar la operación de los reactores y las características de la biomasa granular nitrificante, variando las condiciones de los reactores y aplicando diferentes cargas nitrogenadas.

Crear las condiciones necesarias en los reactores amonio oxidantes para analizar la probabilidad de desarrollar biomasa Anammox (desnitrificante).

Descubrir las dificultades técnicas en la operación de los reactores para el proceso de nitrificación.

1.6 IMPORTANCIA

Las experiencias en los procesos de eliminación biológica del nitrógeno en países donde se han aplicado, han presentado ciertos problemas como son la producción excesiva de lodos o fangos, los mismos que requieren un tratamiento o disposición adecuada; otros problemas son la baja eficiencia de remoción en los procesos y las grandes demandas de espacio, todo esto asociado a altos costos para la implementación y operación.

Por lo antes expuesto, se requieren procesos más eficientes, que atenúen las dificultades mencionadas y que además, sean accesibles a las industrias e incentiven a las autoridades nacionales a brindar apoyo para la investigación y desarrollo de estos proyectos con la finalidad de implementarlos posteriormente.

En países desarrollados, la investigación del proceso de nitrificación en reactores SBR con biomasa granular, ha tenido un corto tiempo pero gran éxito, pues resultan ser sistemas bastante eficaces que además ayudan a atenuar los requerimientos de espacio y disposición de fangos.

Sin embargo, aún no se cuenta con información suficiente sobre este proceso y se requiere investigar cuán eficientes pueden ser este tipo de reactores en comparación con otros que realizan la misma función y la capacidad de combinar ambos procesos (nitrificación y desnitrificación) en un mismo reactor para disminuir aún más, los requerimientos de espacio, recursos, y la producción de fangos.

También es necesario conocer la facilidad que puede tener el proceso para ser implementado a escala mayor (de planta piloto) y la variedad de tipos de efluentes que podrá tratar.

CAPÍTULO II

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRESENCIA DE NUTRIMENTOS EN LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS EN EL ECUADOR.

Las aguas residuales domésticas que se producen como resultado de las actividades humanas vitales, contienen porcentajes importantes de nutrimentos como nitrógeno y fósforo. En el Ecuador, como es sabido, este tipo de aguas no reciben ningún tipo de tratamiento y son descargadas a los cauces de los ríos en cada zona poblada, provocando la contaminación del agua y alterando los usos potenciales del recurso hídrico.

Este problema impide que el agua esté a disposición de las diversas actividades como la agricultura, el consumo humano, la ganadería, entre otras, ya que reduce la cantidad de agua apta para ser tratada, cuando al mismo tiempo la demanda del recurso en condiciones potables aumenta cada vez más, no solo por las necesidades domésticas sino también industriales.

En el país tampoco se han instalado estaciones adecuadas de monitoreo de la calidad del agua de los ríos, por lo tanto, no se dispone de un registro que exprese la situación de la concentración de los diversos contaminantes en los cauces que sirven como sitio de descarga de las aguas residuales.

En el presente capítulo se estimará la situación de la presencia de nutrimentos en las aguas residuales, en base a una caracterización generalizada de las aguas residuales domésticas, la producción per cápita de aguas residuales y la distribución de la población del Ecuador estimada para el año 2008.

2.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL AGUA RESIDUAL DOMÉSTICA

El agua residual doméstica está compuesta por diferentes cantidades de elementos que alteran las características físicas, químicas y biológicas del agua potable. Distintos autores han caracterizado la composición del agua residual doméstica en base a estadísticas ponderadas con muestras tomadas en diferentes países.

La Tabla 2.1-1 presenta una típica caracterización de los efluentes residuales cuando no han recibido ningún tipo de tratamiento:

Tabla 2.1-1. Composición típica de agua residual doméstica no tratada.

COMPUESTO		CONCENTRACIÓN		
		Máxima	Media	Mínima
Sólidos totales	mg/L	1200	720	350
Totales disueltos	mg/L	850	500	250
Fijos	mg/L	525	300	145
Volátiles	mg/L	325	200	105
Suspendidos totales	mg/L	350	220	100
Fijos	mg/L	75	55	20
Volátiles	mg/L	275	165	80
Sólidos sedimentables	mL/L	20	10	5
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) en día 5 a 20 C	mg/L	400	220	110
Carbono Orgánico Total (TOC)	mg/L	290	160	80
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/L	1000	500	250
Nitrógeno (total como N)	mg/L	85	40	20
Orgánico	mg/L	35	15	8
Amonio libre	mg/L	50	25	12
Nitritos	mg/L	0	0	0
Nitratos	mg/L	0	0	0
Fósforo (total como P)	mg/L	15	8	4
Orgánico	mg/L	5	3	1
Inorgánico	mg/L	10	5	3
Cloruros	mg/L	100	50	30
Alcalinidad (como CaCO ₃)	mg/L	200	100	50
Grasa	mg/L	150	100	50

Fuente: Urcola, 1998.

Las celdas sombreadas muestran los datos que se utilizaron para el presente análisis.

2.1.2 DISTRIBUCIÓN ESTIMADA DE LA POBLACIÓN PARA EL AÑO 2008

La Superintendencia de Telecomunicaciones del Ecuador realizó estimaciones de la población para el año 2008, en base a los datos del VI censo de población recopilados por el Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos (INEC).

La Tabla 2.1-2 presenta la distribución del número de habitantes por provincias en el Ecuador, estimados para septiembre del 2008:

Tabla 2.1-2. Población del Ecuador por provincias para septiembre de 2008.

Población estimada por provincias (Septiembre 2008)			
Habitantes			
Azuay	663.754	Manabí	1'295.463
Bolívar	178.848	Morona Santiago	140.310
Cañar	218.563	Napo	96.853
Carchi	160.406	Pastaza	78.668
Cotopaxi	402.877	Zamora Chinchipe	83.669
Chimborazo	432.031	Sucumbíos	176.553
Imbabura	404.573	Orellana	94.474
Loja	418.870	Galápagos	27.578
Tungurahua	498.213	Pichincha	2'517.033
El Oro	610.058	Guayas	3'621.884
Esmeraldas	432.254	Santo Domingo	367.901
Los Ríos	739.417	Santa Elena	295.363
Zonas no delimitadas		73.586	
TOTAL		14'029.199	
Ciudades más importantes:			
Cuenca		481.360	
Guayaquil		2'398.658	
Quito		2'207.231	

Fuente: Superintendencia de Telecomunicaciones

Según estos datos, el número de habitantes para las 3 ciudades más importantes del país, representa más del 50% del número total de habitantes de la provincia a la que corresponden, lo cual significa que la población de estas provincias ha migrado hacia la ciudad, como es la tendencia en todo el Ecuador. En base a estos antecedentes, y tomando en cuenta que no existe tratamiento para las aguas residuales domésticas en las ciudades del país con excepción de la ciudad de Cuenca, es necesario enfocar esfuerzos para el desarrollo de proyectos encaminados a depurar las aguas contaminadas y así prevenir el deterioro de la calidad de los recursos hídricos, ya que a medida que incrementa la población, la demanda del servicio de agua potable también resultará incrementada y sería un conflicto muy grave el no contar con la cantidad ni calidad de agua requeridas, así como también el tener que asumir los altos costos futuros por remediación del recurso.

Con la información presentada anteriormente en las Tablas 2.1-1 y 2.1-2 se realizaron los cálculos respectivos para estimar la cantidad de nutrientes que son

descargados a los cursos hídricos, sin embargo es necesario conocer primero otro dato importante que se señala a continuación.

2.1.3 PRODUCCIÓN PER-CÁPITA DE AGUAS RESIDUALES

La producción per-cápita de aguas residuales está directamente relacionada con la dotación de agua potable, de tal manera que la relación entre la primera y la segunda resulta generalmente en un valor de 0,8 conocido como coeficiente de retorno (Campos, 1994):

$$\frac{P_{\text{per-cápita AR}}}{D_{\text{per-cápita AP}}} = 0,8 \quad \text{Ecuación 2.1-}$$

1

Donde:

$P_{\text{per-cápita AR}}$: Producción per-cápita de aguas residuales (L/hab/d).

$D_{\text{per-cápita AP}}$: Dotación per-cápita de agua potable (L/hab/d).

En el Ecuador debido a la diversidad de las condiciones de vida de sus habitantes, no existe un valor promedio ponderado que exprese la realidad nacional, la variación en la cantidad de agua que consumen los pobladores de una ciudad a otra varían ampliamente y más aún si la comparación se realiza en entre las zonas rurales y las urbanas.

Según un informe de la Universidad Técnica del Norte, por ejemplo en Quito, la dotación per-cápita se ha estimado entre 250 y 500 L/hab/d, mientras que en comunidades rurales es de 80 a 100 L/hab/d. Durante los últimos años en Cuenca, la dotación se ha incrementado de 225 a 270 L/hab/día y en ciudades de la provincia de Manabí este dato se encuentra alrededor de los 150 L/hab/día. Por otro lado, también existen comunidades que no tienen acceso fácil al servicio de agua potable, y consumen en general, cantidades en el orden de 50 L/hab/d de agua, tomada directamente de los ríos o vertientes.

Debido a estos aspectos y para facilitar el desarrollo del presente capítulo, se asumió una dotación per-cápita promedio de 250 L/hab/d; sin embargo, para obtener la producción per-cápita que es el dato requerido se utilizó el factor 0,8 tal

como lo expresa la ecuación 2.1. La producción per-cápita por tanto, se estimó en **200 L/hab/d.**

2.1.4 PRODUCCIÓN DE NUTRIENTES

Para calcular la producción total de nutrientes para una población dada, se puede realizar un cálculo sencillo en base a la ecuación 2.2:

$$P = \frac{[\text{nutriente}] \cdot P_{\text{per-cápita AR}} \cdot \text{Población}}{1000^2} \quad \text{Ecuación 2.1-}$$

2

Donde:

P: Producción de nutrimentos en (kg/d)

[*nutriente*]: Concentración del nutriente en (mg/L)

Población: Número de habitantes en el centro poblado (hab)

Se calcularon las producciones de nitrógeno total, nitrógeno amoniacal y fósforo total, los resultados obtenidos se presentan en las tablas 2.1-3, 2.1-4 y 2.1-5:

Tabla 2.1-3. Producción diaria de nitrógeno total (kg/d), por provincias en el Ecuador.

Producción actual estimada de Nitrógeno total (kg/d)							
Provincia	P máx	P media	P mín	Provincia	P máx	P media	P mín
Azuay	11283.8	5310.0	2655.0	Manabí	22022.9	10363.7	5181.9
Bolívar	3040.4	1430.8	715.4	Morona Santiago	238.5	112.2	56.1
Cañar	3715.6	1748.5	874.3	Napo	1646.5	774.8	387.4
Carchi	2726.9	1283.2	641.6	Pastaza	1337.4	629.3	314.7
Cotopaxi	6848.9	3223.0	1611.5	Zamora Chinchipe	1422.4	669.4	334.7
Chimborazo	7344.5	3456.2	1728.1	Sucumbíos	3001.4	1412.4	706.2
Imbabura	6877.7	3236.6	1618.3	Orellana	1606.1	755.8	377.9
Loja	7120.8	3351.0	1675.5	Galápagos	468.8	220.6	110.3
Tungurahua	8469.6	3985.7	1992.9	Pichincha	42789.6	20136.3	10068.1
El Oro	10371.0	4880.5	2440.2	Guayas	61572.0	28975.1	14487.5
Esmeraldas	7348.3	3458.0	1729.0	Santo Domingo	6254.3	2943.2	1471.6
Los Ríos	12570.1	5915.3	2957.7	Santa Elena	5021.2	2362.9	1181.5
Zonas no delimitadas					1251.0	588.7	294.3
TOTAL					238496.4	112233.6	56116.8
Ciudades más importantes:							
Cuenca					818.3	385.1	192.5
Guayaquil					40777.2	19189.3	9594.6

Quito	37522.9	17657.8	8828.9
-------	---------	---------	--------

Se observa que las máximas producciones les corresponden a las dos ciudades más importantes, Guayaquil y Quito. Y si para el caso de Quito por ejemplo, se realiza el cálculo de la cantidad de nitrógeno total que se descarga en el río Machángara, utilizando la ecuación 2.3:

$$[N] = \frac{P}{86,4 \cdot Q} = \frac{37522,9}{86,4 \cdot (2)} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde:

[N]: Concentración del nitrógeno en el río (mg/L)

P: Producción de nitrógeno total del poblado que descarga al río (kg/d)

Q: Caudal del río (m³/s);

La concentración máxima de nitrógeno total en el río, resulta en 217 mg/L y la concentración mínima en 50 mg/L, cuando la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua, del Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA), promulgado en el Decreto Ejecutivo 3516, el 31 de marzo del 2003, admite hasta 15 mg/L de nitrógeno total en cuerpos de agua dulce.

Tabla 2.1-4. Producción diaria de amonio libre (kg/d), por provincias en el Ecuador.

Producción actual estimada de Amonio libre (kg/d)							
Provincia	P máx	P media	P mín	Provincia	P máx	P media	P mín
Azuay	6637,5	3318,8	1593,0	Manabí	12954,6	6477,3	3109,1
Bolívar	1788,5	894,2	429,2	Morona Santiago	1403,1	701,6	336,7
Cañar	2185,6	1092,8	524,6	Napo	968,5	484,3	232,4
Carchi	1604,1	802,0	385,0	Pastaza	786,7	393,3	188,8
Cotopaxi	4028,8	2014,4	966,9	Zamora Chinchipe	836,7	418,3	200,8
Chimborazo	4320,3	2160,2	1036,9	Sucumbíos	1765,5	882,8	423,7
Imbabura	4045,7	2022,9	971,0	Orellana	944,7	472,4	226,7
Loja	4188,7	2094,4	1005,3	Galápagos	275,8	137,9	66,2
Tungurahua	4982,1	2491,1	1195,7	Pichincha	25170,3	12585,2	6040,9
El Oro	6100,6	3050,3	1464,1	Guayas	36218,8	18109,4	8692,5
Esmeraldas	4322,5	2161,3	1037,4	Santo Domingo	3679,0	1839,5	883,0
Los Ríos	7394,2	3697,1	1774,6	Santa Elena	2953,6	1476,8	708,9
Zonas no delimitadas					735,9	367,9	176,6
TOTAL					140292,0	70146,0	33670,1

Ciudades más importantes:			
Cuenca	4813,6	2406,8	1155,3
Guayaquil	23986,6	11993,3	5756,8
Quito	22072,3	11036,2	5297,4

Según la Dirección Metropolitana de Medio Ambiente apenas el 61% de las cargas residuales que se descargan en el río Machángara provienen de fuentes domésticas, mientras que el restante 39% corresponde a efluentes industriales de las instalaciones cercanas al río. Además, cabe resaltar que los datos analizados en las tablas 2.1-3 y 2.1-4 solo cubren las descargas provenientes de aguas residuales domésticas y no de actividades industriales que son las que más contribuyen a la carga nitrogenada debido a las altas concentraciones de compuestos de nitrógeno, sin embargo, no es posible realizar una estimación de las descargas industriales, ya que no se dispone de la información necesaria para el efecto.

Para el caso del nitrógeno amoniacal en el río Machángara, las concentraciones calculadas corresponden a un valor máximo de 128 mg/L y mínimo de 30 mg/L, que sobrepasan los límites recomendados por Abielovich y Azov, 1976 y Muir, 1982; para no causar toxicidad en ciertas algas (28 mg/L) y peces (0,1 mg/L).

Las producciones calculadas de fósforo total se presentan en la tabla 2.1-5:

Tabla 2.1-5. Producción diaria de fósforo total (kg/d), por provincias en el Ecuador.

Producción actual estimada de Fósforo total (kg/d)							
Provincia	P máx	P media	P mín	Provincia	P máx	P media	P mín
Azuay	1991,3	1062,0	531,0	Manabí	3886,4	2072,7	1036,4
Bolívar	536,5	286,2	143,1	Morona Santiago	420,9	224,5	112,2
Cañar	655,7	349,7	174,9	Napo	290,6	155,0	77,5
Carchi	481,2	256,6	128,3	Pastaza	236,0	125,9	62,9
Cotopaxi	1208,6	644,6	322,3	Zamora Chinchipe	251,0	133,9	66,9
Chimborazo	1296,1	691,2	345,6	Sucumbíos	529,7	282,5	141,2
Imbabura	1213,7	647,3	323,7	Orellana	283,4	151,2	75,6
Loja	1256,6	670,2	335,1	Galápagos	82,7	44,1	22,1
Tungurahua	1494,6	797,1	398,6	Pichincha	7551,1	4027,3	2013,6
El Oro	1830,2	976,1	488,0	Guayas	10865,7	5795,0	2897,5
Esmeraldas	1296,8	691,6	345,8	Santo Domingo	1103,7	588,6	294,3
Los Ríos	2218,3	1183,1	591,5	Santa Elena	886,1	472,6	236,3
Zonas no delimitadas					220,8	117,7	58,9
TOTAL					42087,6	22446,7	11223,4

Ciudades más importantes:			
Cuenca	1444,1	770,2	385,1
Guayaquil	7196,0	3837,9	1918,9
Quito	6621,7	3531,6	1765,8

La concentración máxima de fósforo total en el río Machángara, se estimó en 38 mg/L y en 10 mg/L la mínima. La norma de calidad del recurso hídrico del TULSMA establece el valor límite en 15 mg/L, por lo que hay cumplimiento para los valores mínimos pero no para los máximos.

Otro aspecto cuestionable se refiere a los tratamientos convencionales de aguas residuales, como los existentes en las ciudades de Manta y la Península de Santa Elena, en donde existen sistemas de lagunas anaerobias seguidas de lagunas facultativas en cuyo diseño no se ha considerado el alto contenido de amonio en las aguas que ingresan al sistema y han fracasado debido a que se establecen procesos de competición entre microorganismos, dando lugar a la proliferación exagerada de bacterias filamentosas que ocasionan los conocidos problemas de flotación o “bulking”.

Las aguas residuales de Manta, que poseen un contenido de nitrógeno amoniacal de 40 mgN-NH₄⁺/L, al ser tratadas con fases aerobias tradicionales incrementan la concentración de nitrógeno amoniacal aproximadamente en un 25%, resultando valores muy por encima de los recomendados para el mantenimiento equilibrado de las condiciones eutróficas.

Con todos estos datos, se reafirma la importancia de contar con unidades de tratamiento efectivas, con pequeño volumen y con alta capacidad de remoción de los nutrimentos de las aguas residuales; que además sean rentables y de fácil operación.

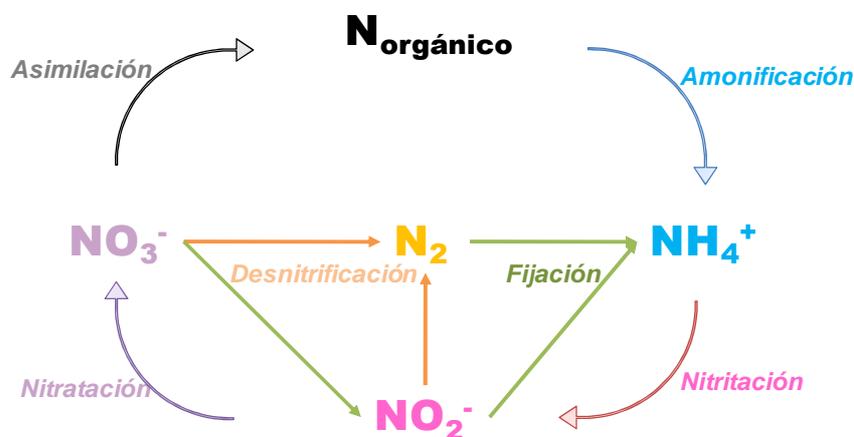
2.2 PROCESOS DE NITRIFICACIÓN Y DESNITRIFICACIÓN.

La eliminación de nitrógeno en las aguas residuales se efectúa por métodos fisicoquímicos y biológicos. Los primeros, más que resolver el problema, trasladan el contaminante de un medio a otro, en cambio los procesos biológicos denominados “no asimilativos” como la nitrificación y la desnitrificación constituyen la manera más efectiva, sostenible y económicamente factible para eliminar el nitrógeno del agua. Esto es posible gracias a la existencia de microorganismos para los cuales, los nutrientes derivados del nitrógeno, son claves para su crecimiento en concentraciones elevadas (Gómez, J. *et al.*, 2000).

Todos los animales, plantas y muchos microorganismos necesitan nitrógeno para producir aminoácidos, proteínas o ácidos nucleicos, sin embargo, la principal fuente de nitrógeno que se encuentra en la atmósfera en forma de gas no es asimilable para la mayoría de organismos. Por el contrario, las diversas formas combinadas en las que se encuentra el nitrógeno, como son amoníaco, nitrato y compuestos orgánicos son a menudo factores limitantes para el desarrollo celular. Por tal motivo, la transformación constante de compuestos nitrogenados es de gran importancia para la provisión de las formas requeridas del nitrógeno (Blackburn, 1998).

La nitrificación-desnitrificación es el proceso biológico natural y a la vez, el más común para la remoción de nitrógeno de los efluentes domiciliarios e industriales.

Gráfico 2.2-1. El Ciclo del Nitrógeno en el tratamiento de aguas residuales



2.2.1 NITRIFICACIÓN

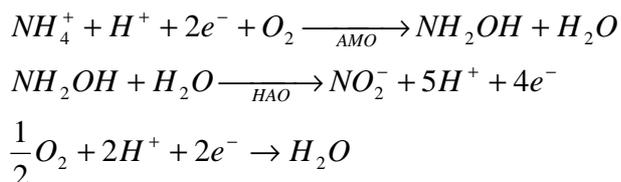
En las aguas residuales, se encuentran formas nitrogenadas provenientes de las excretas animales, resultantes de las funciones metabólicas. Por su parte las plantas tras la muerte, liberan directamente el nitrógeno en forma de amonio como producto de las transformaciones del nitrógeno orgánico (amonificación). Por tanto, las formas más comunes de incorporación del nitrógeno a las aguas residuales son aminos, amonio, la úrea y el ácido úrico. No obstante, estas formas son rápidamente transformadas mediante la hidrólisis de las proteínas y los ácidos nucleicos con la liberación de aminoácidos y bases orgánicas nitrogenadas, para que posteriormente los compuestos más sencillos sean reducidos a formas amoniacales mediante la acción de proteasas o exonucleasas (Atlas y Bartha, 1998). Es por ello, que durante el recorrido normal de las aguas residuales hacia la estación depuradora, el 90% de las formas nitrogenadas son transformadas a amonio (Culp, *et al.*, 1978), y es éste, el punto de partida del proceso de nitrificación.

En general, el agua residual contiene nitrógeno en exceso comparado con el consumo en carbono por los microorganismos, así, solo una pequeña parte del nitrógeno será asimilado al incorporarse a la biomasa bacteriana, haciendo necesaria la eliminación por otros procesos (Gray, N.F., 1990; Degrémont, 1991; Water Research Center, 1971).

Desde la óptica del tratamiento biológico de aguas residuales, la nitrificación es un proceso realizado por microorganismos aerobios, que usan el oxígeno molecular (O_2) como oxidante o aceptor de electrones, para transformar unos compuestos nitrogenados de efluentes domiciliarios e industriales, en otros menos tóxicos y perjudiciales. El proceso es realizado por microorganismos Gram-negativos heterótrofos y/o autótrofos. Los heterótrofos obtienen carbono de la oxidación de la materia orgánica; sin embargo el proceso nitrificante más común es realizado por bacterias autótrofas de la familia *Nitrobacteraceae* que usan dióxido de carbono (CO_2) como fuente de carbono (Prosser, 1989; Bock *et al.*, 1995; Gómez-Hernández *et al.*, 1995).

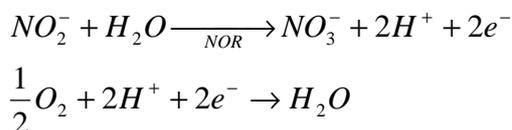
La nitrificación fue descubierta por Sergei Vinogradski; y haciendo referencia a las bacterias autótrofas, consiste en dos fases consecutivas en las que intervienen diferentes especies de microorganismos:

La primera fase es la nitrosación o nitritación, durante ésta, bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosolobus* principalmente, realizan la transformación de amonio a nitrito con la intervención de la enzima amonio mono oxigenasa (AMO) que convierte el amonio en hidroxilamina, para que posteriormente la enzima hidroxilamina óxido reductasa (HAO) realice la conversión a nitrito (Kroneck *et al.*, 1992; Hooper *et al.*, 1997).



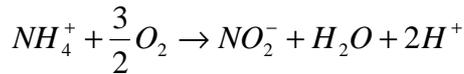
La generación de los iones hidrógeno (H^+) en esta fase, es responsable de la acidificación o descenso de pH en medios cerrados, lo cual puede causar un efecto inhibitorio en el proceso global.

La segunda fase conocida como nitratación, es la conversión de nitritos a nitratos y durante años se le acreditó a la participación mayoritaria de las bacterias pertenecientes a los géneros *Nitrobacter* y *Nitrosococcus*, sin embargo, las técnicas actuales de marcaje de ADN han determinado que el género dominante es *Nitrospira* (Schramm *et al.*, 1998). Las bacterias oxidantes de nitrito, emplean el complejo enzimático nitrito óxido reductasa (NOR), que está compuesto por el citocromo *c*, una quinona y una deshidrogenasa dependiente de la NADH (Nicotinamida Adenín Dinucleótido reducida ó llamada también Coenzima 1) (Gómez *et al.*, 2000). El sistema oxidante de nitrito está ligado a la membrana, las bacterias que lo poseen se caracterizan por presentar un color pardo (O' Kelly *et al.*, 1970).



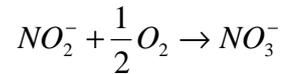
De las ecuaciones generales que representan los dos procesos, se puede deducir que requieren oxígeno y energía externa para efectuarse, ya que están termodinámicamente desfavorecidas (Vázquez, 2005).

Nitrosación



$$-\Delta G_{298} = 240 - 350 [kJ/mol]$$

Nitratación



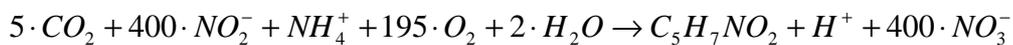
$$-\Delta G_{298} = 65 - 90 [kJ/mol]$$

El bajo crecimiento y la baja productividad de los organismos autótrofos, hace que el 95% de la energía que obtienen se transforme en calor y sólo el bajo porcentaje restante sea usado para la síntesis celular en base a carbonatos, bicarbonatos y dióxido de carbono. Las productividades están expresadas en g SSV (sólidos suspendidos volátiles) por gramo de sustrato consumido, así para las bacterias del género *Nitrosomonas*, el crecimiento se asume como 0,15 g SSV/g N-NH₄⁺ y para las bacterias responsables de la oxidación de nitritos, representadas por el género *Nitrobacter*, la productividad se asume como 0,02 g SSV/g N-NO₂⁻. Con estos valores se obtienen las ecuaciones estequiométricas globales de los procesos (Vázquez, 2005):

Nitrosación:



Nitratación:

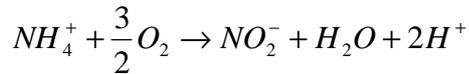


2.2.1.1 Condiciones para la nitrificación

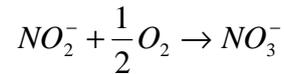
El proceso de nitrificación está determinado por la velocidad de crecimiento de los microorganismos nitrificantes. La velocidad de crecimiento de las bacterias del género *Nitrosomonas* es ligeramente menor que para las bacterias del género *Nitrobacter*, por lo tanto, se puede deducir que el proceso limitante es la Nitrosación, y el sustrato limitante es el nitrógeno amoniacal (Ossenbruggen *et al.*, 1996; Larrea, 1998).

Por otra parte, según Eckenfelder y Musterman (1995), para que un gramo de nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺) sea oxidado a nitrato (N-NO₃⁻), son necesarias las condiciones siguientes:

- ✓ 4,6 gramos de oxígeno molecular (O₂)
- ✓ 7,15 gramos de alcalinidad como CaCO₃
- ✓ 0,15 gramos de nuevas células
- ✓ 0,08 gramos de carbono inorgánico

Nitrosación

58 – 84 [kcal]

Nitratación

15 – 21 [kcal]

La energía liberada en las reacciones particulares del proceso de nitrificación, es usada por las bacterias para su crecimiento. Las reacciones indican que las bacterias del género *Nitrosomonas* disponen de mayor energía por mol de nitrógeno oxidado que las bacterias del género *Nitrobacter*. Esto explica el hecho de que *Nitrosomonas* se encuentren en mayor cantidad, y que *Nitrobacter* requiera el triple de sustrato que *Nitrosomonas* para obtener la misma cantidad de energía. Con frecuencia, la población de *Nitrobacter* es un tercio de la población de *Nitrosomonas* (Cheremisinoff, 1995).

2.2.1.2 Factores cinéticos para el proceso de nitrificación

La cinética en los procesos biológicos está estrechamente relacionada con la velocidad de crecimiento de las bacterias que intervienen, no obstante, existen muchos factores simultáneos que afectan dicha velocidad. Para el caso puntual de la nitrificación, la ecuación de Monod es la aproximación más aceptada para describir el comportamiento de las bacterias nitrificantes porque explica el crecimiento en función de un sustrato limitante e incluye un coeficiente de decaimiento bacteriano (Vázquez, 2005):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_S + S} - K_d$$

Ecuación 2.2-1

Donde:

μ : velocidad de crecimiento bacteriano (d^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima de crecimiento bacteriano (d^{-1})

S: concentración de sustrato (mg/L)

K_S : constante de saturación media (mg/L)

K_d : constante de decaimiento [mg/(mg·d)]

Los coeficientes cinéticos estadísticos para las bacterias oxidantes de amonio y nitrito, comparados con los coeficientes de bacterias heterótrofas han sido propuestos por Wiesmann (1994) y se muestran en la tabla 2.2-1:

Tabla 2.2-1. Coeficientes cinéticos para bacterias nitrificantes, a T = 20°C y pH = 8

Parámetro		Tipos de bacterias		
		Nitrosomonas	Nitrobacter	Heterótrofas
$\mu_{\text{máx}}^*$	d^{-1}	0,77	1,08	7,2
Kd	$\frac{mg}{mg \cdot d}$	0,048	0,048	0,24
$Y^{\circ}O_2$	$\frac{g O_2}{g N}$	3,16	1,11	0,6
$Y^{\circ}B/N$	$\frac{g SSV}{g N}$	0,147	0,042	0,43
$Y^{\circ}B/O_2$	$\frac{g SSV}{g O_2}$	0,047	0,018	—
KSH	$\frac{mg N}{L}$	0,028	0,00032	—
KIH	$\frac{mg N}{L}$	0,028	0,26	—
KO ₂	$\frac{mg O_2}{L}$	0,3	1,1	0,008

Fuente: Vázquez, 2005

*Según el Manual de Metcalf y Eddy (1995)

Donde:

Kd: constante de decaimiento

$Y^{\circ}O_2$: consumo de oxígeno por gramo de nitrógeno oxidado

$Y^{\circ}B/N$: productividad de biomasa por gramo de nitrógeno oxidado

$Y^{\circ}B/O_2$: productividad de biomasa por gramo de oxígeno consumido

$\mu_{\text{máx}}$: velocidad máxima de crecimiento bacteriano

KSH: constante de saturación media de amonio

KIH: constante de inhibición

KO₂: constante de saturación media de oxígeno

Hernández-Lehmann (1997), en estudios experimentales obtuvo fórmulas para estimar la tasa de crecimiento específico máximo para bacterias nitrificantes, oxidantes de amonio y nitrito. Estos estudios corroboran lo expresado

anteriormente, *Nitrosomonas* son el factor limitante del proceso global. Las ecuaciones propuestas son las siguientes:

$$\begin{array}{l} \textit{Nitrosomonas} \\ \mu_{m\acute{a}x} = 0,47 \cdot (1,10)^{(T-15)} \end{array} \qquad \textbf{Ecuaci3n 2.2-2}$$

$$\begin{array}{l} \textit{Nitrobacter} \\ \mu_{m\acute{a}x} = 0,78 \cdot (1,06)^{(T-15)} \end{array} \qquad \textbf{Ecuaci3n 2.2-3}$$

Donde:

T es la temperatura del agua residual (8-30°C)

En la tabla 2.2-1 se puede observar que la productividad y el crecimiento de las bacterias heter3trofas son mucho mayores que para las nitrificantes, lo que hace necesarios tiempos prolongados de retenci3n celular para que se efect3e el proceso de nitrificaci3n, condicionando el volumen de los reactores en los sistemas de lodos activos, en los cuales adem3s se reduce el rendimiento nitrificante en presencia de materia org3nica debido a la competencia por el ox3geno entre las bacterias heter3trofas y nitrificantes (V3zquez, 2005).

En cuanto a los factores que influyen en la nitrificaci3n, se pueden citar como principales los siguientes:

2.2.1.2.1 *La temperatura.*

Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a los cambios bruscos de temperatura porque afectan la velocidad de crecimiento e influyen en la constante de saturaci3n de ox3geno. El rango de temperatura en el cual se ha observado el crecimiento de organismos nitrificantes es de 0 a 50 °C, sin embargo siempre necesitan un tiempo de aclimataci3n; los valores 3ptimos se encuentran entre los 30 a 36 °C. La nitrificaci3n no ocurre en condiciones term3filas (temperaturas mayores a 50 °C).

2.2.1.2.2 *El pH*

La influencia del pH obedece a tres causas:

La principal es la inhibici3n por sustancias cuya producci3n depende del pH, estas sustancias a menudo son el amon3aco y el 3cido nitroso libres que son inhibidoras

de la actividad bacteriana oxidante tanto de amonio como de nitrito respectivamente.

La presencia de NH_3 a concentraciones de 10 a 150 mg N- NH_3 /L inhibe a las bacterias *Nitrosomonas* disminuyendo notablemente la oxidación de amonio. A concentraciones de 0,1 a 1,0 mg N- NH_3 /L, el amonio libre inhibe la oxidación de nitrito realizada por las bacterias *Nitrobacter* y este mismo efecto es producido por el ácido nitroso a concentraciones de 0.2 a 2.8 mg N- HNO_2 /L.

Debido a que el pH y la temperatura influyen en el equilibrio entre los compuestos ionizados y no ionizados de nitrógeno, la inhibición por amonio puede ser despreciable cuando el pH tenga valores menores a 9 y la concentración de nitrógeno sea menor que 65 mg N/L. El efecto del pH aumenta, cuando la temperatura disminuye (Anthonisen *et al.*, 1976).

Otra causa está asociada al efecto de activación–desactivación relacionado con el equilibrio entre los iones OH^- y H^+ . Para que esta condición ocurra, el valor óptimo de pH debe estar entre 7,5 y 8,5 en las dos fases del proceso nitrificante. En plantas de tratamiento de aguas residuales la nitrificación de altas cargas a valores de pH inferiores al óptimo, se lleva a cabo solo si el lodo ha sido aclimatado previamente, si no es así, se debe controlar el pH en especial cuando las aguas residuales tienen poco poder tampón.

La tercera causa responde al efecto de los nutrientes, y se debe en parte a la forma en que el carbono mineral está disponible para las bacterias autótrofas, ya que el equilibrio químico en las reacciones de conversión de carbonatos a bicarbonatos y a dióxido de carbono depende del pH (Vázquez, 2005).

2.2.1.2.3 El oxígeno disuelto

El efecto del oxígeno disuelto puede ser explicado al aplicar la ecuación de Monod considerando al oxígeno como sustrato limitante. Las bacterias nitrificantes son afectadas en mayor grado que las heterótrofas por las concentraciones bajas de oxígeno, que a la vez provocan una acumulación de nitritos debida a la diferencia en los parámetros cinéticos de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. A valores menores que 0,5 mg OD/L la velocidad de crecimiento de las bacterias nitrificantes disminuye significativamente, mientras que para valores inferiores a 0,2 mg OD/L es nula. A concentraciones de OD elevadas, incluso

hasta 60 mg OD/L, no se ha observado efecto sobre la nitrificación y se considera que el crecimiento es máximo a 7 mg OD/L.

2.2.1.2.4 *La concentración de sustratos*

La concentración de sustratos interviene en las cinéticas de crecimiento de los microorganismos nitrificantes, altas concentraciones de amonio influirán en el crecimiento de las bacterias oxidantes de amonio y el nitrito afectará a las oxidantes de nitrito.

2.2.2 **DESNITRIFICACIÓN**

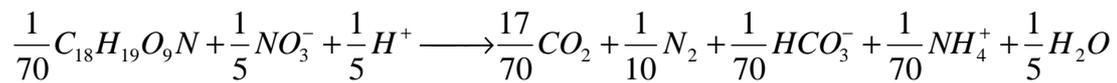
El proceso de desnitrificación fue descubierto cuando Smith (1867) observó que el nitrógeno en forma de nitrato desaparecía de las aguas residuales que contenían materia orgánica. Más tarde Reiset y Schloesingⁱ llegaron a la conclusión de que ciertas bacterias eran responsables de la conversión de nitrato a nitrógeno molecular.

Por tanto, la desnitrificación es la eliminación biológica del nitrógeno en forma de nitritos o nitratos (que intervienen a la vez como aceptores de electrones) a nitrógeno gas por reducción desasimilatoria. Para que el proceso ocurra se requieren condiciones anaerobias o modificaciones de condiciones aerobias y actúan generalmente bacterias heterótrofas aunque también pueden ser quimiotrofas. Los géneros más conocidos son *Pseudomonas*, *Paraccocus*, *Microccocus*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Spirillum*, *Alcalígenes*, *Aerobacter*, *Thiobacillus*, *Bacillus*. Además se pueden encontrar involucradas en el proceso arqueobacterias y eubacterias (Payne, 1981; Knowles, 1982; Atlas y Bartha, 1998; Prescott, 1999; Vázquez, 2005).

Los microorganismos desnitrificantes se encuentran ampliamente extendidos en la naturaleza, pues la mayoría son aerobios facultativos. Un claro ejemplo son especies de *Bacillus* y *Chromobacterium* que pueden crecer aeróbicamente cuando disponen de oxígeno, pero pueden vivir facultativamente en ausencia de oxígeno realizando desnitrificación o fermentación (Gómez, 1998).

ⁱ No se dispone de información sobre el año de publicación.

La mayoría de bacterias desnitrificantes son heterótrofas, es decir requieren una fuente de carbono que actúe como donador de electrones para realizar el proceso y para su crecimiento. Según Vázquez (2005), si esta fuente proviene de la materia orgánica que compone a las aguas residuales, la estequiometría del proceso global sería:



Tal como muestra la ecuación estequiométrica, el proceso genera un incremento en la alcalinidad del medio, sin embargo es un problema que puede ser atenuado si se usa amonio como fuente de nitrógeno. De hecho, los microorganismos desnitrificantes prefieren asimilar amonio que nitrato (Vázquez, 2005).

Por otro lado, existen también bacterias capaces de realizar desnitrificación autótrofa en donde actúan como donadores de electrones, compuestos de azufre como azufre elemental, tiosulfato o incluso sulfuro en poca cantidad. Según Flere y Zhang (1998) y Ronzano y Dapena (1995), para que 1 g N-NO₃⁻ se reduzca a nitrógeno molecular se requieren 2,5 g de azufre y 5 g de alcalinidad como CaCO₃. El proceso da lugar a 7,5 g de SO₄⁻ y muy poca cantidad de biomasa.

Las bacterias responsables de la desnitrificación autótrofa son *Thiobacillus denitrificans* y *Thiomicrospira denitrificans*. Otras especies como *Alcaligenes eutropha*, *Paraccocus denitrificans* y varias de *Pseudomonas* son capaces de crecer en condiciones autótrofas con hidrógeno como donador de electrones (Payne, 1981)

Durante la desnitrificación, los microorganismos requieren nutrientes como carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S) para la síntesis celular. Otros elementos como potasio (K), sodio (Na), magnesio (Mg), calcio (Ca) y hierro (Fe) son usados en menor cantidad. En trazas se requiere manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co) y molibdeno (Mo). La relación C:N:P:S favorable es la propuesta por Spector (1956), 100:20:4:1, pero Bitton y Gerba (1984), así como Gravinska-Loniewska *et al.* (1985), alcanzaron eficacias desnitrificantes del 80 y 90% con relaciones C/N próximas a uno (1).

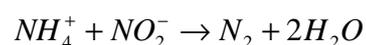
La generación de intermediarios como NO_2 , N_2O , NO durante la etapa desnitrificante depende del tipo y concentración de sustrato (Her y Huang, 1995; Vázquez, 2005). También interfieren las condiciones del medio y de operación: la temperatura, el pH, el tiempo de retención hidráulico, el tiempo de retención celular y la presencia de compuestos tóxicos (Polprasert y Park, 1986; Knowles, 1982), por lo cual es necesario controlar muy bien estos factores durante todo el proceso, al igual que la fuente de carbón orgánico, la concentración de oxígeno disuelto, la concentración de nitratos y la relación C/N. Otro aspecto asociado es la competencia entre los microorganismos reductores de nitrito y los reductores de nitrato por el donador de electrones (Dodd y Bone, 1973), provocando la acumulación de nitrito que siendo muy tóxico, puede inhibir la actividad microbiana.

2.2.3 PROCESO ANAMMOX (ANAEROBIC AMMONIUM OXIDATION)

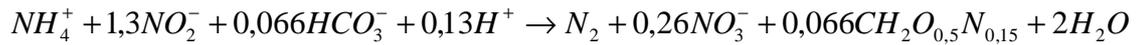
Fue denominado así el proceso mediante el cual ocurre la oxidación del amonio en medios anaerobios con la intervención de bacterias quimiolitautótrofas capaces de oxidar el amonio usando nitrito como aceptor de electrones. Durante muchos años se atribuyó la oxidación de amonio únicamente a los ambientes aerobios, pero Mulder *et al.*, en 1995 confirmó la existencia del proceso ANAMMOX en una planta piloto desnitrificante, después de que Broda lo predijera en 1977 (Dapena-Mora *et al.*, 2007).

Van de Graaf *et al.* (1995), demostró mediante ensayos de actividad que el proceso sucedía por la intervención microbiana. En los viales que no contenían lodo inoculado o que fueron esterilizados no se observaba consumo de amonio, comprobaron también que la eliminación de amonio era directamente proporcional a la cantidad de biomasa introducida.

En ensayos con trazadores estos investigadores descubrieron que el agente oxidante del amonio era el nitrito y no el nitrato como fue planteado al principio:



La estequiometría global del proceso fue planteada a partir de coeficientes calculados por Van de Graaf *et al.*, 1996 y con condiciones de operación optimizadas por Strous *et al.*, 1999 al realizar el proceso en un reactor secuencial discontinuo:



Según Jetten *et al.* (2000), se ha detectado actividad Anammox en varios sistemas como biodiscos rotatorios, filtros percoladores, reactores de biopelícula, reactores de lecho fluidizado y SBR. Las fuentes de amonio para esos sistemas eran generalmente aguas de escorrentía, de medio mineral y aguas residuales. Se detectaron por ensayos de actividad y por estudios de ADN.

Todavía no se conocen a profundidad las características de las recién descubiertas bacterias Anammox, las primeras especies identificadas fueron denominadas *Candidatus "Brocadia anammoxidans"* y *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*. Según técnicas de identificación genética, las nuevas cepas encontradas en estudios actuales corresponden todas al orden *Planctomycetales*, se han detectado por ejemplo en una columna de agua en el Mar Negro (*Candidatus "Scalindua sorokini"*) y en una planta de tratamiento de aguas residuales en Reino Unido (*Candidatus "Scalindua brodae"* y *"Scalindua wagneri"*) (Dapena-Mora *et al.*, 2007).

La velocidad de crecimiento de las bacterias tipo Anammox era extremadamente lenta en los primeros trabajos realizados, para solucionar este problema era necesario aplicar una estrategia que permita retener la biomasa durante mucho tiempo en la unidad de reacción, para ello Strous *et al.* (1998) utilizaron reactores SBR. La biomasa que desarrollaron en estos reactores pertenecía a la especie *Candidatus "Brocadia anammoxidans"* y lograron obtener como características principales las siguientes (Strous *et al.*, 1999):

- ✓ Pertenece al orden *Planctomycetales*
- ✓ Produce nitrógeno con nitrito como aceptor de electrones utilizando la enzima Hidroxilamina oxidoreductasa
- ✓ Produce Hidroxilamina e hidracina como intermediarios
- ✓ Su velocidad de crecimiento es de $0,003 \text{ h}^{-1}$
- ✓ El tiempo de duplicación es de 10,6 d
- ✓ Se inhiben reversiblemente en presencia de oxígeno

Al igual que en el caso de las bacterias nitrificantes, el crecimiento de las bacterias Anammox puede ser definido por la ecuación de Monod, la misma que

se puede expresar en función del amonio o en función del nitrito según cuál sea el sustrato limitante (Dapena-Mora *et al.*, 2007).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{[NH_4^+]}{K_s + [NH_4^+]}$$

Sustrato limitante: amonio

Ecuación 2.2-4

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{[NO_2^-]}{K_s + [NO_2^-]}$$

Sustrato limitante: nitrito

Ecuación 2.2-5

Strous *et al.* (1999) comprobaron que al producirse N₂ mediante el proceso Anammox, los óxidos de nitrógeno que se generan como subproductos se encuentran solo en trazas (NO, NO₂ y N₂O). Calcularon también otros parámetros que se muestran en la tabla 2.2-2 y explicaron la relación entre la baja velocidad de crecimiento de las bacterias con la baja velocidad de consumo de sustrato:

Tabla 2.2-2. Cinética del proceso Anammox

Parámetro	Valor	Unidad
Constante de afinidad del amonio	5	mM
Constante de afinidad del nitrito	< 5	mM
Energía de activación	70	kJ/mol
Productividad	0,066	mol C/mol NH ₄ ⁺
Velocidad máxima de crecimiento	0,0027	h ⁻¹
Velocidad de consumo de amonio	45	nmol NH ₄ ⁺ /(mg proteína·min)

Fuente: Strous *et al.* (1999)

2.2.3.1 Factores que intervienen en el proceso Anammox

Strous *et al.* (1999) y Strous (2000), después de haber realizado diferentes experimentos variando los principales parámetros que intervienen en el proceso Anammox, obtuvieron las siguientes conclusiones:

Al calcular las velocidades de consumo de sustrato a diferentes temperaturas, observaron que el valor óptimo para la biomasa es de 43 ± 3 °C. No se observó actividad Anammox a temperaturas menores de 10 °C.

El intervalo de pH recomendable es desde 6,7 a 8,3 siendo 8 el valor óptimo de operación.

Las concentraciones de amonio y nitrato de hasta 70 mM en un reactor SBR durante una semana no produjeron efectos inhibitorios, en cambio concentraciones de nitrito mayores a 7mM, causaron pérdida total de la actividad

microbiana. Este punto es discutible debido a los ensayos en discontinuo realizados por Dapena-Mora *et al.* (2006) en donde descubrieron que las sustancias inhibitorias del proceso Anammox son el amonio, nitrito (sustratos) y el nitrato que se produce. Sin embargo, el inhibidor más importante es el nitrito ya que a una concentración de 25 mM, el 50% de la actividad específica desaparecía. Para lograr el mismo efecto con el amonio y el nitrato, fue necesario que estuvieran en concentraciones de 55 y 45 mM respectivamente.

Respecto a otros parámetros importantes que afectan el proceso, como son el oxígeno, la luz solar y la materia orgánica, Van de Graaf *et al.* (1996) realizaron ensayos en discontinuo con los que demostraron que el oxígeno inhibe el proceso completamente. Strous *et al.* (1997) descubrieron que esta inhibición es reversible y no observaron actividad Anammox en condiciones microaerobias. Strous *et al.* (1999) descubrieron que la fase de latencia de las bacterias Anammox debida a las condiciones aerobias disminuye cuando aumenta la respiración endógena, debido al rápido consumo de oxígeno (Dapena-Mora *et al.*, 2007).

En ensayos discontinuos los compuestos orgánicos resultaron favorables para el proceso debido a que colaboran en la formación de nitrito al igual que los compuestos de azufre, en cambio en ensayos continuos el efecto fue negativo, ocasionado por la proliferación de bacterias heterótrofas. Nuevos estudios han propuesto como una buena alternativa el uso de propionato como fuente de materia orgánica en ensayos continuos ya que estimula la actividad Anammox (Dapena-Mora *et al.*, 2004).

Estos investigadores también encontraron en sus estudios que la luz causaba una inhibición del 30 al 50% en la actividad Anammox.

Finalmente, las fuerzas de estrés hidrodinámico también son relevantes en el proceso. Arrojo *et al.* (2006, 2007) encontraron que a altas fuerzas de estrés la biomasa granular era afectada, observaron desestabilización en los sistemas con potencias específicas de agitación mecánica mayores a $0,09 \text{ kW/m}^3$ y de agitación por gas mayores a $0,057 \text{ kW/m}^3$. La desestabilización fue causada por disminución de la actividad de la biomasa así como un mayor lavado de la misma. Para el caso de la agitación mecánica el fenómeno fue más brusco (Dapena-Mora *et al.*, 2007).

2.3 REACTORES SECUENCIALES DISCONTINUOS: FUNCIONAMIENTO Y CARACTERÍSTICAS.

Estos reactores también llamados de operación discontinua ROD, se conocen hace aproximadamente 100 años, desde que Arden y Lockett (1914) publicaron trabajos realizados en SBR's a escala piloto, en ese tiempo llamados reactores de llenado y vaciado. Otros estudios posteriores no tuvieron éxito hasta que en 1971, Irvine y David, retomaron el desarrollo de estos reactores, y en 1983 Sir Thomas Wardle publicó sus experiencias, permitiendo que estudios similares se reanudaran ampliamente en varios países. Como respuesta, muchos de estos sistemas se construyeron en Australia, Estados Unidos y Japón (Dautan *et al.*, 1988).

Los primeros trabajos realizados en SBR's se enfocaron en la eliminación de materia orgánica, pero en la actualidad se estudian también en ellos el proceso conjunto de nitrificación-desnitrificación para la eliminación de nitrógeno, y el proceso de eliminación de fósforo. A esa capacidad de tratar simultáneamente materia orgánica y nutrientes sin mayores dificultades, se debe el hecho de que se hayan implementado en muchos sitios de España, con el objeto de constituirlos en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR's), así como en otros países de Europa.

2.3.1 FUNCIONAMIENTO.

Los Reactores Secuenciales Discontinuos corresponden a una tecnología de tratamiento de aguas residuales que funciona en base al establecimiento de varias etapas en la misma unidad de reacción donde generalmente interviene la acción de lodos biológicos para el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales. Las operaciones unitarias que ocurren son las mismas que en los sistemas de lodos activos, la diferencia radica en que dichas operaciones se efectúan en tanques separados para el caso de los fangos activos y en un solo tanque para el caso de sistemas secuenciales discontinuos. (Dautan *et al.*, 1988).

La degradación bioquímica de los contaminantes en condiciones de mezcla completa y la separación posterior de la biomasa, ocurren en el mismo tanque. Las fases del proceso son secuenciales y se repiten en forma periódica.

Según Tsuneda *et al.* (2005), este tipo de reactores se caracterizan por funcionar en ciclos, cada uno con una secuencia de cinco etapas bien definidas:

2.3.1.1 Llenado

En la etapa de llenado, el agua residual (alimentación) ingresa al sistema, durante un tiempo establecido previamente. El llenado ocurre por lo general en condiciones estáticas, pero en ciertas ocasiones y según el proceso, puede ser dinámico, es decir se produce durante el período de reacción.

2.3.1.2 Reacción (aireación, mezcla)

En la fase de reacción, ocurre la degradación bioquímica de los contaminantes en condiciones de mezcla completa. El agua residual es mezclada utilizando agitación mecánica y/o aireación para incrementar el contacto de la fase sólida con la fase acuosa, esto además ayuda a eliminar las posibles espumas superficiales (bulking) y a preparar a los microorganismos para recibir el oxígeno del aire que se inyecta al sistema. Los resultados de la etapa de reacción son muy variables, dependen de la duración de la fase, de las características cinéticas de la biomasa, de las características de la alimentación, del caudal de aire en el sistema, de las condiciones físicas de la mezcla, de las fuerzas hidrodinámicas, entre otros factores.

2.3.1.3 Sedimentación (clarificación)

La sedimentación tiene lugar al generar condiciones de reposo en el reactor, para que por acción de la gravedad, el lodo se asiente en el fondo y deje clarificado el efluente, listo para ser extraído.

2.3.1.4 Extracción (vaciado de la mezcla tratada)

Mediante un sistema de bombas peristálticas el efluente tratado, llamado "sobrenadante" es retirado del reactor y conducido a su lugar de destino. Las determinaciones analíticas de las sustancias presentes son claves en este punto del proceso, para evaluar la eficiencia de remoción.

2.3.1.5 Fase inactiva (tiempo muerto).

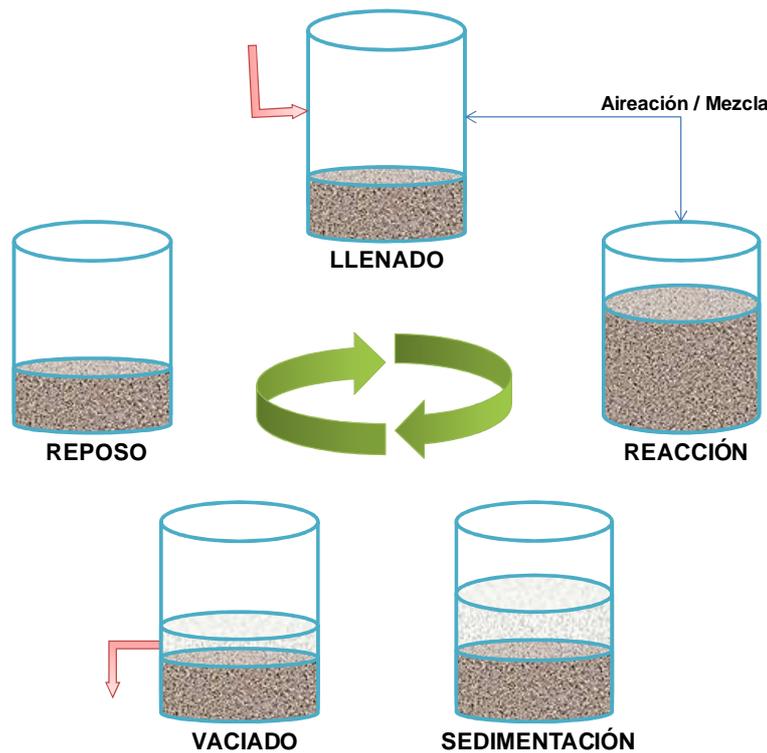
Consiste en un lapso de tiempo en que no existe funcionamiento del sistema, por lo cual, se encuentra en condiciones estáticas. Se aplica con la finalidad de preparar a la biomasa para el nuevo ciclo. Este paso es opcional, se agrega al

sistema solo cuando el tratamiento particular lo requiere, o cuando se observa que los resultados finales mejoran con esta fase.

Finalmente, se puede purgar el lodo generado para mantener constante la concentración de éste.

El gráfico 2.3-1 muestra la secuencia de las fases que ocurren en un SBR:

Gráfico 2.3-1. Fases de un ciclo de operación de un Reactor Secuencial Discontinuo.



El tiempo de retención hidráulica (TRH), el tiempo de retención celular y las cargas, son parámetros importantes a la hora del diseño de los reactores. Los tiempos de retención y las cargas varían con cada reactor y dependen en gran medida de la carga de agua residual específica. Generalmente, un sistema SBR trabaja con un tiempo de retención hidráulico de 1 a 10 d y un tiempo de retención celular de 10 a 15 d. La concentración de sólidos en suspensión del licor mezcla (SSLM) suele mantenerse entre 1.500 y 5.000 mg/L. El control general del proceso puede ser llevado a cabo automáticamente utilizando sensores o temporizadores.

La estrategia particular de operación de los reactores para cada experimentación, está determinada por factores como la secuencia y el tiempo de las etapas; el

volumen de tratamiento; la cantidad y características del lodo; las características del reactor; entre otros, que son parámetros de diseño que deben ser establecidos en función de las condiciones que se desean obtener en el agua tratada.

En la actualidad, muchas estrategias de control se están encaminando a disminuir la duración de cada ciclo para optimizar el proceso. Los parámetros de posible determinación en tiempo real (en línea) como son el pH, oxígeno disuelto, entre otros, facilitan este trabajo, mediante la identificación de puntos críticos. Otro apoyo importante, es el desarrollo de modelos que describen de forma aproximada la eliminación de contaminantes en función de la variación de la concentración de biomasa y los flujos de aireación.

No obstante, debido a que en los procesos biológicos no se puede establecer un modelo general exacto a seguir, por las múltiples y hasta desconocidas variables que participan, lo más recomendable es establecer una estrategia de operación basada en la experimentación y aplicación de minuciosas pruebas en un montaje a escala de laboratorio, que posteriormente podrá ser escalado a las dimensiones de una planta piloto o de tipo industrial según los requerimientos.

Según Daután *et al.* (1988), se debe procurar siempre que la fase de reacción sea lo suficientemente larga para permitir que las sustancias indeseables sean degradadas. Para la determinación del tiempo de duración de las fases de sedimentación y vaciado se deben considerar las características del lodo activado y del reactor.

Para los procesos aerobios de eliminación de nutrientes como son el fósforo y el nitrógeno, el aire introducido en el sistema durante la etapa de reacción, logra el almacenamiento de los fosfatos, la degradación del material orgánico en forma de DBO y la nitrificación. Para la desnitrificación es necesario crear condiciones anóxicas después de la fase aeróbica (Inveniaⁱⁱ).

2.3.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Las principales ventajas de los SBR's frente a los procesos continuos responden a la flexibilidad de operación y la fácil automatización. El sistema se puede

ⁱⁱ Dirección electrónica de Invenia: <http://www.invenia.es/siis:sbr>

regular, usualmente por medio de Controladores Lógicos Programables o PLC's (siglas en inglés), relojes programables y hasta microprocesadores. Estos instrumentos permiten una operación versátil al simplificar las modificaciones mediante la reprogramación de la secuencia y/o duración de las fases del proceso.

Como otras ventajas importantes se pueden mencionar:

Son sistemas que ocupan muy poca superficie y tienen menor coste que los sistemas convencionales, debido al ahorro en la inversión por la simplicidad de los equipos y reducción de terreno al combinar en un mismo tanque varias operaciones unitarias, generando un efluente de buena calidad fácilmente tratable para regeneración, por lo tanto encajan perfectamente en el concepto de sistemas sustentables.

La condición de discontinuidad de este tipo de reactores que permite la variación del volumen del tanque en función del tiempo (Wilderer *et al.*, 2001), facilita el trabajo con biomasa en suspensión fija o combinada en un lecho móvil.

Son sistemas con amplia flexibilidad de funcionamiento ante las variaciones de los ciclos, la estrategia de operación, y las fluctuaciones de caudal y concentración de los contaminantes de las aguas residuales (Tsuneda *et al.*, 2005).

Han dado lugar a la obtención de buenos resultados en el tratamiento de compuestos refractarios, en comparación a los sistemas biológicos convencionales.

Ayudan a controlar mejor el crecimiento de organismos filamentosos que causan los famosos problemas de "flotación o bulking" en los sistemas convencionales y permiten la fácil detección y corrección de problemas en la fase de sedimentación.

Como ya se ha mencionado, los reactores SBR son una excelente opción para la ejecución del proceso conjunto de nitrificación–desnitrificación, así como para la eliminación de fósforo. Estos dos parámetros suelen ser muy problemáticos al trabajar con tecnologías convencionales.

Crean las condiciones necesarias para incrementar la capacidad de adaptación de los microorganismos, a efluentes con alta carga de sales.

A pesar de las ventajas inherentes de los procesos discontinuos en lo referente a la biodegradación de sustancias tóxicas, un SBR que funciona bajo la estrategia usual, tiene varios problemas cuando se emplea en la degradación de aguas residuales tóxicas: inhibición de los microorganismos, problemas con choques debido a un aumento repentino en la concentración del compuesto tóxico (picos de concentración), desaclimatación y problemas por ayuno de los microorganismos y bajas eficiencias en la remoción de compuestos tóxicos.

Para superar los problemas discutidos, varios investigadores han reportado el uso de estrategias para el control óptimo de las fases de llenado y reacción del reactor. Con la estrategia de control óptimo, además de poder biodegradar efectivamente las aguas inhibitorias, se logra maximizar la velocidad de degradación de los compuestos tóxicos, disminuyendo el volumen del reactor.

Debido a esas ventajas las aplicaciones industriales de los reactores discontinuos secuenciales en la depuración de aguas residuales son muy variadas, siendo particularmente interesantes en el tratamiento de corrientes de bajo caudal. Así, se han descrito aplicaciones con éxito para aguas residuales municipales, industria vinícola, aguas procedentes de lixiviados de vertederos, industrias de curtidos, aguas residuales hipersalinas, industria papelera, industria láctea, aguas residuales de matadero e industria ganadera porcina, entre otras. Las aplicaciones más novedosas son las relacionadas con aguas residuales de la industria textil, de la industria azucarera y de la industria química (conteniendo compuestos fenólicos , BTXⁱⁱⁱ, TNT^{iv}, etc.), habiéndose mostrado el potencial de los SBR en el tratamiento de aguas residuales industriales.

El tratamiento y reutilización de aguas residuales urbanas e industriales es una opción que viene tomando importancia en zonas de recursos hídricos escasos, lo que obliga a la mejora de las tecnologías de tratamiento.

Los reactores SBR han sido particularmente puestos en marcha para el proceso de nitrificación parcial, con el fin de investigar el rol conjunto de la nitrificación con la biomasa granular debido a que existen tres ventajas primordiales:

ⁱⁱⁱ BTX: Benceno, Tolueno y Xileno

^{iv} TNT: Trinitrotolueno

- ✓ Disminución de costos en términos de suministro de aire en la etapa de la nitratación ya que cuando el nitrito se oxida a nitrato, el oxígeno no es consumido.
- ✓ En el proceso posterior de desnitrificación no es necesaria una fuente de carbón orgánico, por lo que en este sentido también se consigue un ahorro.
- ✓ Estos sistemas presentan la posibilidad de acoplamiento con el recién descubierto proceso Anammox.

2.4 SISTEMAS CON BIOMASA GRANULAR.

Los tratamientos convencionales de lodos activos para el tratamiento de materia orgánica y nitrógeno presentan desventajas importantes como la excesiva producción de fangos, las dificultades en la gestión de los mismos, las grandes extensiones de terreno que se requieren para las unidades de tratamiento, la sensibilidad de las bacterias nitrificantes a los factores ambientales que desembocan en bajas tasas de crecimiento, entre otras (Y. Liu *et al.* 2002, J. Vázquez, 2005).

Con el fin de mejorar estos sistemas convencionales, se han estudiado novedosas alternativas en las últimas décadas, las cuales han tenido su base en la compactación de la biomasa para obtener elevadas concentraciones con buena capacidad de decantación y alta actividad. A partir de estas consideraciones, varios investigadores han experimentado con reactores de biomasa adherida a un material de soporte (biopelícula), donde la mezcla es producida por un flujo de aire. Han obtenido muy buenos resultados al tratar altas velocidades de carga en reactores tipo airlift, estos son los denominados Biofilm Airlift Suspension Reactor (BASR), que han sido diseñados para retener grandes concentraciones de biomasa y para que ocupen pequeñas áreas de suelo ya que la altura del reactor es mucho mayor que su diámetro.

Las desventajas de estos tratamientos son los altos costos del material de soporte y las dificultades para la operación durante la puesta en marcha de los reactores, motivos que han permitido la investigación de otros sistemas como los de biomasa granular.

El proceso de agregación microbiana para formar gránulos, generalmente es asociado con los reactores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket), que funcionan en condiciones anaerobias y con flujo ascendente, fueron desarrollados por Lettinga *et al.*, 1980, en Holanda. A partir de entonces, las investigaciones en ese campo han dado lugar a la construcción de varios reactores UASB, a escala industrial (Arrojo *et al.*, 2004).

Por otro lado, Mishima y Nakamura en 1991, descubrieron que también era posible lograr granulación de tipo aerobia, empleando oxígeno puro en un reactor UASB, pero en aquella ocasión no se le dio mucha importancia a ese trabajo

debido a que la comunidad científica estaba enfocada en los sistemas de biopelícula. La investigación basada en el crecimiento de biomasa formando gránulos en condiciones aerobias, fue retomada a mediados de la década de los años 90, esta vez operando con reactores del tipo SBR (Morgenroth *et al.*, 1997; Beun *et al.*, 1999; Dangcong *et al.*, 1999).

Gránulos aerobios fueron obtenidos en reactores aerobios SBR con alimentación sintética por Tay *et al.* (2002) y Etterer y Wilderer (2001). Estos reactores que funcionan en ciclos, permiten la continua selección del lodo granular tras la rápida sedimentación de la biomasa densa y el vaciado del efluente sobrenadante y esa es la base de la granulación (Arrojo *et al.*, 2004).

2.4.1 MECANISMOS DE GRANULACIÓN AEROBIA

Para entender los factores que intervienen en los procesos de agregación microbiana aerobia, es necesario conocer de forma específica a qué se le denomina “gránulo formado en ambiente aerobio”. Según Vázquez (2005), la definición más acertada podría ser la establecida en la “1st IWA-Workshop Aerobic Granular Sludge” realizada en Munich en septiembre de 2004:

“Se han de ver los gránulos aerobios como agregados de origen microbiano, que no coagulan bajo condiciones de fuerzas de estrés reducidas y que sedimentan significativamente más rápido que los flóculos de los lodos activos.”

Otras características importantes a tomar en cuenta en el concepto de gránulo son “la apariencia bien definida” y la “densa estructura” (Schmidt and Ahring, 1996). A partir de estas consideraciones se puede determinar que los dos factores cruciales para obtener gránulos aerobios son a simple vista, las altas fuerzas de estrés hidrodinámico y el bajo tiempo de sedimentación. Para esto, la unidad de reacción donde se pretenda llevar a cabo con éxito el propósito de obtener agregados, debe proporcionar el ambiente necesario para que se establezcan esas condiciones, en la actualidad se recomiendan los reactores secuenciales discontinuos (Vázquez, 2005).

Varias investigaciones han sido realizadas ampliamente en la formación de gránulos aerobios bajo diversas condiciones sintéticas. La agregación bacteriana

aerobia es además inducida por condiciones como altas concentraciones de OD, una alternancia constante entre etapas de saciedad y hambruna representadas por la alimentación intermitente que es posible en los ciclos de un reactor SBR y el tipo de sustrato empleado como alimentación (Beun *et al.*, 2002; Schwarzenbeck *et al.*, 2005; Vázquez, 2005).

2.4.1.1 Fuerzas de estrés hidrodinámico

Según Liu y Tay (2002), varios estudios han demostrado que biopelículas y gránulos aerobios y anaerobios más compactos, estables y densos se forman con altas fuerzas hidrodinámicas de corte. Las fuerzas de corte tienen gran influencia sobre la estructura, transferencia de masa, producción de polisacáridos extracelulares, comportamiento metabólico/genético de los gránulos aerobios y anaerobios. Por lo tanto, estas fuerzas pueden ser manipuladas como un parámetro de control, para mejorar el proceso de granulación microbiana.

En reactores biológicos, la objetividad de la fuerza resultante del flujo de gas o líquido (estrés hidrodinámico) que causa la colisión entre partícula y partícula es un factor clave que influye en la formación, estructura y estabilidad de los gránulos aerobios y anaerobios (Liu y Tay, 2002). De esta forma, las partículas de biomasa que se encuentran débilmente adheridas se desprenden fácilmente y son eliminadas del sistema, conservándose solo aquellas con mayor densidad y facilidad de agregación (Vázquez, 2005).

En varias experimentaciones donde fueron aplicadas fuerzas de corte muy débiles, no se observó granulación (Beun *et al.*, 1999; Tay *et al.*, 2001; Lettinga *et al.*, 1993; Alves *et al.*, 2000; O' Flaherty *et al.*, 1997). Esto muestra la importancia que tiene la aplicación continua de las fuerzas hidrodinámicas de corte en la agregación microbiana o "auto inmovilización celular". Sin embargo los mecanismos por los cuales las fuerzas hidrodinámicas de corte influyen en la formación, estructura y metabolismo del lodo granular todavía no son comprendidas totalmente (Liu y Tay, 2002).

2.4.1.2 Tiempo de sedimentación

La selección de gránulos entre una biomasa mixta en un SBR puede lograrse aplicando una diferencia en la velocidad de sedimentación entre la biomasa granular (de rápida sedimentación) y la floculenta y filamentosa (de lenta

sedimentación). El tiempo de sedimentación debe ser establecido de manera que solo las partículas que sedimentan a una velocidad mayor a 10 m/h sean retenidas dentro del reactor, el resto de partículas serán lavadas del reactor en la etapa de vaciado, junto con el efluente (Beun *et al.*, 2002). De esta manera, se obtiene un poco de materia orgánica en el efluente, perteneciente a las bacterias muertas y cuya cantidad depende de las condiciones de operación del reactor; en general se puede decir que mientras más estable sea el sistema, menor lavado de biomasa se produce; obviamente durante la selección de biomasa se escapará mayor cantidad de biomasa fuera del reactor.

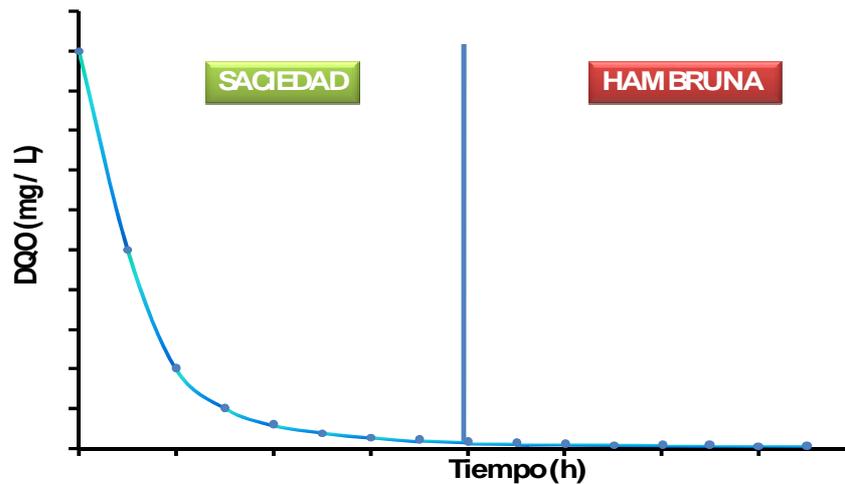
2.4.1.3 Alternancia saciedad-hambruna

Beun *et al.* (2002), confirmaron la importancia de este aspecto en la formación de gránulos heterótrofos; observaron que durante el periodo en que estaba disponible el sustrato (periodo de saciedad), el oxígeno disuelto (OD) se consumía rápidamente y descendía hasta el 75% de saturación de aire, mientras que en la etapa en que el sustrato escaseaba tras haber sido consumido por las bacterias (periodo de hambruna), el porcentaje de saturación de aire era del 100%. El oxígeno disuelto se incrementaba bruscamente durante la transición de la primera etapa a la segunda. Descubrieron además que para un descenso del OD en un 50%, se producían rupturas de los gránulos formados, lo cual demuestra que la granulación depende de la alternancia saciedad-hambruna y los efectos que causa sobre la concentración de OD en el medio.

Por otro lado, Zevenhuizen y Ebbink (1974) y Beun *et al.* (2002) detectaron que durante la etapa de saciedad la materia orgánica se acumulaba dentro de las células en forma de compuestos de almacenamiento como glucógeno, lípidos y los poli-hidroxiclcanoatos (PHA), éstos eran consumidos posteriormente en la fase de hambruna. Este mecanismo se veía relacionado con el crecimiento de las bacterias formadoras de gránulos más que con el crecimiento de las filamentosas. La alternancia saciedad-hambruna se consigue fácilmente en los reactores SBR alimentados en discontinuo. (Vázquez, 2005).

En el gráfico 2.4-1 a continuación, se observa la alternancia saciedad-hambruna en la tendencia de consumo de materia orgánica en el transcurso de un ciclo en un SBR:

Gráfico 2.4-1. Consumo de sustrato (materia orgánica) durante un ciclo en un SBR



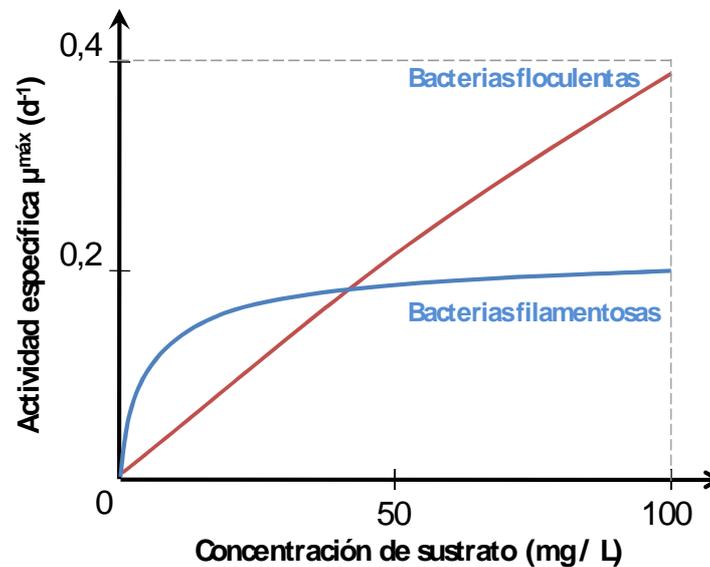
Fuente: Vázquez, 2005

Doi en 1990 planteó que el almacenamiento de sustrato ocurre cuando las bacterias consumen más de lo necesario para mantenerse y crecer, de tal manera que durante la escasez de alimento el sustrato almacenado les sirva como fuente de carbono y energía. Los compuestos de almacenamiento son guardados en forma de gránulos en el citoplasma de los organismos, quedando protegidos por una membrana.

Las muchas especies de bacterias capaces de cumplir con este mecanismo tienen una ventaja competitiva frente a las bacterias que no disponen de él, especialmente cuando la disponibilidad de sustrato presenta variaciones rápidas comparadas con el tiempo que necesita la biomasa para adaptarse a las nuevas condiciones. Las bacterias que no pueden guardar sustrato solo se desarrollan en la fase de saciedad. Se ha comprobado que por lo general pertenecen al grupo de las filamentosas y por tanto, no tienen habilidad para agregarse ni formar gránulos (Chudoba *et al.*, 1994).

La competencia entre especies filamentosas y formadoras de agregados, que se muestra en el gráfico 2.4-2, fue explicada por Chudoba *et al.* (1973) con la "Teoría de la selección cinética" basada en la ecuación de Monod, la cual asume que diferentes organismos presentan diferentes constantes de crecimiento y en consecuencia, la relación entre sus velocidades específicas de crecimiento y la concentración de sustrato son también diferentes.

Gráfico 2.4-2. Teoría de la selección cinética



Fuente: Vázquez, 2005

La “Teoría de la selección cinética” aplicada a varias investigaciones ha resultado muy útil para controlar el crecimiento de bacterias filamentosas manteniendo condiciones de alta concentración de sustrato, bajo las cuales la velocidad de crecimiento de la biomasa granular es mayor, sin embargo debido a la extensa variedad de microorganismos filamentosos, esta teoría no explica todos los casos del fenómeno de flotación o “bulking”.

Chiesa e Irvine (1985) realizaron una clasificación aproximada de tres clases de microorganismos que intervienen en los procesos de granulación y flotación:

- ✓ Floculentos de rápido crecimiento
- ✓ Filamentosos con alta afinidad por el sustrato pero resistentes a la ausencia de sustrato cuyo crecimiento era optimizado en condiciones de baja relación F/M (sustrato/microorganismo)
- ✓ Filamentosos con alta afinidad por el oxígeno disuelto (OD), de crecimiento rápido especialmente cuando la relación F/M es alta y la concentración de OD baja.

Según estos autores, el comportamiento fisiológico de la biomasa es diferente bajo relaciones de F/M altas o bajas, principalmente cuando se trata de la velocidad de crecimiento, resistencia a condiciones sin sustrato y potencial para acumular productos de almacenamiento.

Por lo general, la selección de microorganismos y los procesos de agregación suelen conseguirse con mayor facilidad cuando se establecen además los periodos de saciedad y hambruna.

2.4.1.4 Tipo de sustrato

Según Mosquera-Corral *et al.* (2003), la morfología de las biopelículas presenta diferencias de acuerdo al sustrato orgánico empleado. Estos autores realizaron experimentos con cuatro sustratos diferentes; cuando usaron ácido aspártico y almidón, las biopelículas obtenidas presentaron desde el principio una superficie muy esponjosa, mientras que al usar glucosa y proteínas de soya presentaron una superficie lisa.

Wang *et al.* (2005) también realizaron experimentos con diferentes fuentes de carbono como sustrato, llegando a la conclusión de que al usar sacarosa como única fuente de carbono se producía la inestabilidad del lodo granular debido a la proliferación del hongo protonema. Sin embargo al usar una fuente mixta de carbono (acetato más sacarosa), lograron un buen crecimiento de gránulos y este hongo no se presentó. En 1999, Wang demostró que una alta concentración de carbohidratos en un medio con baja concentración de OD también favorecía el crecimiento del hongo protonema y en general de bacterias filamentosas, que pueden crecer a bajos niveles de OD, por lo cual esta combinación no es recomendable.

De manera general, el acetato ha dado resultados apropiados en la generación de lodo granular y los sustratos simples parecen ser más favorables que los complejos en este proceso (Vázquez, 2005).

Finalmente, el único factor que muestra ser consistente respecto al crecimiento de la biomasa en sustratos fácilmente degradables es la densidad de los agregados producidos en dependencia de la velocidad de crecimiento de la biomasa sobre el sustrato disponible, de tal manera que a mayor velocidad de crecimiento, menor densidad de los agregados Villaseñor *et al.* (2000) y Mosquera-Corral *et al.* (2003)

Aparte de los factores ya citados, algunos investigadores proponen otros cuya importancia en el proceso de granulación no se conoce con certeza, estos son:

Los exopolímeros (EPS) que al parecer son producidos por las bacterias para facilitar su agrupación al actuar como un “pegamento”. Los mecanismos que

colaboran a su producción y la cantidad necesaria para ayudar en el proceso son aún un misterio.

El contenido en polisacáridos y las características hidrofóbicas de la biomasa parecen influir en la formación de lodo granular, aunque no se conocen todavía los modos en que lo hacen (Tay *et al.*, 2001; Tay *et al.*, 2002).

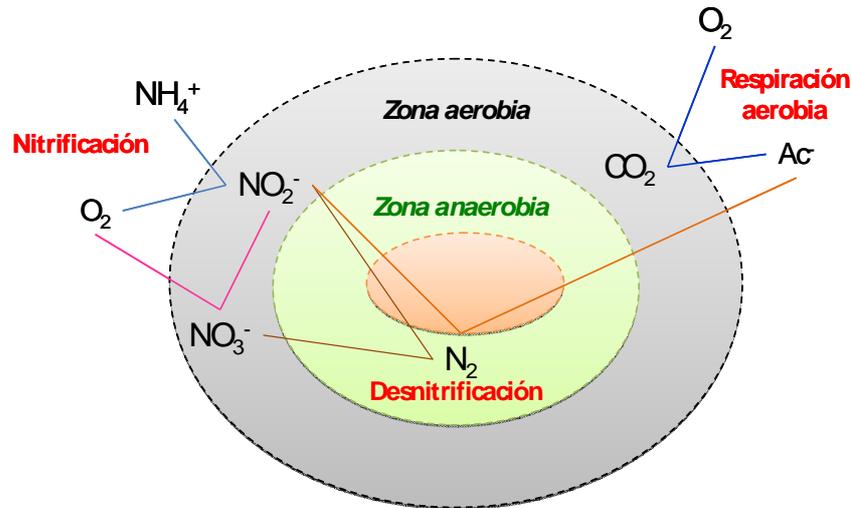
La tasa de sustrato alimentada y la tasa de crecimiento de los microorganismos influyen directamente en la cantidad producida de biomasa.

Bajo condiciones favorables de granulación, la producción de la biomasa solo es el resultado global de los procesos alternos de crecimiento y decaimiento. La muerte celular y el desprendimiento ocasionado por las fuerzas de estrés son los motivos principales del decaimiento y es importante que exista un equilibrio entre las fuerzas de estrés y la velocidad de crecimiento de los microorganismos para lograr que los sistemas sean estables y se conserve casi constante la cantidad de biomasa cuando se ha alcanzado el punto óptimo de las transformaciones deseadas. Así, para agregados heterótrofos es necesario aplicar altas fuerzas de estrés a través de una fuerte turbulencia para evitar la sobreproducción de biomasa no deseada (filamentosa), ya que si esto ocurre, se disminuiría la eficiencia del proceso debido a fenómenos de competición por sustrato entre varias especies o por la ocurrencia de eventos indeseables como la generación de espuma.

2.4.2 TRANSFORMACIONES EN EL GRÁNULO

En base a varias investigaciones realizadas en condiciones aerobias se puede afirmar que es posible obtener biomasa granular capaz de eliminar la materia orgánica y el nitrógeno mediante el proceso conjunto de nitrificación-desnitrificación. Esta posibilidad se debe a la estratificación encontrada en el gránulo, observado desde la zona externa hacia la interna; de esta manera los microorganismos oxidantes de carbono se ubican en la superficie del gránulo, los nitrificantes en una zona media y los desnitrificantes en la zona más interna donde no llega el oxígeno (Beun *et al.*, 2001; Vázquez, 2005).

Gráfico 2.4-3. Procesos en el gránulo.



Fuente: Vázquez, 2005.

Para los procesos heterótrofos, la biomasa granular alimentada por ciclos que dan lugar a la ocurrencia de las etapas de saciedad y hambruna puede presentar dos condiciones. La primera condición ocurre en la etapa de saciedad cuando está disponible el sustrato en altas concentraciones, en esta fase son propiciados los procesos oxidativos de la materia orgánica y el nitrógeno (nitrificación) debido a la disponibilidad y el intenso consumo de oxígeno por parte de las bacterias heterótrofas y en bajo grado de las autótrofas; durante la saciedad el sustrato atraviesa todo el gránulo llegando a la zona más interna, en cambio con el oxígeno no ocurre lo mismo porque es consumido en la zona superficial del gránulo con gran rapidez, por esta razón es que durante la saciedad se registran los valores más altos de concentración de Oxígeno Disuelto (OD) en el reactor (entorno a 8 mgOD/L a 20 °C).

La segunda condición se presenta en la fase de hambruna cuando se ha agotado el sustrato en el medio líquido; el oxígeno ingresa más en el gránulo y favorece la nitrificación en la zona aerobia durante el tiempo en que el amonio esté disponible como sustrato y el crecimiento de las bacterias heterótrofas que utilizan los compuestos almacenados durante la saciedad. Las bacterias de la zona anóxica pueden realizar el proceso de desnitrificación utilizando los compuestos de almacenamiento como fuente de carbono.

2.4.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS PROCESOS DE GRANULACIÓN

Según van Benthum (1996), la presencia de biomasa en el efluente, aún cuando no existen sólidos en la alimentación, pueden ser originados a partir de la ruptura de los gránulos en fragmentos menores, debido a la difusión limitada del sustrato y la consecuente muerte de las células por lisis. Esto ocurrió cuando los gránulos de sus experimentos eran demasiado grandes (entorno a 3,5 mm), y el proceso de decaimiento de las células pueden entonces tener lugar en la zona interna de los gránulos, tal como ocurre en el caso de los biofilms.

Garrido *et al.* (2004), afirman que varios experimentos han demostrado que existen tres razones por las cuales se observan pequeños agregados en los reactores SBR: la primera está relacionada con la presencia de sólidos en la alimentación, la segunda se debe a la generación de pequeños agregados de biomasa como consecuencia del crecimiento y la tercera obedece a las pequeñas cantidades de biomasa que se desprenden de los gránulos.

CAPÍTULO III.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DESCRIPCIÓN DEL MONTAJE EXPERIMENTAL Y LA ETAPA DE OPERACIÓN

En este capítulo se describen las características de los equipos para la experimentación así como la estrategia de operación. Además, se explican brevemente los procedimientos analíticos empleados para la determinación de los diferentes parámetros que evalúan el desempeño de los reactores.

3.1.1 MONTAJE EXPERIMENTAL

Para la presente investigación, se operaron tres reactores secuenciales discontinuos de vidrio; la mezcla sustrato-biomasa se indujo mediante un flujo de aire inyectado con bombas tipo pecera y a través de un tubo de vidrio con un difusor poroso en el extremo, que se ubicó en la parte inferior de cada reactor. El difusor fue utilizado para lograr una distribución uniforme de pequeñas burbujas de aire que produzcan la turbulencia adecuada para asegurar la mezcla completa, y para suministrar el oxígeno necesario en la etapa de reacción. Las restantes características físicas y de operación de cada reactor, se detallan a continuación:

3.1.1.1 Reactor amonio oxidante (R1)

Este reactor con biomasa granular procedente de una investigación anterior, se operó con el fin de estudiar el proceso de conversión de nitrógeno amoniacal a nitritos y nitratos.

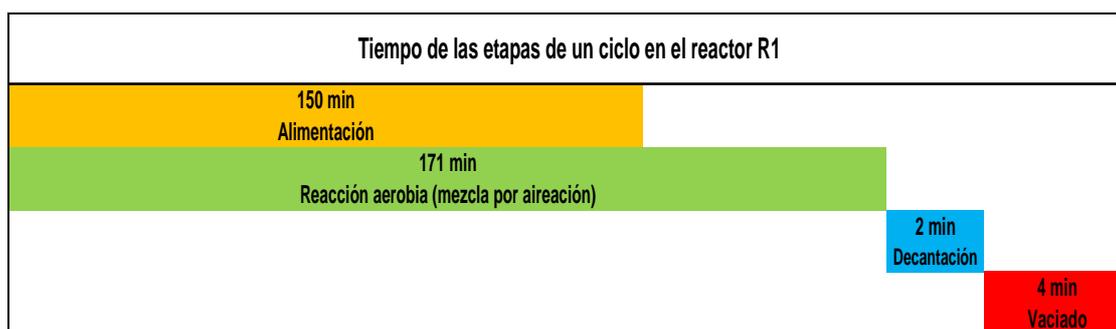
En una primera etapa se operó a temperatura ambiente, entre 15 y 25 °C y posteriormente se controló la temperatura mediante un sistema de enfriamiento compuesto por un termostato y una goma de silicona colocada alrededor del reactor con circulación de agua fría para que se mantenga a un valor promedio de 20 °C. Para controlar el pH y mantenerlo a un valor constante de 7,5 se dispuso de un sistema conformado por un electrodo de pH y dos bombas suministradoras; una de bicarbonato de sodio con concentración 1 molar (NaHCO_3 1M) que era activada cuando el pH era menor al mencionado; y otra de ácido sulfúrico de concentración 1 molar (H_2SO_4 1M), activada cuando el valor de pH era mayor a

7,5. El oxígeno disuelto fue establecido en un rango de entre 2 – 3 mg OD/L, mediante el difusor de aire.

La alimentación ingresada al reactor R1 se obtuvo de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR), de la ciudad de Lugo – España, específicamente a partir del efluente del digestor de lodos. Es importante mencionar que esta alimentación contenía una mínima cantidad de materia orgánica expresada como carbono orgánico total (TOC, por sus siglas en inglés) menor a 50 mg/L, pero en cambio contenía carbono inorgánico (CI) en concentraciones entre 150 y 300 mg/L. La concentración de amonio fluctuaba entorno a los 300 mg N-NH₄⁺/L.

El reactor funcionó durante 8 ciclos por día, cada uno de tres horas (180 minutos). La duración de las etapas en cada ciclo se visualiza en el gráfico 3.1-1:

Gráfico 3.1-1. Duración de las etapas de un ciclo en R1



El volumen alimentado en cada ciclo era aproximadamente de 0,75 L a un caudal de 0,3 L/h, ese mismo volumen era descargado al final de cada ciclo, cuando el volumen total de la mezcla dentro del reactor alcanzaba 1,75 L.

El tiempo de retención hidráulica fue establecido en 0,25 día.

3.1.1.2 Reactor nitrito oxidante (R3)

Este reactor fue puesto en marcha con el objetivo de investigar la posibilidad de obtener gránulos de condición nitrito oxidante específica mediante una estrategia para seleccionar las especies capaces de cumplir únicamente con este proceso.

En el reactor R3, se estudió el proceso de conversión a nitratos de una alimentación sintética en base a una concentración de 400 mg N-NO₂⁻/L de nitritos y en ausencia de materia orgánica, la composición de la alimentación y las trazas de nutrientes fue la que se muestra a continuación en la tabla 3.1-1:

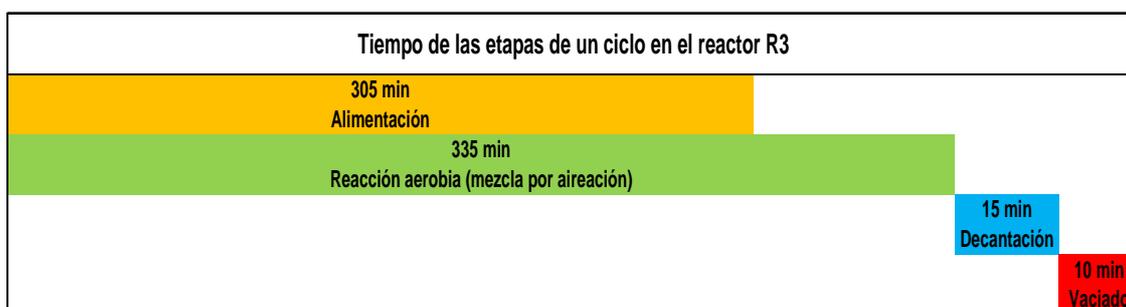
Tabla 3.1-1. Composición de la alimentación sintética para el reactor nitrito oxidante.

Alimentación	
Compuesto	Concentración [g/L]
NaNO ₂	2 - 3
NaHCO ₃	0,05
MgSO ₄	0,05
KH ₂ PO ₄	0,035
K ₂ HPO ₄	0,09
KCl	0,0175
Solución de trazas	0,5 mL/L

La concentración de oxígeno se mantuvo cercana a los 8 mg OD/L, el pH se conservó en un valor cercano a 8 sin emplear ningún sistema de control; estas son las condiciones más favorables para el tipo de bacterias que se desarrollan y son aspectos claves para el proceso de selección de la biomasa. La temperatura de trabajo fue ambiente, entre 20 y 25 °C, mientras que el pH de la alimentación fue de 7,2 en promedio.

El reactor funcionó en ciclos de seis horas, cumpliendo así 4 ciclos diarios. En el gráfico 3.1-2, se presenta la duración de las etapas durante un ciclo en R3:

Gráfico 3.1-2. Duración de las etapas de un ciclo en R3



El volumen aproximado, alimentado durante la etapa de reacción de un ciclo era de 0,45 L a un caudal muy bajo de 0,09 L/h. Al final de cada ciclo esa misma cantidad era retirada y el volumen alcanzado dentro del reactor era de 2 L.

El tiempo de retención hidráulica calculado fue de 1 día.

3.1.1.3 Reactor pulsante (Rp)

El reactor pulsante Rp, inoculado con 2 gSSV/L de lodo tomado de una EDAR^v, contenía biomasa en proceso de granulación con actividad nitrificante, amonio y nitrito oxidante. La mezcla completa y la introducción de oxígeno fueron logradas con el difusor de aire tipo pecera funcionando intermitentemente con frecuencia de $0,09 \text{ s}^{-1}$, es decir, la bomba activada cada 10 segundos lanza un pulso de aire de duración de 1 segundo; a este mecanismo se debe la denominación de “pulsante”. De esta manera, la concentración de oxígeno varió desde valores próximos a 4 mg OD/L durante los primeros días, hasta valores de 0,2 mg OD/L al final de la investigación. Los valores de pH se mantuvieron controlados con el mecanismo explicado para el reactor R1, en el orden de $7,7 \pm 0,2$ a la entrada y 7,5 en el efluente. El reactor trabajó a temperatura ambiente, es decir entre 20 y 25 °C. La carga nitrogenada alimentada a la unidad de reacción fluctuaba entre 0,19 a 0,32 kgN/L-día, esto significa que la concentración era de 50 a 190 mgN-NH₄⁺/L.

Las modificaciones más importantes que se realizaron en este reactor, fueron el cambio de la alimentación sintética por el efluente de un digester de lodos y la introducción de biomasa desnitrificante tipo ANAMMOX en un intento por conseguir una situación similar a la del reactor R1: un proceso conjunto de nitrificación – desnitrificación. Durante la etapa de alimentación sintética se utilizó la composición que se indica en la tabla 3.1-2:

Tabla 3.1-2. Composición sintética para el reactor pulsante.

Alimentación	
Compuesto	Concentración [g/L]
N-NH ₄ ⁺ , en NH ₄ Cl	0,15
NaHCO ₃ (Carbono inorgánico)	2 (0,29)
KH ₂ PO ₄	0,018
K ₂ HPO ₄	0,047
MgSO ₄	0,012
KCl	0,005
Solución de Trazas	0,5 mL/L

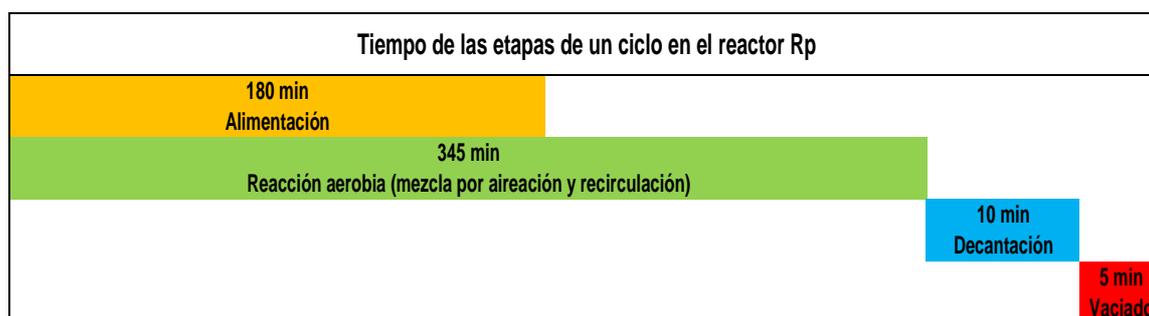
^v Estación Depuradora de Aguas Residuales

Las dos características principales de alimentación industrial fueron:

- ✓ Concentración de amonio fluctuante entre 0,15 – 0,35 g N-NH₄⁺/L.
- ✓ Concentración de Carbono Inorgánico de 0,28 ± 0,05 g CI/L.

El reactor pulsante fue operado en ciclos de seis horas, completando cuatro ciclos diarios, con una corriente de recirculación a lo largo del tiempo de reacción, utilizada para mejorar la mezcla y la transferencia de oxígeno.

Gráfico 3.1-3. Duración de las etapas de un ciclo en Rp



El volumen aproximado alimentado durante la etapa de reacción de un ciclo era de 0,75 L a un caudal de 0,25 L/h. Al final de cada ciclo esa misma cantidad era retirada y el volumen alcanzado dentro del reactor era de 1,5 L. El tiempo de retención hidráulica se fijó en 0,5 días. El caudal de aireación también fue modificado manualmente para lograr la variación de los valores de OD, se controló entre valores de 1,0 y 3,5 L_{AIRE}/min.

En las tablas 3.1-3 y 3.1-4, se resumen las condiciones geométricas, hidráulicas y de operación de los tres reactores:

Tabla 3.1-3. Características geométricas e hidráulicas de los reactores.

Parámetro	Valor			Unidad
	R1	R3	Rp	
Volumen total	2,5	3,0	2,5	L
Volumen útil	1,7	2,0	1,5	L
Volumen de intercambio	0,7	0,45	0,75	L
	41	23	50	%
Altura	46,5	30,0	46,5	cm
Diámetro interno	8,5	11,0	8,5	cm
Relación altura/diámetro H/D	5,5	2,7	5,5	

Tabla 3.1-4. Características de operación de los reactores.

Características de operación de los reactores				
	R1	R3	Rp	Unidad
TRH	0,25	1	0,3 – 0,5	día
Temperatura	Ambiente y 20	Ambiente (20 a 25)	Ambiente (20 a 25)	°C
pH	7,5	8,0 – 8,5	7,7 ± 0,2	
Oxígeno disuelto	2 - 3	≈ 8	4 – 0,2	mg O ₂ /L
Concentración de sustrato	250-350 N-NH ₄ ⁺	50 – 400 N-NO ₂ ⁻	50 – 190 N-NH ₄ ⁺	mg/L

Aparte de los reactores, el montaje experimental estuvo compuesto por un sistema de bombas peristálticas: una para el ingreso de la alimentación y otra para la descarga del efluente tratado, para cada reactor. Los caudales fueron establecidos mediante las perillas de regulación de la velocidad de giro de las bombas. Los flujos de aire fueron controlados con electroválvulas.

Adicionalmente, el control del sistema completo en las diferentes fases de operación fue logrado con la ayuda de un controlador lógico programable (PLC), marca Siemens, modelo S7-224CPU, el mismo que favorece el mecanismo propio de un reactor SBR, es decir el funcionamiento por ciclos.

3.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE OPERACIÓN

En esta sección se explican brevemente las técnicas analíticas empleadas en la determinación de los parámetros para evaluación de la operación de los reactores.

3.2.1 FASE LÍQUIDA

3.2.1.1 Carbono Inorgánico (CI) y Carbono Total (CT)

En vista de que el objetivo para el caso de los tres reactores fue obtener biomasa autótrofa, se evaluó la cantidad de carbono inorgánico (CI). Este parámetro fue determinado con un analizador de carbono Shimadzu, modelo TOC-5000 cuyo principio de funcionamiento es el siguiente:

- ✓ La muestra es oxidada en presencia de un catalizador a 680 °C.

- ✓ El CO₂ resultante se transporta por medio del gas portador (150 mL/min de aire de alta pureza) a un recipiente donde el gas se enfría y se seca.
- ✓ Posteriormente, pasa a una cámara con un detector de CO₂ NDIR, a través de un desorbedor de halógenos.
- ✓ El área bajo la curva que resulta de la lectura del detector, es proporcional a la concentración de Carbono Total.
- ✓ Para determinar el Carbono Inorgánico, la muestra se inyecta directamente a la cámara ácida de reacción de Cl, para desplazar el equilibrio hacia el CO₂. Luego, el gas portador dirige la muestra hacia el detector NDIR donde es cuantificada.

3.2.1.2 Nitritos y Nitratos

Pueden ser determinados por dos técnicas, una es la electroforesis capilar y otra es la colorimetría.

En la electroforesis capilar estos compuestos son determinados individualmente en el equipo "Waters Capillary Ion Analyzer" modelo CIA, usando como electrolito 0,01 mol/L de sulfato de sodio y agregando 50 mL/L de modificador electroosmótico CIA-Pak™ OFM Anion BT (Waters) (Ewing *et al.*, 1989; Heiger, 1992).

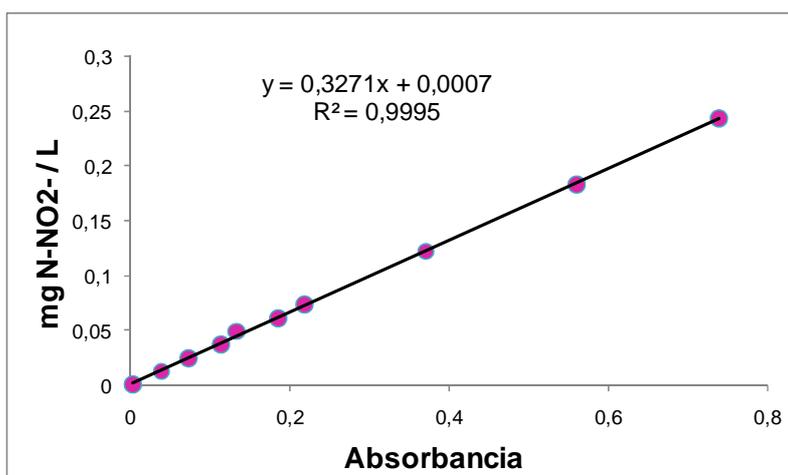
La muestra previamente filtrada con membranas Gelman Suport 450, se desplaza al aplicar una corriente eléctrica a través de un capilar de sílice fundida con cubierta de poliamida, con una longitud de 60 cm y diámetro interno de 75 µm a 25 °C. El tiempo de migración depende de la carga del ion. Los iones son detectados por una lámpara UV a 214 nm, al aplicar una corriente de 20 KV de voltaje. La medida se realiza frente a cuatro patrones con concentraciones conocidas de 25, 50, 75 y 100 mg N/L de nitrito y nitrato respectivamente.

3.2.1.2.1 Nitrito por colorimetría

Determinado por el método 419 del Standard Methods, APHA 1989. La técnica colorimétrica se basa en la reacción de diazotización entre la sulfanilamida y el ión nitrito, y luego la reacción con N-(1-naftil)-etilendiamina. Después de 20 minutos, se obtiene un compuesto de color rosado cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de nitrógeno como nitrito en la muestra. La concentración de nitrito se obtiene midiendo la absorbancia de la muestra

previamente filtrada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 543 nm, y reemplazando este valor en la variable de la ecuación de calibración de los reactivos, realizada con muestras patrón de concentraciones conocidas entre 0 y 0,24 mg N-NO₂⁻/L, cuyas absorbancias también se miden en el espectrofotómetro. Un ejemplo de cómo se obtiene la ecuación de calibración se indica en el gráfico 3.2-1:

Gráfico 3.2-1. Calibrado para determinar la concentración de nitrito



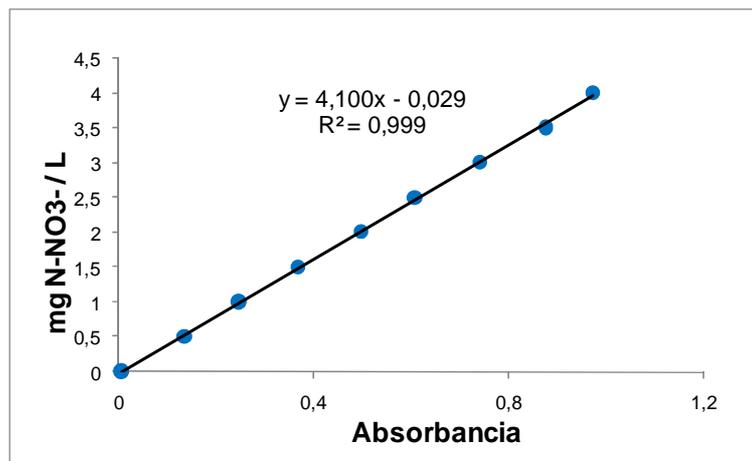
Fuente: Biogrup USC, 2007

3.2.1.2.2 Nitrato por colorimetría

La medición se realiza según el método 418-A del Standard Methods APHA, 1985. A la muestra filtrada previamente se le agrega ácido clorhídrico y se mide su absorbancia en un espectrofotómetro, a longitudes de onda de 220 y 275 nm (dentro del rango ultravioleta). Las muestras deben ser medidas en cubetas de cuarzo de 10 mm. El calibrado se realiza de la forma explicada para el nitrito, con concentraciones de nitrato potásico comprendidas entre 0 - 17 mg/L, equivalentes a 0 – 4 mg N-NO₃⁻/L.

El gráfico 3.2-2 muestra un ejemplo de ecuación de calibración para la determinación de las concentraciones de nitrato tras ser medidas en el espectrofotómetro:

Gráfico 3.2-2. Calibración para determinar la concentración de nitrato

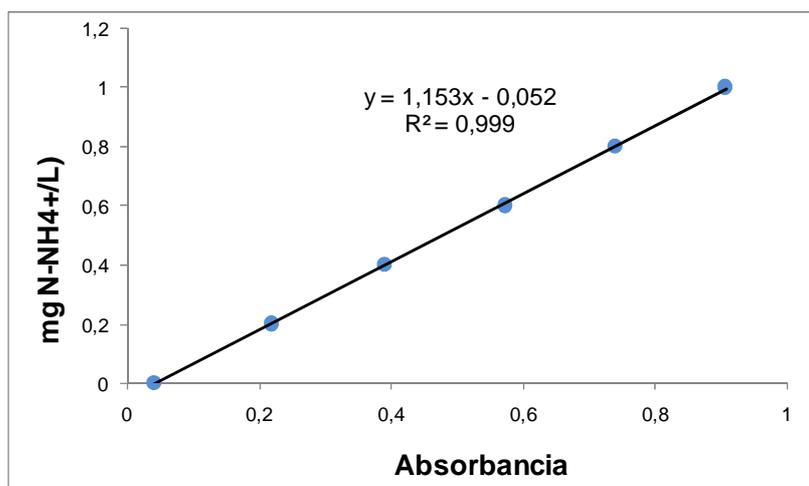


Fuente: Biogrup USC, 2007

3.2.1.3 Amonio por colorimetría

Método establecido en el Standard Methods, APHA 1985 para la determinación del nitrógeno amoniacal. A la muestra previamente filtrada se le añade una solución de nitroprusiato fenólico diluido en tampón y luego hipoclorito de alquilo; transcurridos 45 minutos se obtiene una muestra azul cuya intensidad medida como absorbancia a una longitud de onda de 635 nm en el espectrofotómetro, es proporcional a la concentración de amonio. La calibración se realiza de manera similar que para el nitrito y nitrato, usando concentraciones de amonio entre 0 – 1 mg N-NH₄⁺/L; un ejemplo se presenta en el gráfico 3.2-3:

Gráfico 3.2-3. Calibrado para determinar la concentración de amonio



Fuente: Biogrup USC, 2007

Las mediciones de los compuestos nitrogenados de esta investigación, fueron tomadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

3.2.1.4 Potencial de hidrógeno pH

Los valores de pH en las fases líquidas de los reactores operados, fueron obtenidos con un electrodo Ingold, modelo U-445 adaptado a un medidor de pH/mv Crison 506. Antes de la medición, este aparato también requiere una calibración que se realiza con soluciones tampón Crison de pH 4,00 y pH 7,02 a 20 °C. El medidor tiene una sensibilidad de ± 1 mV

3.2.1.5 Oxígeno Disuelto (OD)

Los valores de OD fueron determinados con un electrodo selectivo de oxígeno Aqualityc, modelo OXI-921 conectado a un medidor M-Design Instruments, Serie TM-3659 que permite la medición automática de los valores de OD.

3.2.2 FASE SÓLIDA

3.2.2.1 Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Volátiles (SSV)

Determinados conforme al método para sólidos del Standard Methods, APHA 1985. Se seca a 103 – 105 °C durante 2 horas, el residuo sólido resultante de filtrar un volumen de muestra conocida, a través de un filtro de fibra de vidrio Millipore de 4,7 cm de diámetro, 0,45 μ m de diámetro de poro y de peso también conocido. La diferencia entre el peso del filtro después del secado y el peso del filtro sin muestra, relacionado con el volumen de la muestra, es el resultado de los SST. Los SSV son calculados mediante la pérdida de peso de los SST tras ser calcinados durante media hora a 550 °C.

3.2.2.2 Índice Volumétrico de Lodos (IVL)

Es un parámetro físico utilizado para caracterizar la biomasa y muestra el volumen ocupado por una unidad de masa de lodo al sedimentar (ml/g SSV). Según el procedimiento propuesto por Ramalho (1991), primero se deja sedimentar en una probeta, un volumen de 100 mL de muestra extraída del reactor en la fase de mezcla completa, durante 30 minutos al cabo de los cuales se mide el volumen final ocupado por la biomasa. Conocida la concentración de biomasa en el reactor mediante la técnica de SSV, se puede saber la cantidad de biomasa que hay en el volumen de mezcla de la probeta. El IVL se calcula como

la relación entre el volumen final ocupado por la biomasa en la probeta (mL) y la cantidad de biomasa en la probeta (g SSV).

3.2.2.3 Densidad de lodos

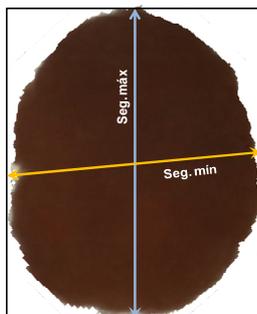
Como en el caso del IVL, es un parámetro físico usado para caracterizar la biomasa granular, el método para su determinación fue establecido por Beun *et al.* (2001). Se llena una probeta con una cantidad conocida de lodo granular, se agrega enseguida una solución de 1 g/L de azul de dextrano y se pesa. Se homogeniza la muestra y se deja sedimentar para extraer una primera fracción de la fase líquida. Luego se añade agua destilada y se repite el procedimiento para obtener una fracción con menor concentración de azul de dextrano que la anterior. Bajo la misma operación se obtienen la tercera y cuarta fracción de la muestra y se miden las absorbancias de las fracciones y de la solución original de azul de dextrano en el espectrofotómetro a 620 nm. La concentración de azul de dextrano en las distintas muestras, obtenida por diferencia con la muestra original, es proporcional al volumen de la biomasa que relacionado con la cantidad de SSV en la muestra, da la densidad de los gránulos. Las ventajas del azul de dextrano son que no se absorbe ni se difunde en la biomasa debido a su alto peso molecular.

3.2.2.4 Tamaño medio de los gránulos

El tamaño de los gránulos y su distribución es estimado midiendo el diámetro de “feret” de una muestra mínima de 200 gránulos. El diámetro de “feret” es el valor medio entre los segmentos más corto y más largo del gránulo. Con la información de los diámetros medidos, se puede representar una distribución del número de gránulos en rangos de valores de diámetros. Para la obtención de los datos requeridos, se aplica el método de digitalización directa de muestras representativas de gránulos esparcidos sobre una placa petri totalmente limpia. Distintas zonas de la placa son fotografiadas con un estereoscopio Nikon, que tiene adaptada una cámara digital Cool Snap con 1392 x 1040 de resolución. Posteriormente las fotografías son analizadas en un programa informático denominado Image Pro Plus II, que calcula los parámetros característicos de cada gránulo, estos son el diámetro de “feret” mínimo, máximo y medio, así como la esfericidad, que es la razón entre el segmento más largo y más corto del gránulo.

En el gráfico 3.2-4 se indican los segmentos máximo y mínimo de un gránulo, que son utilizados para la determinación del diámetro de “feret” mediante la técnica descrita:

Gráfico 3.2-4. Segmentos mínimo y máximo de un gránulo para el cálculo del diámetro de “feret”.



3.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANAMMOX

La actividad de la biomasa Anammox se determina mediante ensayos en discontinuo o también conocidos como “batch”, en base a la metodología para la medición de actividades nitrificantes propuesta por Buys *et al.* (2000). Dichos ensayos son realizados en viales sellados con volumen total de 32 mL y medio de 25 mL.

Los ensayos se efectúan bajo las siguientes condiciones:

- ✓ 1,0 g SSV/L de biomasa previamente lavada tres veces con tampón fosfato compuesto por 0,143 g $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$ y 0,747 g $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{L}$, para eliminar los iones que interferirían en el ensayo.
- ✓ 150 rpm de agitación lograda con un agitador orbita y una temperatura controlada de 30 ± 1 °C.
- ✓ 70 mg $\text{N-NH}_4^+/\text{L}$ y 70 mg $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ de concentración inicial de sustrato.

El procedimiento experimental es el siguiente:

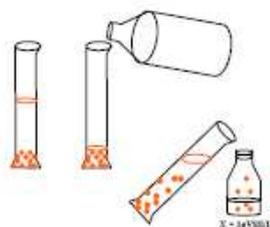
- ✓ Adicionar en el vial la biomasa suspendida en solución tampón
- ✓ Purgar con argón por duplicado las fases gaseosa y líquida del vial, para eliminar el oxígeno disuelto y evitar inhibición de la actividad Anammox
- ✓ Agitar el vial durante 20 minutos en el agitador orbita para alcanzar el equilibrio térmico y evitar variaciones de la presión en función de la temperatura.
- ✓ Despresurizar los viales

- ✓ Añadir los sustratos y tomar el tiempo
- ✓ Realizar un seguimiento de la reacción midiendo el incremento de la presión en el vial con un medidor de presión Centrepoint Electronics hasta que esta permanezca constante, indicando que se ha consumido el sustrato limitante
- ✓ Tomar los valores finales de pH y temperatura. Tomar además una muestra de la fase líquida para analizar las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato

Para facilitar la comprensión, en el gráfico 3.2-5, se presenta un resumen del procedimiento explicado:

Gráfico 3.2-5. Procedimiento para los ensayos de actividad Anammox.

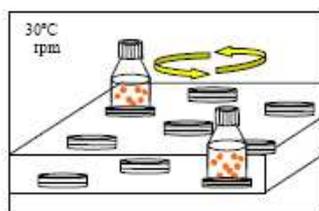
1. Lavado con tampón fosfato



2. Purga con nitrógeno

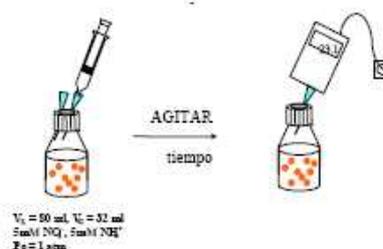


3. Estabilización térmica



4. Adición de reactivos

Medida de ΔP (t)



Fuente: Vázquez, 2005.

La pendiente de la curva que representa la producción de nitrógeno en función del tiempo durante el ensayo, permite determinar la actividad específica de la concentración de biomasa en el vial.

La cantidad de moles de nitrógeno producidos por minuto se calculan según la ecuación:

$$\text{moles } N_2 / \text{min} = \alpha \cdot \frac{V_G}{R \cdot T}$$

Ecuación 3.2-

Donde:

α : pendiente de la recta (variación de la presión en el vial en función del tiempo, atm/min)

V_G : volumen de la fase gas (L)

R : constante de los gases ideales (atm·L/mol·K)

T : temperatura (K)

Y la actividad específica Anammox se determina en función de los moles de nitrógeno gas producidos según la ecuación siguiente:

$$Actividad \left(\frac{gN - N_2}{gSSV \cdot d} \right) = \frac{moles N_2}{min} \cdot \frac{28 g N}{1 mol N_2} \cdot \frac{1}{X \cdot Vr}$$

Ecuación 3.2-

2

Donde:

X : concentración de biomasa en el vial (g SSV/L)

Vr : volumen de la fase líquida en el reactor (L)

3.2.4 IDENTIFICACIÓN DE LA BIOMASA POR FISH

La técnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridation) propuesta por Amann (1995), es utilizada para identificar las poblaciones bacterianas. Consiste en hibridar una fracción de 15 a 20 bases de una zona específica del 16S ARN ribosomal de un determinado microorganismo, con una cadena complementaria de oligonucleótidos de ADN marcada con un tinte fluorescente (puede ser fluoresceína o citocromo 3), la técnica se realiza bajo condiciones específicas de manera que la hibridación solo ocurra cuando todas las bases se unen a sus complementarias en el ARN ribosomal. Los marcajes positivos que son los fluorescentes, se observan utilizando un microscopio de epifluorescencia.

El procedimiento consta de cuatro etapas:

3.2.4.1 Fijación

- ✓ Disgregar la biomasa utilizando una centrífuga
- ✓ Lavar varias veces con tampón fosfato compuesto por 130 mM de NaCl y 10 mM de KH_2PO_4 a pH 7,2

- ✓ Adicionar a la muestra paraformaldehído al 4% en tampón fosfato y mantener la mezcla en hielo durante 1 a 3 horas para minimizar la actividad bacteriana y estabilizar la estructura de las células
- ✓ Lavar nuevamente la muestra y agregar un volumen de etanol al 98% por cada volumen de suspensión
- ✓ Almacenar la muestra a -20 °C hasta su inmovilización

3.2.4.2 Inmovilización

- ✓ Colocar la muestra fijada sobre un portaobjetos, extendiendo 10 µL en cada pocillo del portaobjetos.
- ✓ Secar a 46 °C durante 10 minutos y deshidratar bañando el portaobjetos sucesivamente con soluciones de etanol al 50%, 80% y 98% durante 3 minutos cada una

3.2.4.3 Hibridación

- ✓ Aplicar las sondas de oligonucleótidos a la muestra inmovilizada sobre el portaobjetos, añadiendo a cada muestra 1 µL de sonda por 10 µL de tampón de hibridación que es una mezcla de formamida, cloruro de sodio, Tris/HCl y 10% en peso de Sodio-dodecil-salicilato(SDS).
- ✓ Lavar la muestra introduciéndola por 20 minutos en tampón de lavado a 48 °C, el tampón es una solución de NaCl, etilendiaminotetracético (EDTA), Tris/HCl y SDS.
- ✓ Dejar secar el portaobjetos al aire

3.2.4.4 Tinción

- ✓ Añadir 20 µL de solución 4,6-Diamidino-2-fenilindoldihidrocloruro (DAPI) en cada pocillo de la muestra para teñir el ADN de cualquier microorganismo presente.
- ✓ Dejar secar la muestra

3.2.4.5 Observación al microscopio

- ✓ Añadir media gota de amplificador de fluorescencia (Vectashield) sobre los pocillos del portaobjetos y extenderlo totalmente, de modo que al ubicar el cubreobjetos no queden burbujas de aire
- ✓ Observar la muestra en el microscopio de epifluorescencia

En la tabla 3.2-1 se resume la información concerniente a las sondas utilizadas para la determinación de bacterias:

Tabla 3.2-1. Sondas para la detección de bacterias

Nombre	Secuencia	Formamida %	Organismo detectado	Referencia
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	20	Dominio de las bacterias	Amaan <i>et al.</i> , 1990 a
NEU653 Y comp.	CCC CTC TGC TGC ACT CTA TTC CAT CCC CCT CTG CCG	40	<i>Nitrosomonas</i>	Wagner <i>et al.</i> , 1995
NIT1035 Y comp.	CCT GTG CTC CAT GCT CCG CCT GTG CTC CAG GCT CCG	40	<i>Nitrobacter spp.</i>	Wagner <i>et al.</i> , 1996
Ntspa712 Y comp.	CGC CTT CGC CAC CGG CCT TCC CGC CTT CGC CAC CGG GTT CC	35	Mayoría de <i>Nitrospira</i>	Daims <i>et al.</i> , 2001

3.2.5 RESPIROMETRÍA PARA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

Es una técnica modificada por el Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos de la Universidad de Santiago de Compostela, aplicable a la biomasa bacteriana aerobia cuyo principio es la determinación de la actividad mediante el seguimiento del consumo de oxígeno, diferenciando el consumo por respiración endógena y respiración aerobia. A continuación se resume el procedimiento a seguir:

- ✓ Ajustar en el baño termostático la temperatura a la que se efectuará el ensayo.
- ✓ Calibrar las sondas de oxígeno, colocando 10 mL de agua destilada en uno de los viales y borboteando con aire u oxígeno durante 15 minutos mientras se agita. Luego introducir la sonda, ajustar la lectura del oxímetro a 100% seleccionando correctamente la opción de aire u oxígeno y bloquear el mando de calibración.
- ✓ Una vez calibradas las sondas, ingresar al programa de adquisición de datos del respirómetro adaptado a la computadora.
- ✓ Lavar bien la biomasa 3 ó 4 veces con tampón fosfato compuesto por KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, separando el sobrenadante por decantación, para evitar interferencias en el método.
- ✓ Agregar tampón fosfato a la biomasa lavada y decantada hasta obtener la concentración deseada, generalmente se recomienda 1 g SSV/L.
- ✓ Tomar 10 mL de biomasa resuspendida, poner en dos viales y agitar.

- ✓ Borbotear con aire u oxígeno los viales durante 15 minutos para saturar de oxígeno el medio.
- ✓ Colocar las sondas de oxígeno en los viales, deteniendo un momento la agitación para evitar que queden burbujas de aire bajo la sonda.
- ✓ Retomar la agitación y comenzar a registrar los datos cuando se observe la estabilización en las mediciones de la sonda.
- ✓ Adquirir los datos necesarios de concentración de oxígeno en función del tiempo, de manera que se pueda calcular la pendiente precisa de la gráfica obtenida que corresponderá a la respiración endógena.
- ✓ Añadir 0,1 mL de la respectiva solución de sustrato con una microjeringa. Este paso permite alcanzar las condiciones de saturación o de actividad máxima.
- ✓ Finalizar la toma de datos antes de llegar al 30% de saturación de oxígeno para evitar la disminución de la actividad por limitación de oxígeno.
- ✓ Determinar la concentración de biomasa de cada vial usando la técnica de SSV.

3.3 CÁLCULOS

3.3.1 VELOCIDAD DE CONSUMO DE AMONIO Y VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE NITRATO

La actividad oxidante de amonio y nitrito de la biomasa granular está relacionada con las velocidades de consumo de amonio y producción de nitrato, las mismas que pueden determinarse a partir de las concentraciones de dichos compuestos medidas en intervalos de tiempo, durante un ciclo de operación. Las ecuaciones 3.3-1 y 3.3-2, expresan el cálculo para las velocidades:

$$r_{NH_4^+} = -\frac{[NH_4^+]_2 - [NH_4^+]_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Ecuación 3.3-1}$$

$$r_{NO_3^-} = -\frac{[NO_3^-]_2 - [NO_3^-]_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Ecuación 3.3-2}$$

Donde:

$r_{NH_4^+}$: Velocidad de consumo de amonio (mg N-NH₄⁺/L·h)

$r_{NO_3^-}$: Velocidad de producción de nitrato (mg N-NO₃⁻/L·h)

$[NH_4^+]_1$: Concentración de amonio al tiempo 1 (mg N-NH₄⁺/L)

$[NO_3^-]_1$: Concentración de nitrato al tiempo 1 (mg NO₃⁻/L)

$[NH_4^+]_2$: Concentración de amonio al tiempo 2 (mg N-NH₄⁺/L)

$[NO_3^-]_2$: Concentración de nitrato al tiempo 2 (mg NO₃⁻/L)

t_1 : Tiempo 1, menor que el tiempo 2 (horas)

t_2 : Tiempo 2 (horas)

3.3.2 ACTIVIDAD ESPECÍFICA BACTERIANA A PARTIR DE ENSAYOS DE RESPIROMETRÍA

La actividad específica de la biomasa requiere los valores de las velocidades de consumo de oxígeno por respiración endógena y total.

La velocidad de consumo de oxígeno por respiración endógena corresponde a la pendiente de la curva hasta antes del instante donde se añade el sustrato, expresada en g O₂/L·d

La velocidad de consumo por respiración total será por lo tanto, la pendiente de la curva a partir de la adición de sustrato hasta el final del ensayo, expresada así mismo en g O₂/L·d

La velocidad de consumo de oxígeno debida al sustrato se calcula según la ecuación 3.3-3:

$$r(s)_{O_2} = r(t)_{O_2} - r(e)_{O_2} \quad \text{Ecuación 3.3-3}$$

Donde:

$r(s)_{O_2}$: Velocidad de consumo debida al sustrato (g O₂/L·d)

$r(t)_{O_2}$: Velocidad de consumo por respiración total (g O₂/L·d)

$r(e)_{O_2}$: Velocidad de consumo por respiración endógena (g O₂/L·d)

La actividad específica de la biomasa se obtiene a partir de la ecuación 3.3-4:

$$q = \frac{r(s)_{O_2}}{[biomasa]} \quad \text{Ecuación 3.3-4}$$

Donde:

q : Actividad específica de la biomasa (g O₂/g SSV·d)

[*biomasa*]: Concentración de biomasa (g SSV/L)

La actividad específica de la biomasa en función del sustrato oxidado se obtiene al aplicar la ecuación 3.3-5:

$$q(s) = n * q$$

Ecuación 3.3-5

Donde:

$q(s)$: Actividad específica referida al sustrato (g sustrato/g SSV·d)

n : Coeficiente estequiométrico correspondiente

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 REACTOR AMONIO OXIDANTE

Antes de la presente investigación el reactor R1 fue operado durante 1278 días (Vázquez, 2005), en los que era alimentado con una solución sintética. Dichos datos no constan en el presente trabajo y el día cero en este estudio corresponde al día 1279 de operación, en el cual ya tenía biomasa granular desarrollada y trataba una carga promedio de 300 mg N-NH₄⁺/L. Para este estudio se reemplazó la alimentación sintética por un efluente industrial proveniente del digestor de lodos de una EDAR, como ya se explicó en el Capítulo 3, numeral 3.1.1.1.

La tabla 4.1-1 expresa las características principales del lodo granular en la etapa inicial:

Tabla 4.1-1. Características iniciales de la biomasa granular en R1.

Biomasa (g SSV/L)	IVL (mL/g SSV)	Densidad (g SSV/L _{GRÁNULOS})
7,2	22,5	15

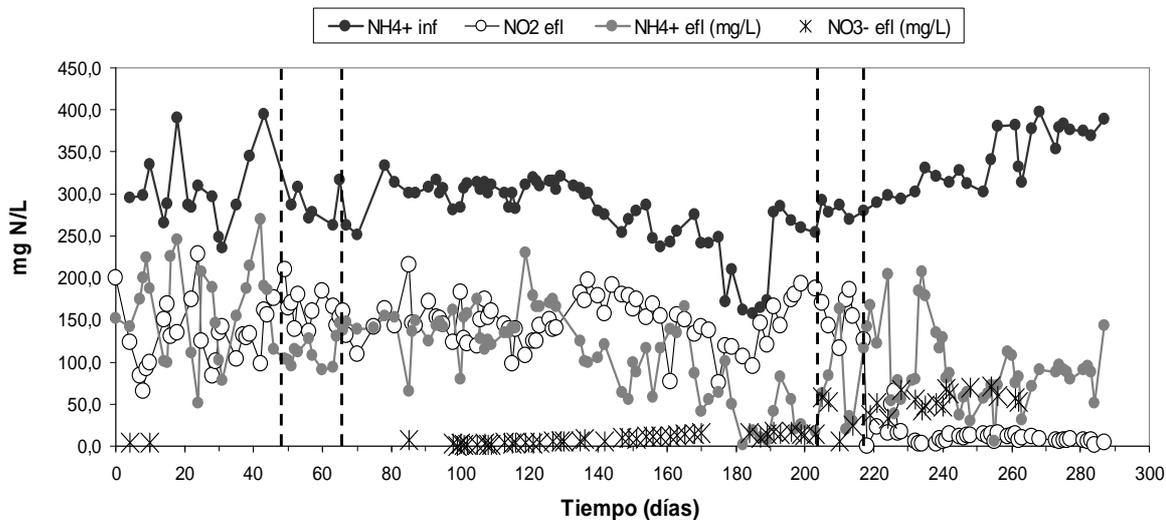
A partir del establecido día cero, el reactor R1 fue operado durante 298 días; durante los que se realizaron tres ajustes importantes en las características operacionales del reactor, estos son:

- ✓ Día 49, disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el reactor de 3 mg OD/L a 2 mg OD/L.
- ✓ Día 203, se estableció una temperatura constante de 20 °C mediante un chaleco de goma con circulación de agua, cuya temperatura es regulada con un termostato.
- ✓ Día 218, se registró el inicio de la actividad Anammox.

4.1.1 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS EN LA FASE LÍQUIDA

En el gráfico 4.1-1, se presentan los resultados de los análisis aplicados, las líneas negras entrecortadas representan los cambios aplicados y registrados, que se han mencionado:

Gráfico 4.1-1. Evolución de las concentraciones de compuestos nitrogenados en el reactor R1



En el gráfico 4.1-1 se incluye un evento no mencionado en el día 66, en el cual se observó espuma en el reactor, sin embargo se puede constatar que no se produjo inestabilidad en el reactor, por lo tanto, la biomasa que se logró obtener previamente a este estudio era ya, muy tolerante a los cambios en las condiciones de operación.

Se observa además, que la tasa de nitrificación de amonio se mantuvo en un 50% durante los primeros 100 días, a partir de ahí esta tasa se incrementó hasta lograr al final de la experimentación un porcentaje entorno al 85% de eliminación de nitrógeno amoniacal. Durante todo el tiempo se observan concentraciones casi nulas de nitratos, por lo tanto se puede decir que la biomasa activa es netamente amonio-oxidante. En los últimos días, debido al desarrollo de la actividad Anammox, se puede observar que también se obtienen concentraciones casi nulas de nitritos.

Respecto al nitrito, se observa que durante la mayor parte del tiempo, antes de que se constatará la presencia de actividad Anammox, las concentraciones obtenidas al final del ciclo se mantenían en el orden de 150 mg N-NO₂⁻/L. Trabajos realizados por Anthonisen *et al.* (1976) atribuyen la acumulación de nitrito en el medio a la inhibición de las bacterias nitrito-oxidantes por la presencia de amonio libre, incluso a partir de valores de 0,1 mg NH₃/L. Estos autores plantearon una ecuación en la cual la concentración de amonio libre depende del

pH, de la concentración de amonio y de la temperatura, factores que para el caso han sido obtenidos experimentalmente.

$$[NH_3] = \frac{[N - NH_4^+] \cdot 10^{pH}}{e^{\frac{6334}{273+T}} + 10^{pH}}$$

Ecuación 4.1-1

Donde:

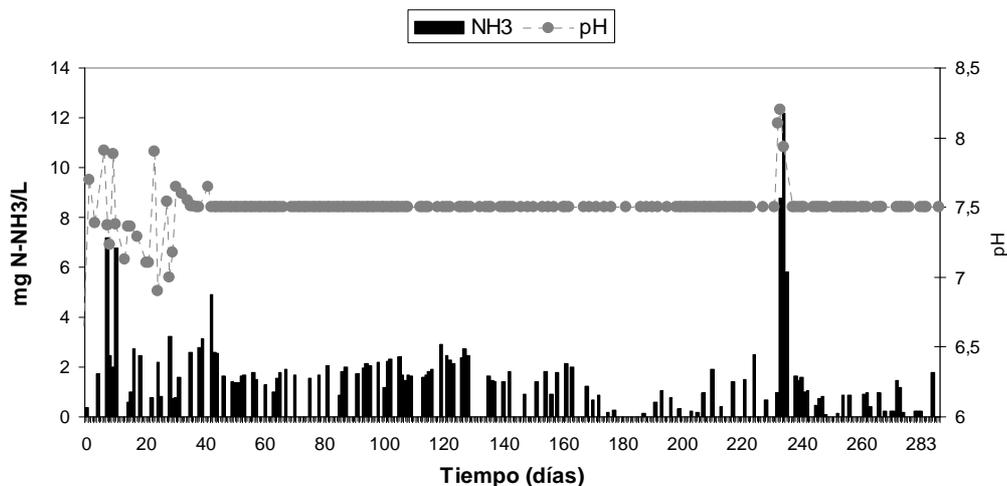
$[NH_3]$: Concentración de amonio libre en el medio (mg NH_3/L)

$[N - NH_4^+]$: Concentración de nitrógeno como amonio (mg $N-NH_4^+/L$)

T : Temperatura del medio ($^{\circ}C$)

A continuación se presenta el gráfico 4.1-2, en que se indican los valores de amonio libre, calculados a partir de la fórmula propuesta por Anthonisen *et al.* (1976):

Gráfico 4.1-2. Evolución de las concentraciones de amonio libre y pH en el reactor R1.

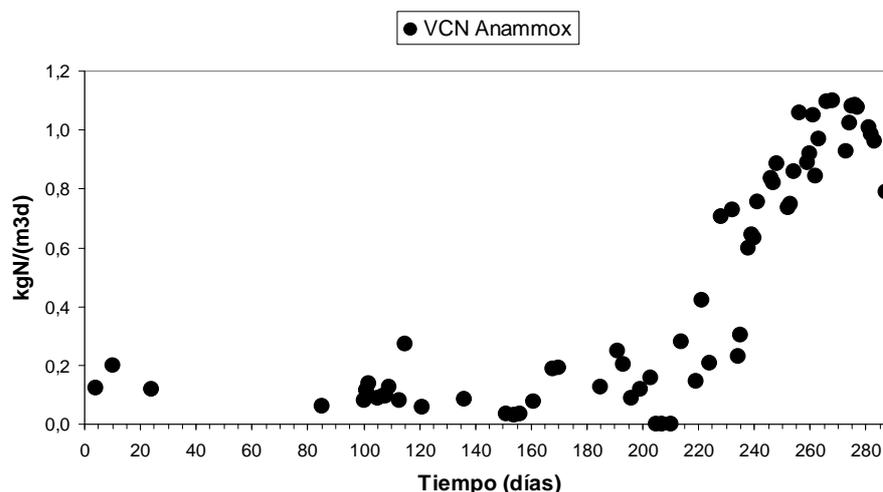


Se puede observar en el gráfico 4.1-2, que existe una inhibición parcial de la reacción nitrito oxidante ya que se encuentran concentraciones de amonio libre superiores a 2 mg NH_3/L , no obstante, para evitar además la inhibición de las bacterias amonio oxidantes que ocurre a valores de amonio libre entorno a los 10 mg NH_3/L , se mantuvo durante todo el tiempo de operación, un pH fijo de 7,5 controlado como ya se explicó en el numeral 3.1.1.1. Este valor de pH es el adecuado para los objetivos que se pretendían lograr en el reactor y por tanto no fue posible evitar la reacción inhibitoria parcial para las bacterias nitrito oxidantes, pero se puede observar que a partir del control de la temperatura a 20 $^{\circ}C$ y el

inicio de la actividad Anammox, las concentraciones de amonio libre disminuyen y es cuando se empiezan a registrar valores casi nulos de nitritos, efecto en el cual colaboran las bacterias tipo Anammox que soportan y requieren concentraciones más altas de nitritos.

En cuanto a la actividad nitrificante-desnitrificante global, representada en este caso por la Variación de Carga Nitrogenada (debida a actividad Anammox), se observa un incremento muy importante durante la última etapa de operación del reactor, tal como lo muestra el gráfico 4.1-3, lo cual es una prueba incuestionable de la presencia de biomasa Anammox. Se observa claramente, que durante los primeros días de operación esta actividad fue prácticamente nula.

Gráfico 4.1-3. Actividad de la biomasa en el reactor R1

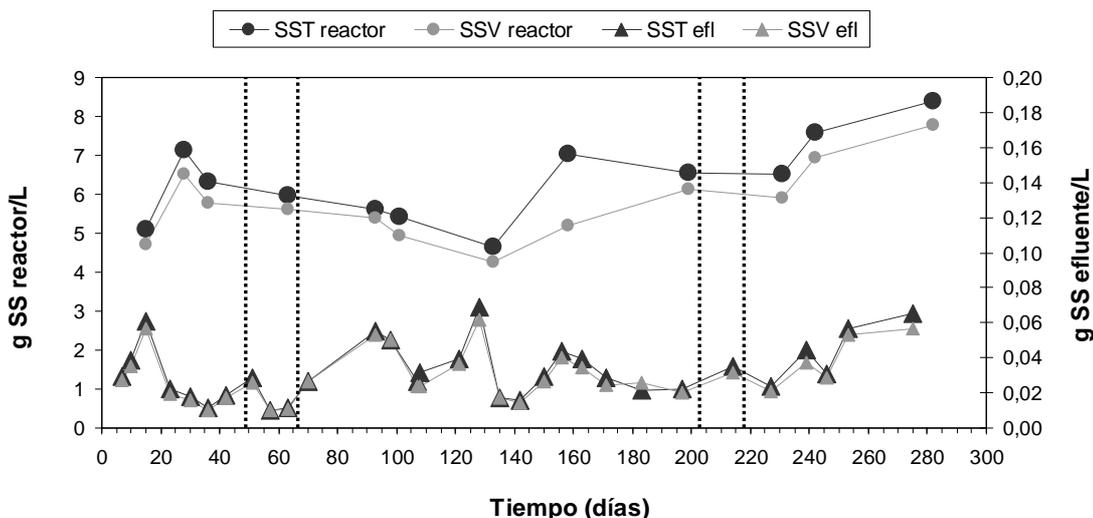


4.1.2 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA Y ASPECTOS DE LA FASE SÓLIDA

4.1.2.1 Concentración de biomasa

Las concentraciones de sólidos suspendidos totales y volátiles mostraron las variaciones que se muestran en el gráfico 4.1-4:

Gráfico 4.1-4. Evolución de la concentración de sólidos en R1.



En el gráfico 4.1-4, durante los primeros meses de operación, se observa una ligera reducción de la concentración celular en el reactor, la misma que se ve incrementada en el análisis del efluente, lo que significa que ocurrió un lavado de la biomasa, debido a la primera modificación realizada. La disminución de oxígeno provocaría un desprendimiento de los microorganismos adheridos al gránulo en su afán por captar el poco oxígeno disponible en la fase líquida. Aún así, la buena estabilidad del sistema granular permite una rápida recuperación a los niveles iniciales una vez lograda la adaptación, a partir de entonces como es lo esperado, se observa un incremento notorio de la concentración de biomasa en el reactor (SSV) y una disminución de los sólidos totales y volátiles en el efluente. Cabe mencionar, que queda entonces comprobada la buena capacidad de este tipo de sistemas para la eliminación de los sólidos suspendidos totales.

A partir de que se modifica la temperatura y se detecta actividad Anammox, se observa un lavado muy ligero de células, pero el sistema vuelve a recuperar biomasa rápidamente, presentando las concentraciones más altas registradas a lo largo del tiempo de operación.

4.1.2.2 Tiempo de retención celular

Considerando el volumen útil del reactor en 1,75 L y el caudal en 7,2 L/d, el tiempo de retención celular (TRC) ha sido calculado según la ecuación 4.1-2:

$$TRC = \frac{[SSVr] \cdot V}{[SSVefl] \cdot Q}$$

Ecuación 4.1-2

Donde:

TRC : Tiempo de retención celular (días)

$[SSV_r]$: Concentración de biomasa en el reactor (g SSV/L)

$[SSV_{eff}]$: Concentración de biomasa en el efluente (g SSV/L)

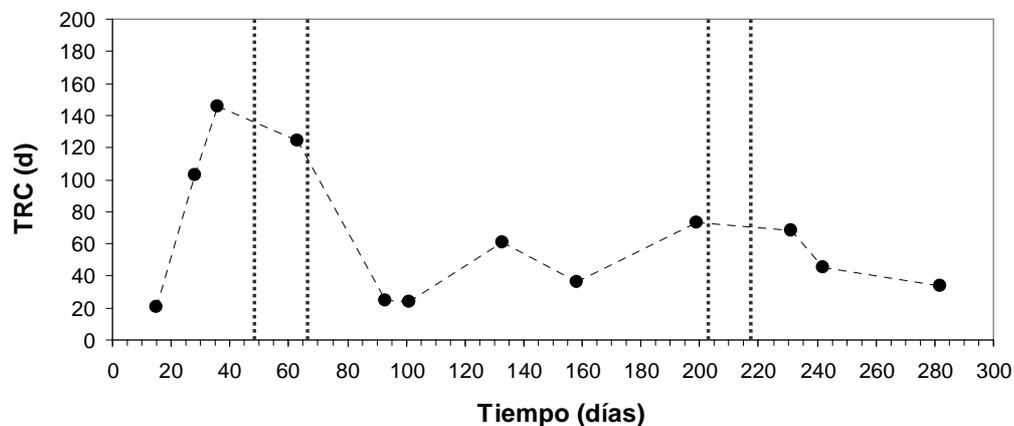
V : Volumen útil del reactor (L)

Q : Caudal de alimentación (L/d)

Es necesario destacar que el reactor R1 operaba anteriormente con alimentación sintética que no presentaba grandes variaciones en sus componentes; para la presente investigación se utilizó un sustrato industrial en cuya caracterización se encontraron concentraciones muy bajas de carbono orgánico y amplias fluctuaciones en la concentración de amonio.

En el gráfico 4.1-5 se presenta la variación del tiempo de retención celular a lo largo del tiempo de operación:

Gráfico 4.1-5. Evolución del tiempo de retención celular en R1.



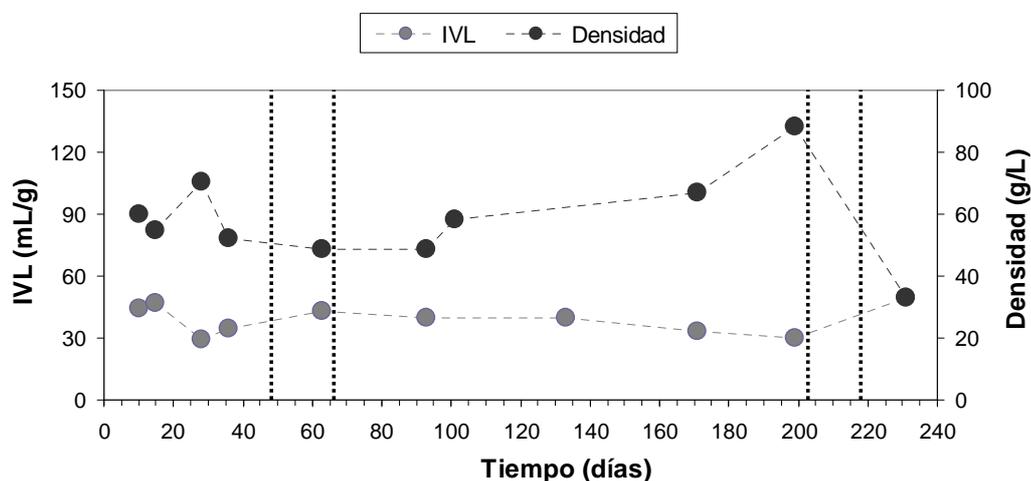
El reactor operaba al inicio con un TRC de 20,3 días que al poco tiempo se incrementó a valores mayores de 100 días, seguramente debido a la adaptación de la biomasa a las nuevas condiciones. A partir del día 90 los TRC se mantuvieron en valores entorno a 50 días que es lo recomendado por Beun et al. (1999), para sistemas de biopelícula y granulares nitrificantes. El inicio de la actividad Anammox denota una ligera disminución en los TRC, pues esto conlleva a la aparición de otro tipo de microorganismos que requieren condiciones diferentes para su crecimiento, sin embargo como se observó que la

concentración de biomasa dentro del reactor se incrementó, los bajos TRC posiblemente se explican en la rápida generación de biomasa nueva, debido a que probablemente la biomasa Anammox, se encuentre en su fase de crecimiento exponencial a la que se suma cierto porcentaje de decaimiento de la biomasa nitrificante.

4.1.2.3 Índice volumétrico de lodos y densidad de la biomasa

Durante la operación del reactor se ha comprobado el perfeccionamiento de las características del lodo granular mediante el índice volumétrico de lodos (IVL) y la densidad.

Gráfico 4.1-6. Evolución del IVL y la densidad de la biomasa en R1.

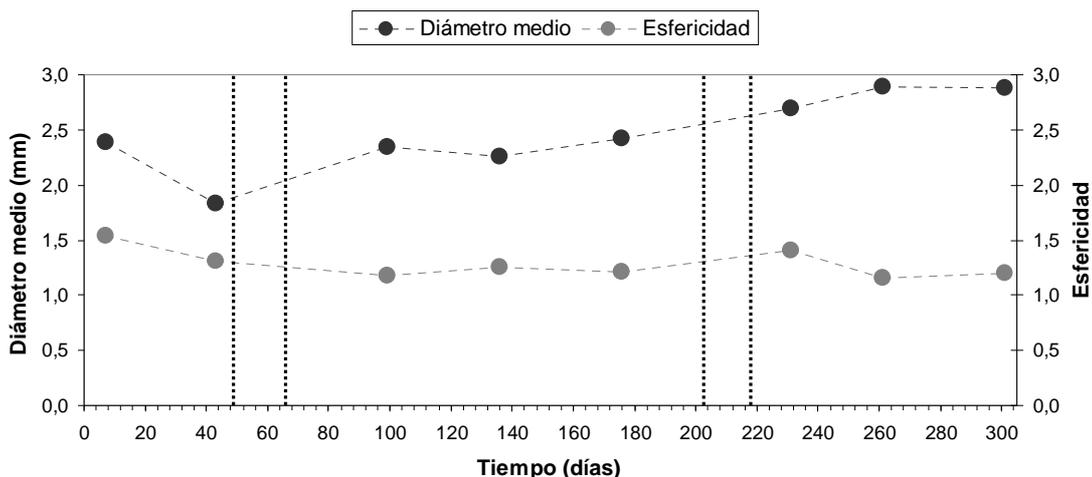


De manera general, en el gráfico 4.1-6 se observa para la densidad, una tendencia al incremento que va de la mano con la concentración de la biomasa y para el IVL se observa una ligera tendencia a la disminución. A medida que se detecte un mayor peso por unidad de volumen y un menor volumen por unidad de peso, las características de la biomasa son mejores para una rápida decantación y para mantener la cohesión de los agregados (gránulos). La razón por la que se observa en el dato final, las tendencias opuestas a lo que deberían, se explica precisamente por la presencia de pequeñas burbujas de gas (nitrógeno) producto de la actividad Anammox, que a veces son retenidas dentro de los gránulos, ya que como se ha mencionado, las bacterias Anammox se encuentran en las capas más internas del gránulo.

4.1.2.4 Esfericidad y diámetro medio de la biomasa

Estos parámetros que también colaboran en la evaluación del estado de los gránulos han sido determinados mediante la distribución de tamaños medios y estadísticos de los gránulos. Los resultados de la evolución de los diámetros por frecuencia y su esfericidad se presentan en el gráfico 4.1-7:

Gráfico 4.1-7. Diámetro medio (mm) y Esfericidad de la biomasa granular en R1.



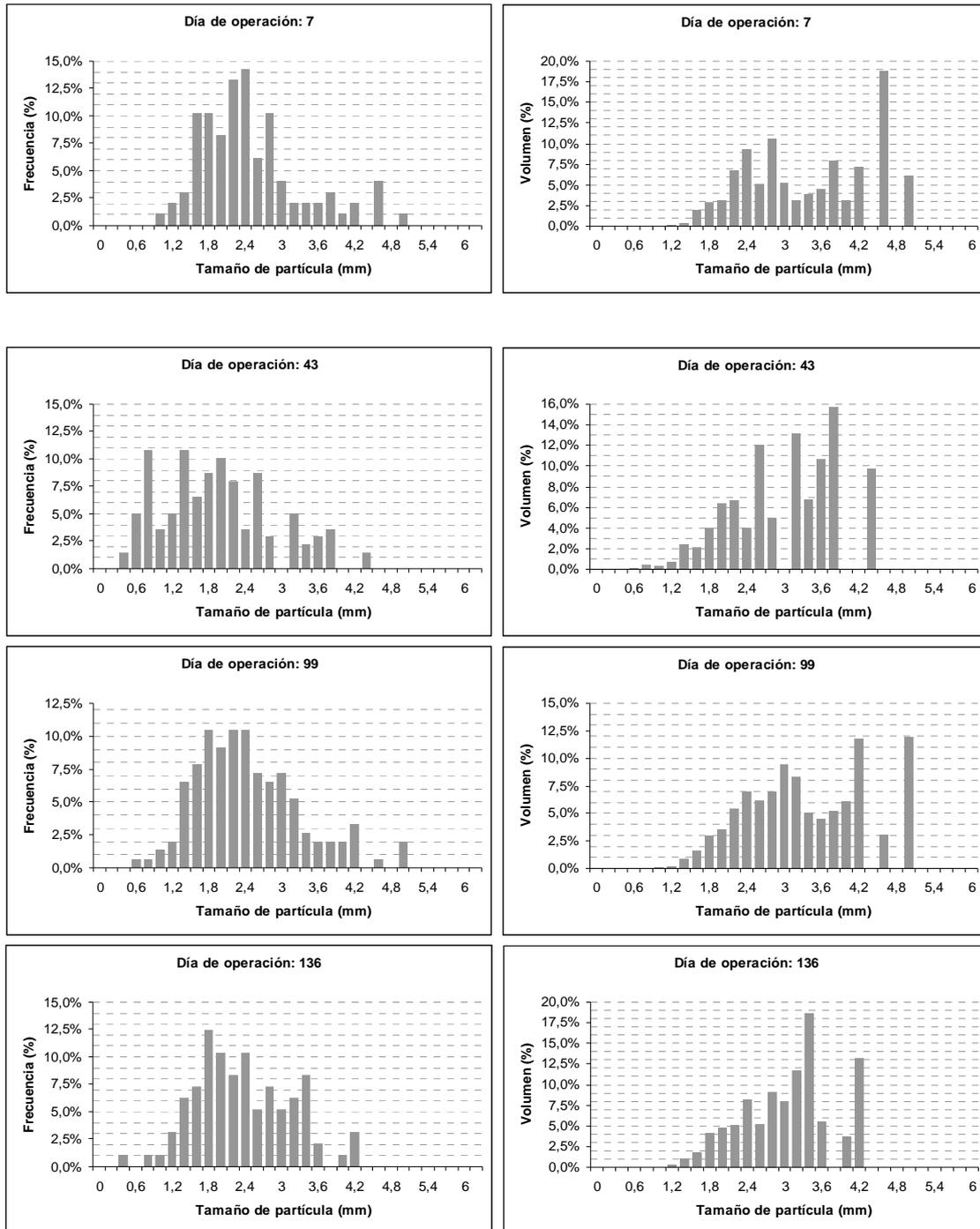
El diámetro de los gránulos y su esfericidad fueron determinados mediante el programa informático “RS Image”, con el cual se obtienen las imágenes de los gránulos y el programa “Image-Pro Plus” que determina los tamaños granulares en base a las imágenes adquiridas, así como la medida de la esfericidad.

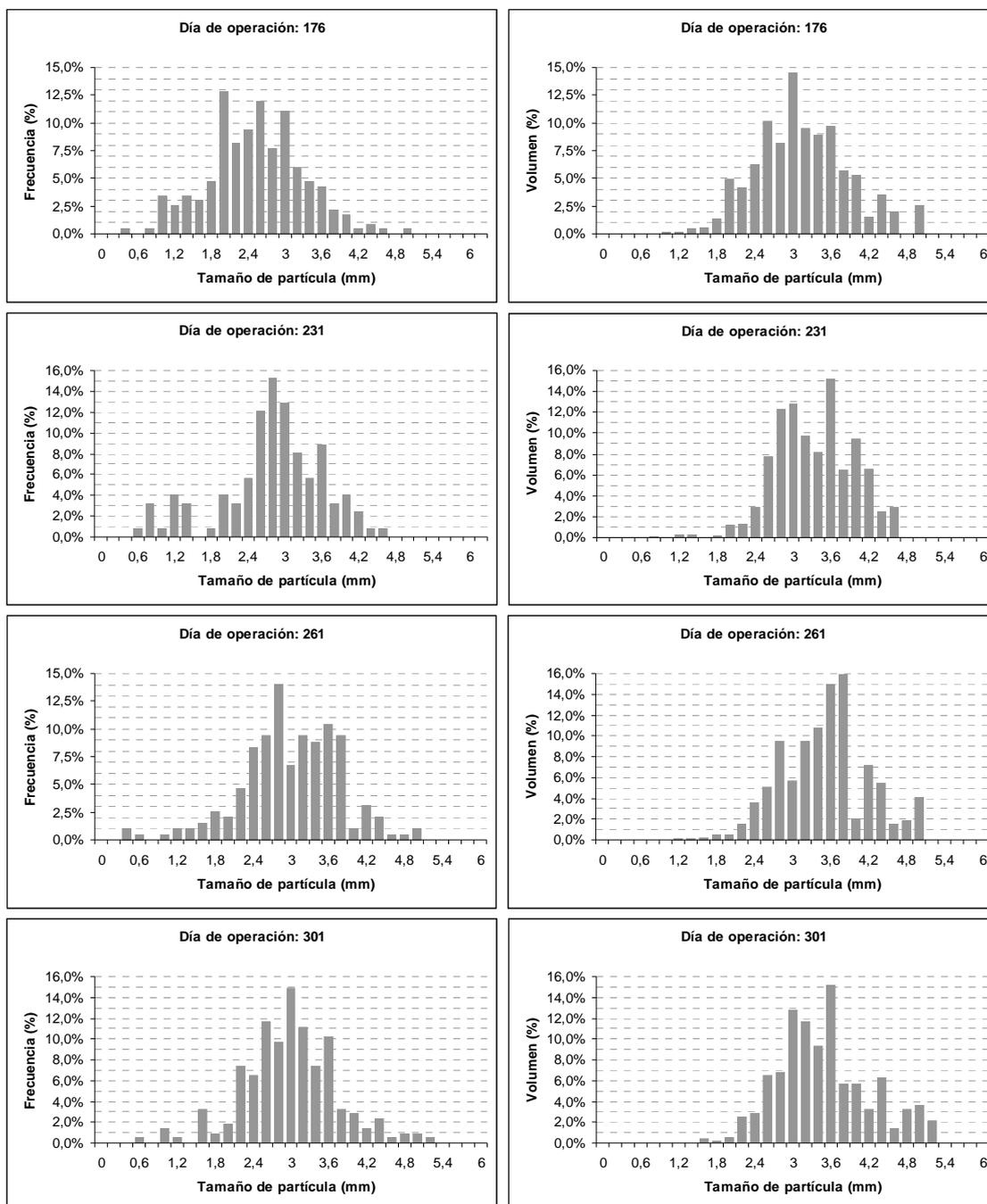
La esfericidad evalúa la relación entre el perímetro real de la superficie proyectada por el gránulo en la imagen, y el perímetro de un círculo perfecto en base al diámetro medio calculado. Se puede observar en el gráfico 4.1-7 a lo largo del tiempo, que este parámetro tiende a disminuir y aproximarse a 1, lo cual indica que los gránulos van adquiriendo una forma más cercana a una esfera, por lo tanto, su estructura se estabiliza cada vez más.

En cuanto al diámetro medio, éste aumenta con el tiempo hasta que llega a estabilizarse en un valor de 3,00 mm. Este tamaño es superior al logrado por autores como Ivanov *et al.* (2004), Beun *et al.* (1999) y Tsuneda *et al.* (2004), por tanto se demuestra que es posible obtener gránulos aerobios autótrofos de calidad netamente nitrificante y desnitrificante (para la biomasa Anammox).

En el gráfico 4.1-8, se muestran las distribuciones de tamaños por frecuencia y por volumen; la frecuencia expresa el número de gránulos encontrados por rango de diámetros, mientras que el volumen expresa la sucesión de porcentajes de volumen ocupado por rango de diámetros.

Gráfico 4.1-8. Distribución porcentual de la frecuencia y volumen de diámetros de gránulo en R1.





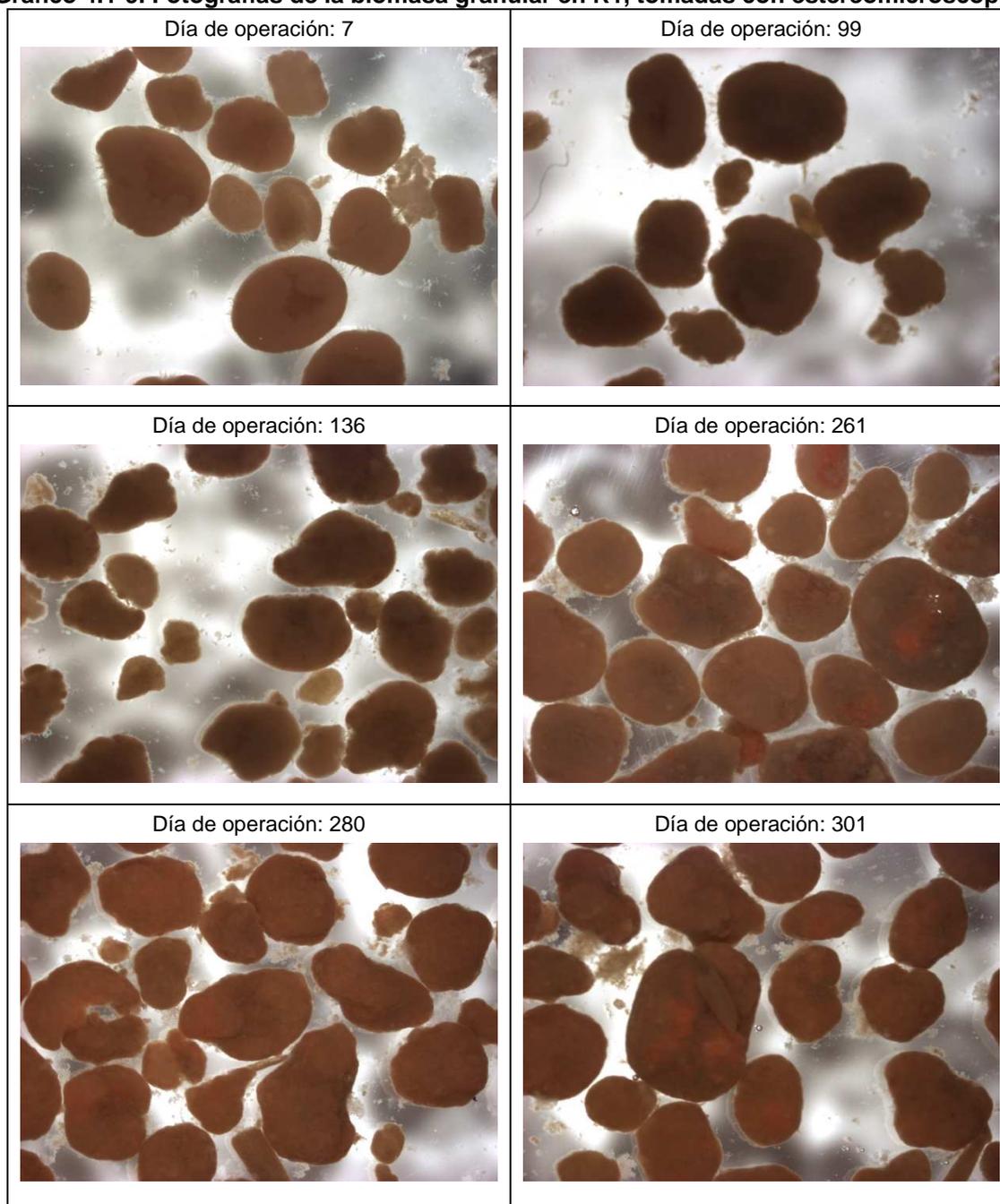
Se observa en el gráfico 4.1-8, que la distribución de tamaños de gránulos por frecuencia se desplaza cada vez más hacia los mayores diámetros; los mayores porcentajes se encuentran entre los 2,0 y los 3,6 mm. En cuanto a la distribución volumétrica, se observa que en promedio, los gránulos de diámetros entre 3 y 4 mm ocupan la mayor parte del espacio en el reactor, por lo tanto son éstos los que entran en contacto con la mayoría de sustrato alimentado. Para ambos casos, se puede descubrir que al transcurrir el tiempo los gránulos pequeños van perdiendo importancia, favoreciendo la agregación microbiana.

4.1.2.5 Aspecto de la biomasa

Las características físicas del lodo granular son también útiles para evaluar el progreso del crecimiento y los fenómenos de agregación microbiana.

Se muestran por lo tanto, en el gráfico 4.1-9, las fotografías tomadas con el programa "RS Image", a una resolución de 0,65X, que permitirán corroborar el desarrollo favorable de los gránulos nitrificantes:

Gráfico 4.1-9. Fotografías de la biomasa granular en R1, tomadas con estereomicroscopio.



En las fotografías presentadas en el gráfico 4.1-9, se observa el mejoramiento del aspecto de la superficie del gránulo, que se nota cada vez más liso, así como una apariencia más cercana a la esfericidad. Durante los últimos días de operación se observa una variación en el color, el mismo que se presenta en un tono anaranjado en ciertas zonas del gránulo. Esta es una de las características de la biomasa Anammox, que está presente bajo la capa superficial de bacterias nitrificantes, debido a su baja tolerancia a los medios aerobios.

Se observan en algunas fotografías, pequeños trozos de biomasa desprendida debido a los choques producidos entre los gránulos, sin embargo es totalmente escasa la presencia de bacterias filamentosas y partículas floculentas, asegurando que el reactor contiene solamente biomasa granular.

4.2 REACTOR NITRITO OXIDANTE R3

Este reactor fue operado durante 240 días, alimentado con un sustrato sintético sin fuente de carbón orgánico e inoculado con biomasa en proceso de granulación. Como ya se ha mencionado, el objetivo era desarrollar biomasa granular netamente nitrito oxidante, para lo cual se utilizó un sistema SBR en un ciclo de seis horas logrando tratar en promedio un volumen de 2,2 L por día.

Las características principales del lodo granular en la etapa inicial, se mencionan en la tabla 4.2-1:

Tabla 4.2-1. Características iniciales de la biomasa granular en R3.

Biomasa (g SSV/L)	IVL (mL/g SSV)	Densidad (g SSV/L _{GRÁNULOS})
0,65	25,6	83,7

Las variaciones evaluadas en R3, fueron los incrementos progresivos de la carga de nitrógeno como nitritos, el caudal de alimentación y el efecto de la variación de la concentración de bicarbonato en el influente.

La carga de nitrito en la composición sintética se incrementó de 0,05 a 0,5 g N-NO₂⁻/L, como se resume en la tabla 4.2-2:

Tabla 4.2-2. Variación de la concentración de nitrito en R3.

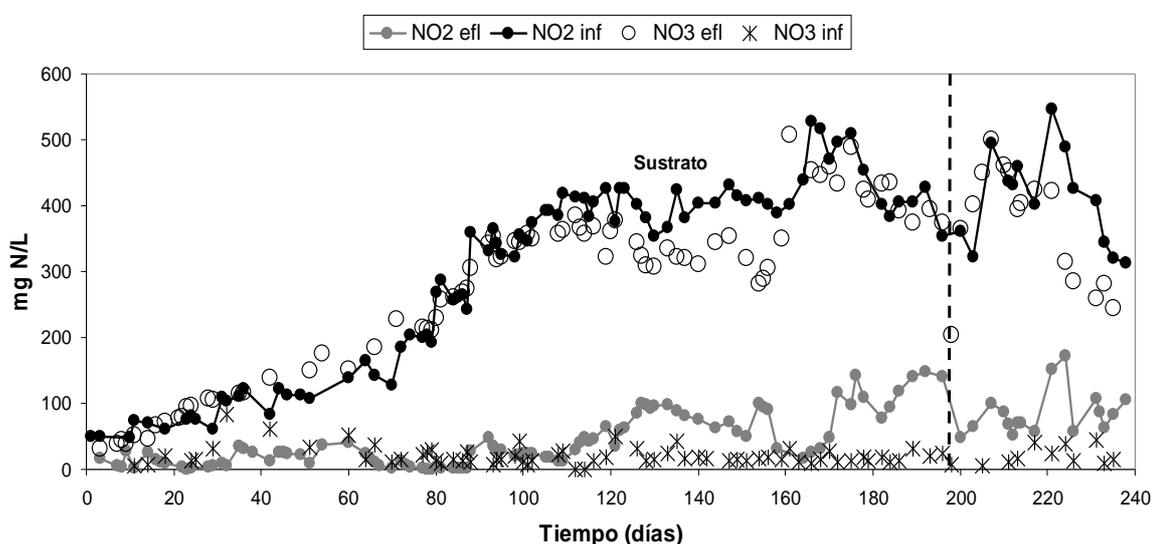
Día	31	43	52	71	88	102	140	165
Concentración de nitrito (g N-NO ₂ ⁻ /L)	0,125	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400	0,500

La concentración de bicarbonato fue de 1g/L la mayor parte del tiempo, pero durante algunos días se operó con una concentración de 10 g/L y posteriormente se dejó de añadir el bicarbonato.

4.2.1 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS EN LA FASE LÍQUIDA

En el gráfico 4.2-1 que se presenta a continuación, constan los resultados de las analíticas aplicadas, con la intención de analizar cómo afectaron los cambios operacionales aplicados:

Gráfico 4.2-1. Evolución de las concentraciones de compuestos nitrogenados en el reactor R3



En el gráfico 4.2-1, se resalta con una línea negra entrecortada el día en que fue retirado el bicarbonato de la alimentación sintética, por ser el único evento que causó una ligera desestabilización en el sistema, sin embargo se observa que la recuperación de las condiciones normales fue inmediata, pudiendo asegurar que en este caso también se logró montar un sistema con biomasa muy estable y tolerante a las variaciones operacionales.

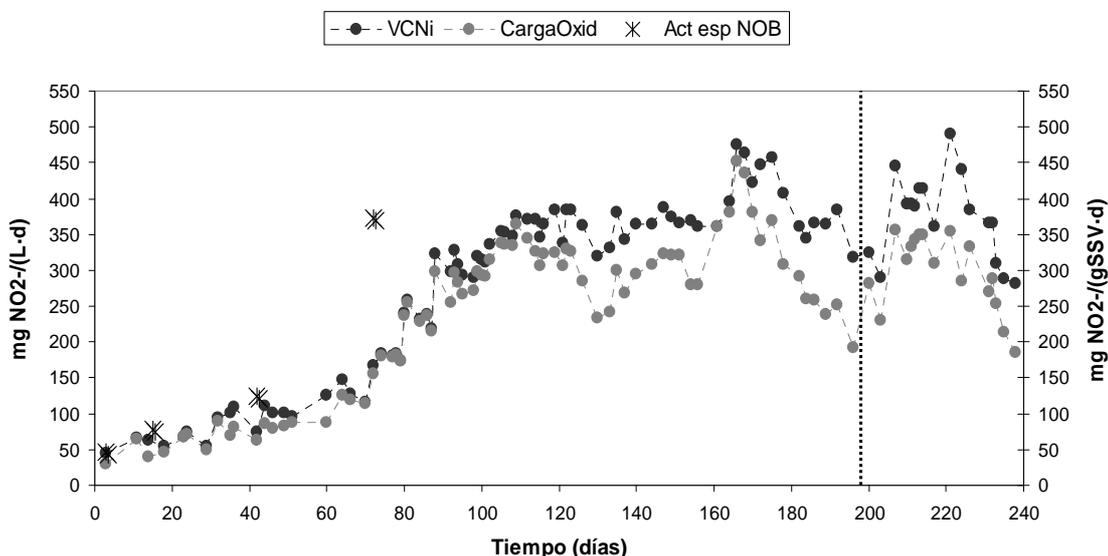
La tasa de nitrificación de nitrito a nitrato, alcanzó un porcentaje entre el 90% y el 100% durante todo el tiempo de operación, el incremento progresivo de la carga de nitrito no afectó el rendimiento de la biomasa, mejor aún esto permitió la adaptación de la misma a las condiciones del medio. Se obtiene en el efluente del reactor al final de cada ciclo, una concentración de nitratos equivalente a los nitritos en la alimentación, por lo tanto se puede decir que la biomasa activa fue

netamente nitrito-oxidante. Durante los últimos días de funcionamiento, se observan concentraciones entorno a 50 mg N-NO₂⁻/L en el efluente, determinando que la carga límite que puede soportar este tipo de biomasa para conservar la estabilidad y el rendimiento es en promedio 500 mg N-NO₂⁻/L. Los cambios por ausencia de bicarbonato o variaciones en las concentraciones del mismo no son determinantes, por lo que se puede mantener este tipo de sistema con bicarbonato o en ausencia de este, ya que no hubo alteraciones en los valores de pH, cabe destacar que una gran ventaja de este reactor es que no hubo necesidad de establecer un sistema de control del pH.

En este reactor no se evaluó la dependencia de la actividad nitrificante en función de la variación de la temperatura. Tampoco se observaron problemas de inhibición por sustratos ni productos.

En cuanto a la Velocidad de Carga Nitrificante (VCN) y la actividad específica de la biomasa, tal como lo muestra el gráfico 4.2-2, se observa un incremento a lo largo del tiempo, asegurando un desarrollo de la biomasa nitrito oxidante:

Gráfico 4.2-2. Actividad nitrificante y actividad específica de la biomasa en R3.



La VCN y la carga oxidada representan la actividad en conjunto del sistema, la concentración de sustrato alimentado y oxidado en el transcurso de un día. La actividad específica de las bacterias nitrito-oxidantes (NOB), muestra la actividad puntual de las bacterias sobre el sustrato alimentado en función de la respiración endógena y exógena; representa la cantidad de sustrato que un gramo de células

es capaz de degradar por unidad de tiempo. Mientras estos parámetros aumenten, el sistema mejora y se mantiene estable, para este reactor se ha comprobado mediante estos factores una evolución muy favorable a lo largo del tiempo y una actividad alta de la biomasa oxidante de nitrito.

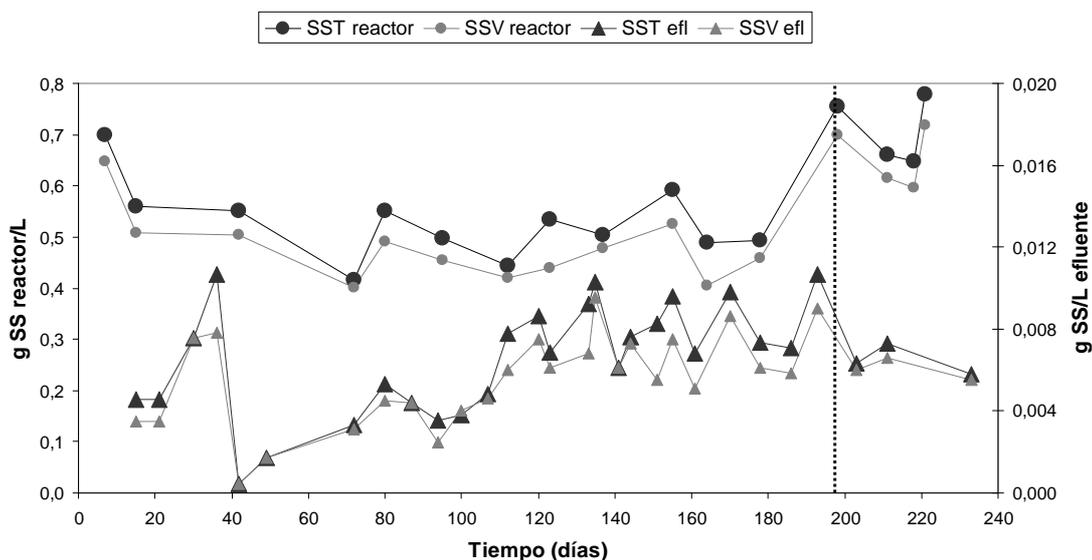
A partir del día 152 en que se agregó la mayor concentración de bicarbonato en el efluente y luego en el día 198 que éste fue retirado totalmente, se observan variaciones amplias de las actividades y en general una tendencia a la disminución de las mismas, entonces, a pesar de que el sistema tiene una buena eliminación de nitritos sin bicarbonato o con altas concentraciones del mismo, se reconoce que el sistema permanece más estable cuando se conserva una concentración de bicarbonato de 1 g/L.

4.2.2 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA Y ASPECTOS DE LA FASE SÓLIDA

4.2.2.1 Concentración de biomasa

Las concentraciones de sólidos suspendidos totales y volátiles mostraron las variaciones que se presentan en el gráfico 4.2-3:

Gráfico 4.2-3. Evolución de la concentración de sólidos en el reactor R3.



Durante los primeros 100 días de operación, se observa una ligera reducción de la concentración celular en el reactor, sin embargo no se observa un incremento constante de los sólidos en el análisis del efluente, lo que significa que no hubo un lavado importante de la biomasa. El punto donde la concentración de SSV en el

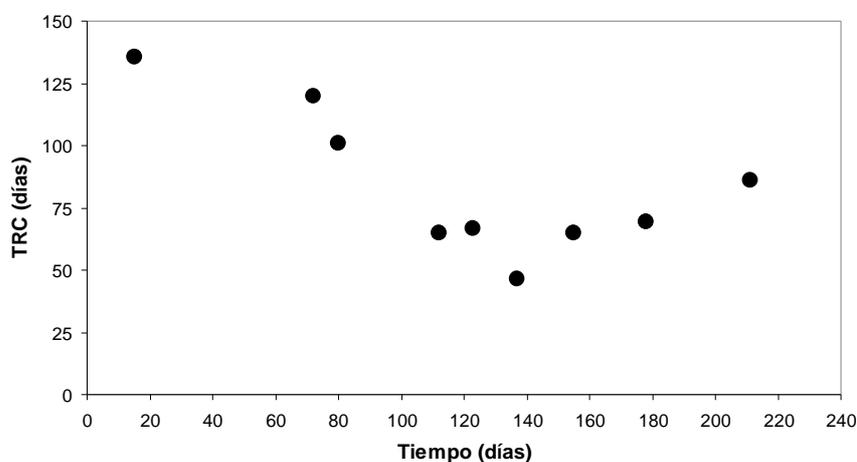
efluente es más alta, coincide con la mayor concentración de bicarbonato añadido a la alimentación, sin embargo la adaptación de los microorganismos a esta condición es rápida. Durante los últimos días de operación se observa que el lavado de la biomasa y la concentración de sólidos totales en el efluente disminuyen, en cambio aumenta la concentración de bacterias en el reactor, evidenciando un buen desarrollo de la biomasa granular, esto coincide con la eliminación del bicarbonato en el efluente, sin embargo se requerirían otras pruebas para analizar si la ausencia de bicarbonato favorece el crecimiento de este tipo de bacterias.

En general, se deduce que este sistema, al igual que el reactor R1, es también muy eficiente en cuanto a la remoción de sólidos suspendidos totales.

4.2.2.2 Tiempo de retención celular

Considerando el volumen útil del reactor en 2,0 L y el caudal en 2,16 L/d, el tiempo de retención celular (TRC) ha sido calculado según la ecuación mostrada para el reactor R1, los resultados se indican en el gráfico 4.2-4:

Gráfico 4.2-4. Tiempo de Retención Celular en el Reactor R3.



La alimentación sintética suministrada a R3, no presentaba grandes variaciones en las concentraciones de sus componentes, el incremento en la carga de nitritos fue un factor controlado. Esta alimentación tampoco contenía carbono orgánico. El reactor operó al inicio con un TRC de 135,4 días y se mantuvo cercano a ese valor durante los tres primeros meses, cabe señalar que los altos TRC favorecen el enriquecimiento de la biomasa, muy necesario durante la etapa de adaptación a las condiciones del medio. A partir del día 112 los TRC se mantuvieron en valores

promedio de 60 días que es un poco mayor a lo recomendado por Beun *et al.* (1999), para sistemas de biopelícula y granulares nitrificantes. La ausencia de bicarbonato en la alimentación a partir del día 200 indica un ligero incremento de los TRC, pues esto conlleva a la necesidad de adaptación de los microorganismos a la nueva condición.

4.2.2.3 Índice volumétrico de lodos y densidad de la biomasa

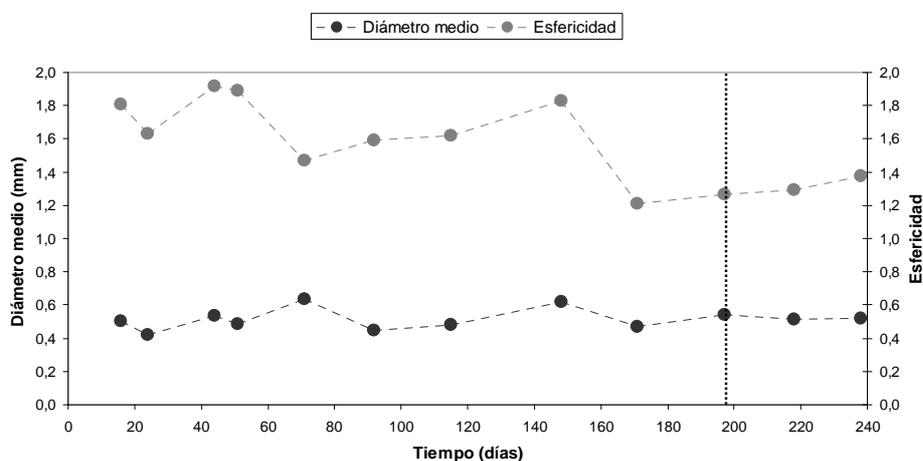
Debido a que para estos parámetros no se cuentan con datos suficientes como para delinear una tendencia real, la única observación que se puede realizar es que la densidad se incrementó hasta valores cercanos a 100 g/L que conjuntamente con el aumento de la concentración de biomasa, evidencian el mejoramiento de las propiedades del lodo granular.

En cuanto al IVL se observa una ligera tendencia a la disminución hasta valores cercanos a 20 mL/g; de manera general esto significa que también en este reactor, al igual que en R1, se consigue una buena capacidad de decantación y formación de agregados (gránulos). De manera similar a los otros parámetros, se observan datos contrarios a la tendencia general en el día 200 en que se retiró el bicarbonato, por lo tanto este cambio ha sido el más importante durante todo el tiempo en que fue operado el reactor R3.

4.2.2.4 Esfericidad y diámetro medio de la biomasa

Para el caso del reactor R3, se observan las tendencias que se presentan en el gráfico 4.2-5, cuyos valores fueron determinados con la metodología explicada para el reactor R1:

Gráfico 4.2-5. Diámetro medio (mm) y Esfericidad de la biomasa granular en R1.

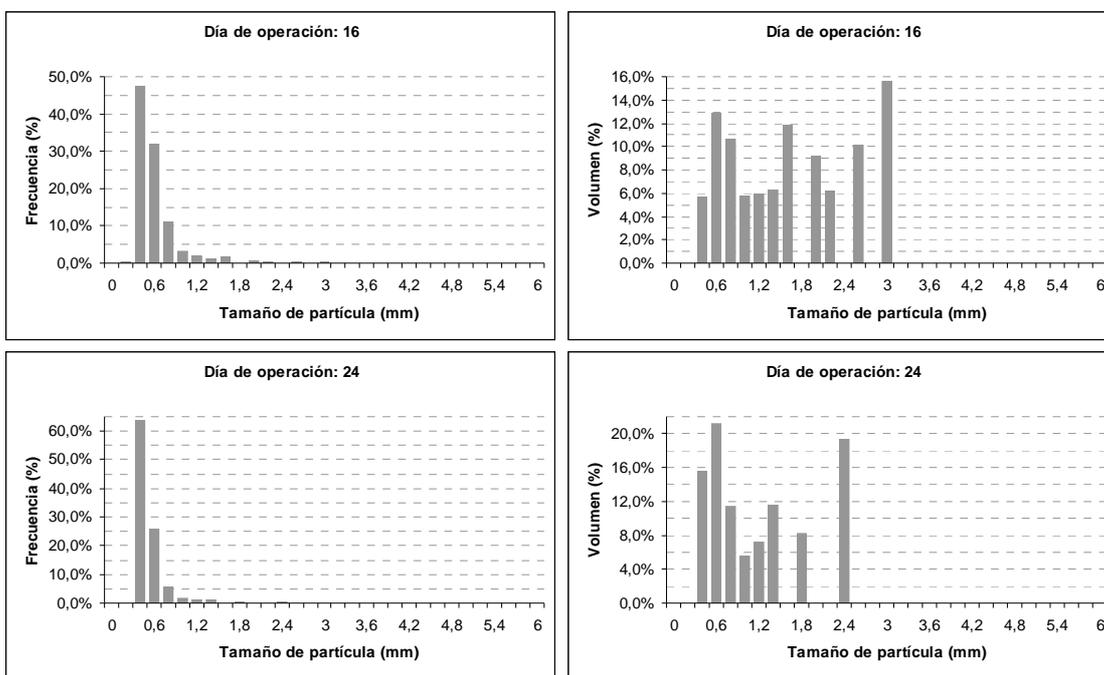


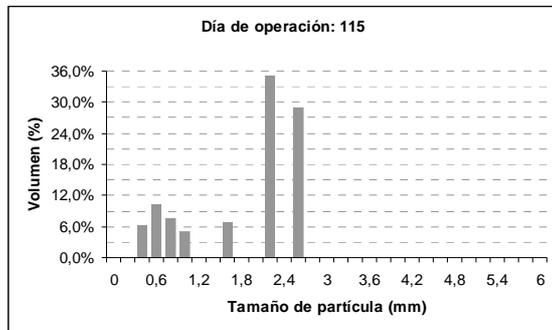
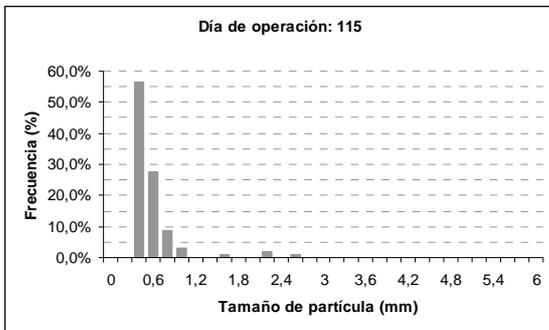
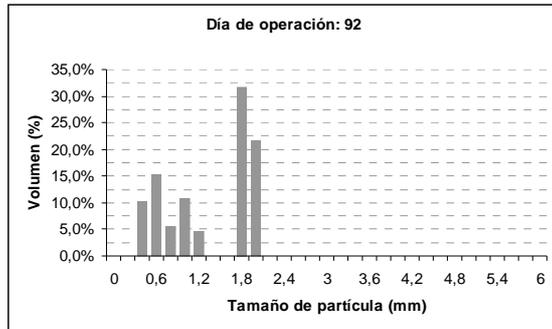
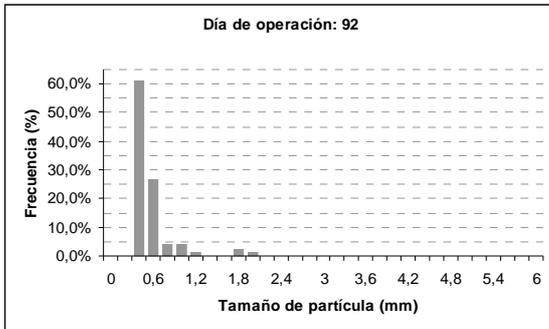
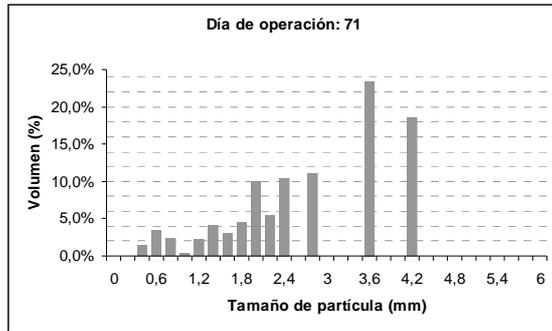
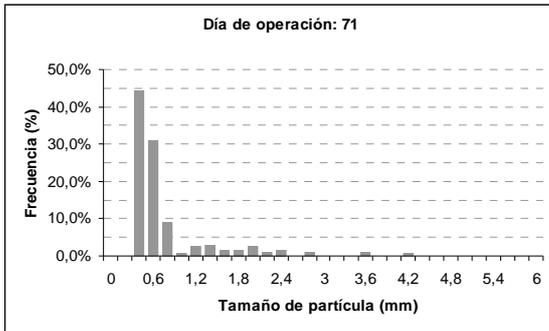
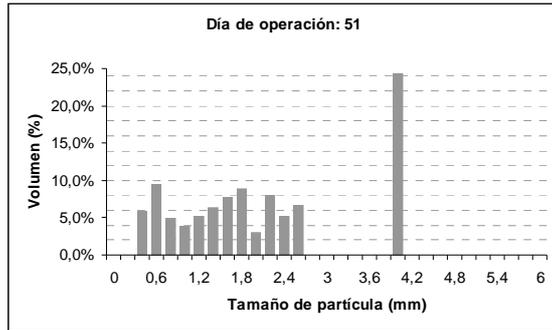
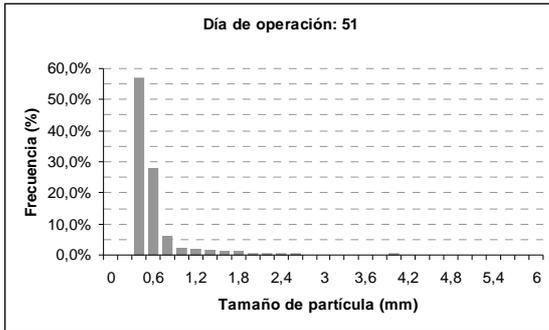
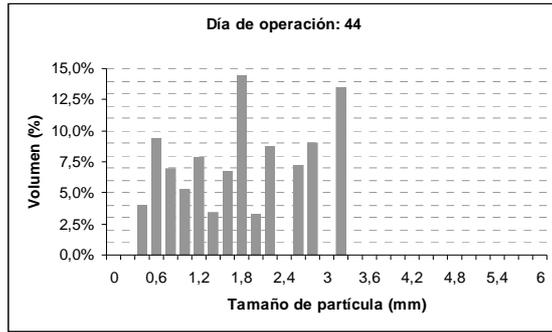
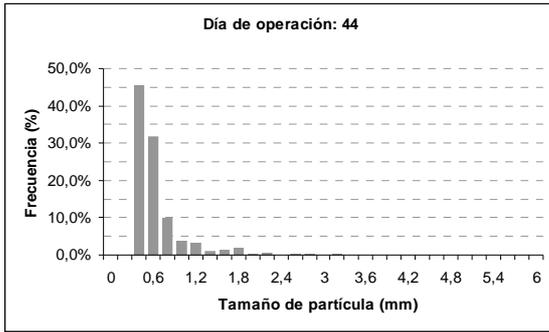
Se observa en el gráfico 4.2-5, construido en base a las imágenes adquiridas, que la esfericidad inicia con valores altos cercanos a 2,00. Esto explica, como se mostrará más adelante, la forma irregular que presentaban los gránulos en el inicio, sin embargo a partir del día 180 hay una notable disminución de estos valores que tienden a ubicarse en un promedio de 1,4 que responden a un aspecto más redondeado y compacto de los gránulos.

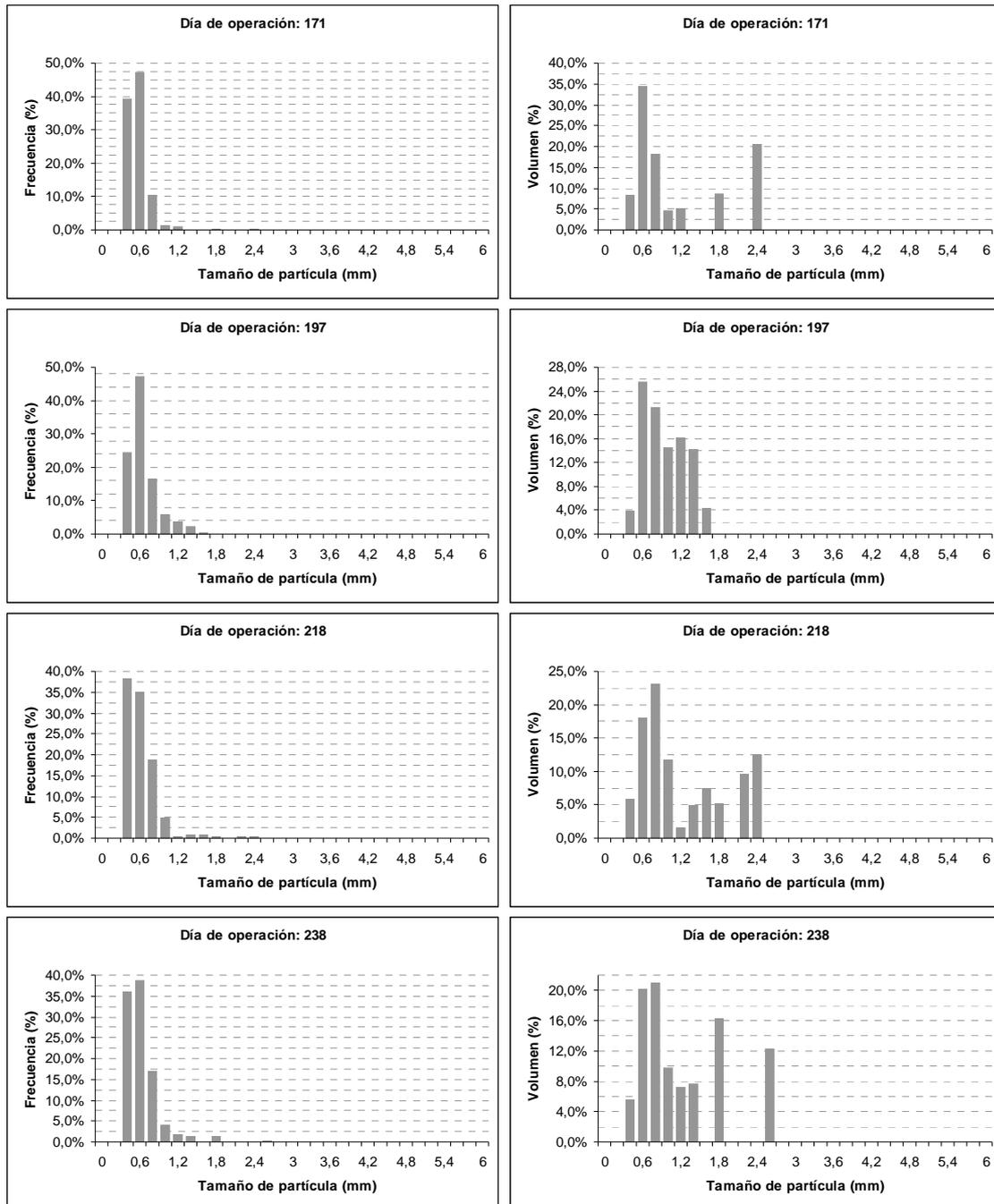
El diámetro medio se ubica en valores entre 0,4 y 0,6 mm a lo largo de todo el tiempo de operación, sin presentar mayores variaciones. Probablemente los gránulos no aumentaron de tamaño debido a que no estaban formados por una amplia diversidad de especies bacterianas.

En el gráfico 4.2-6, se muestran las distribuciones de tamaños por frecuencia y por volumen; como se explicó anteriormente, la frecuencia expresa el número de gránulos por rango de diámetros, mientras que el volumen expresa la sucesión de porcentajes de volumen por rango de diámetros.

Gráfico 4.2-6. Distribución porcentual de la frecuencia y volumen de diámetros de gránulo en R3.







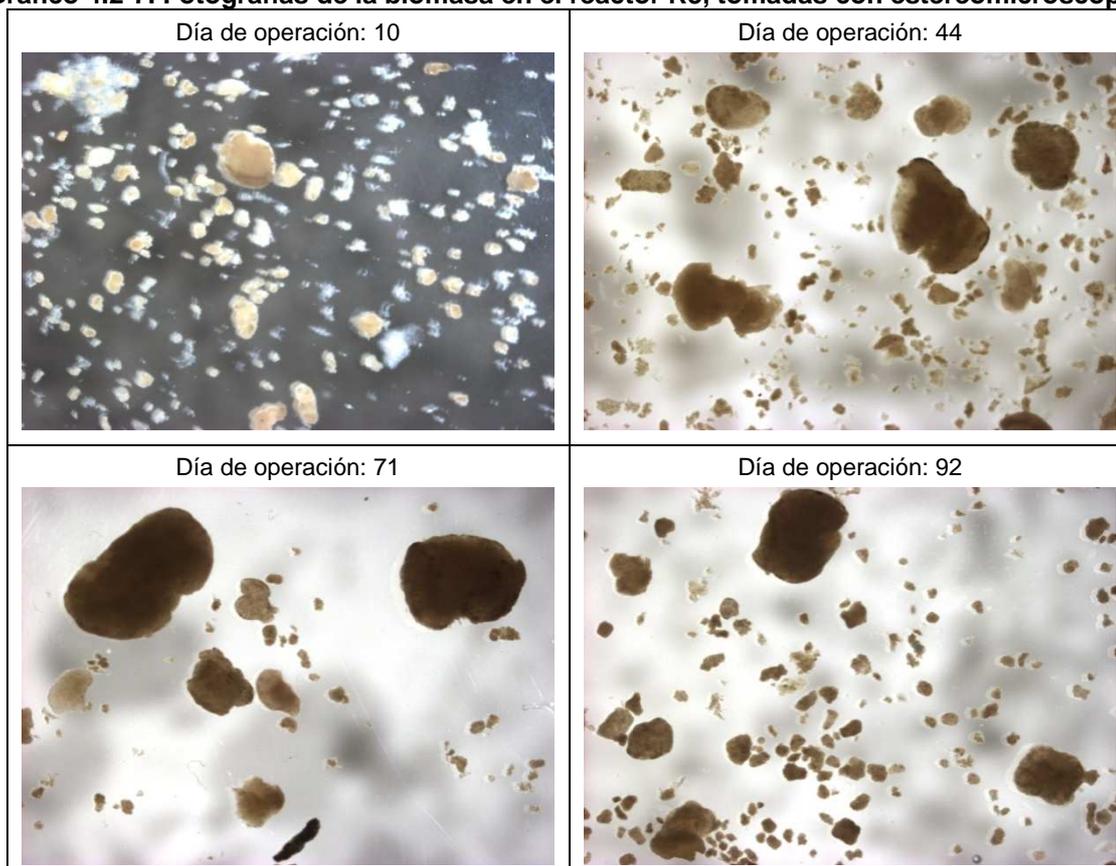
En el gráfico 4.2-6, se observa que la distribución promedio de tamaños de gránulos por frecuencia se ubica entre 0,4 y 1,8 mm, los mayores porcentajes se encuentran entre los 0,4 a 0,6 mm. En cuanto a la distribución volumétrica, se observa que es amplia durante los 80 primeros días, con una variabilidad de tamaños entre los 0,4 mm hasta los 3 mm hasta el día 44, e incluso hasta el día 71 se observan volúmenes importantes para tamaños mayores a 4,2 mm. En general los diámetros de gránulos se encuentran bien distribuidos en cuanto al volumen, pero para los últimos días de operación, se identifica una importante

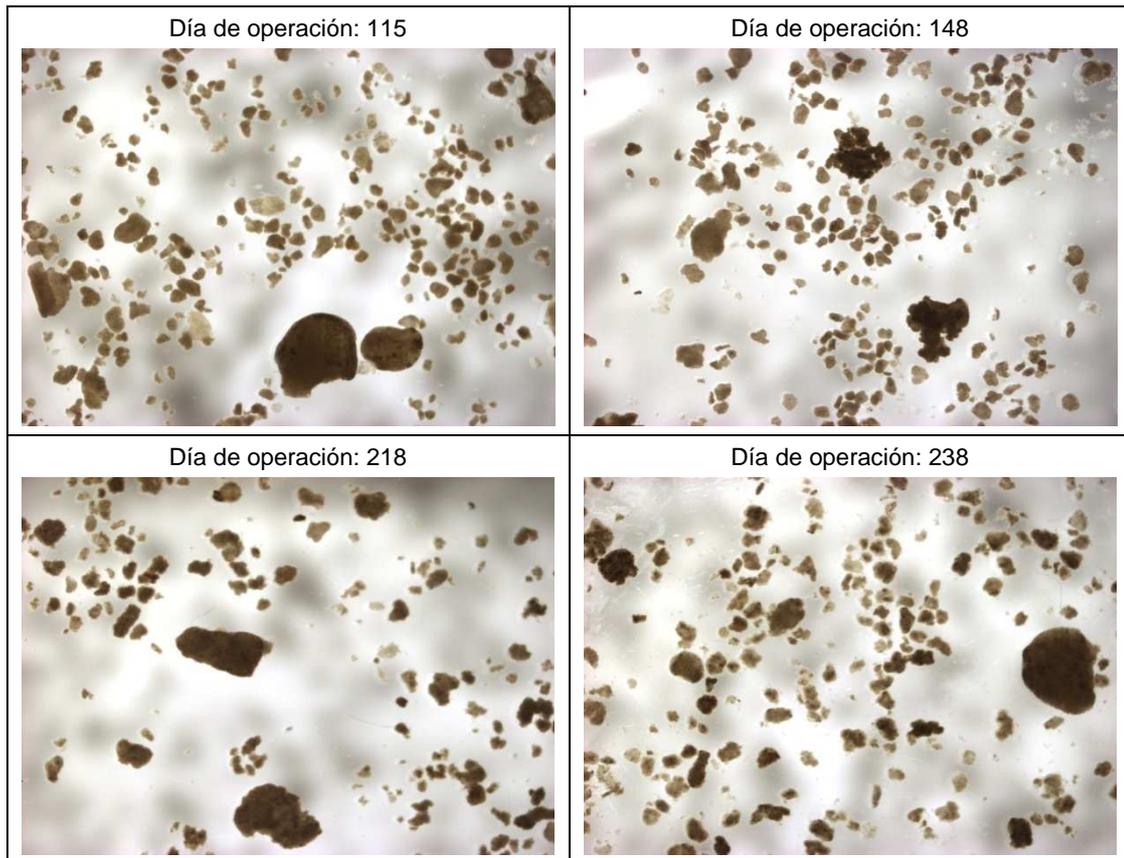
contribución de gránulos de diámetros menores: 0,6 mm, 1,8 mm y 2,4 mm, por lo tanto son éstos los que entran en contacto con la mayoría de sustrato alimentado durante la etapa en que se observa un incremento de la actividad microbiana. Al incrementar el número de gránulos pequeños a partir del desprendimiento de fracciones de biomasa de los gránulos más grandes, aumenta la superficie específica de contacto con el sustrato y permite que la penetración de los nutrientes sea mayor en cada gránulo, explicando así el incremento de la actividad.

4.2.2.5 Aspecto de la biomasa

Las características físicas del lodo granular desarrollado en el reactor nitrato-oxidante se muestran en el gráfico 4.2-7 que contiene fotografías tomadas con el estereoscopio y el programa "RS Image", a una resolución de 0,65X:

Gráfico 4.2-7. Fotografías de la biomasa en el reactor R3, tomadas con estereomicroscopio.





4.3 REACTOR PULSANTE RP

Para esta investigación, el reactor pulsante fue operado durante 154 días; en el día uno ya contenía biomasa en proceso de granulación y fue alimentado al principio con un sustrato sintético sin fuente de carbón orgánico. Posteriormente se sustituyó la alimentación sintética por el efluente industrial que se utilizaba para “R1” y se inoculó biomasa Anammox con el fin de saber si era posible desarrollar el proceso CANON^{vi} (Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite). El volumen diario promedio, tratado por este reactor fue de 2,2 L y la única característica inicial del lodo que se puede mencionar es su concentración: 1,1 g SSV/L. La densidad y el IVL no fueron tomados debido a que las características de la biomasa no fueron las adecuadas para la aplicación de los métodos correspondientes a estos parámetros, la principal interferencia en el caso de la

^{vi} Se denomina así al proceso conjunto de nitrificación-desnitrificación ocasionado por bacterias autótrofas: nitrificantes oxidantes de amonio y desnitrificantes Anammox, bajo condiciones microaerobias.

densidad fue que no se consiguió un sobrenadante sin turbidez para que la lectura en el espectrofotómetro no fuera errónea.

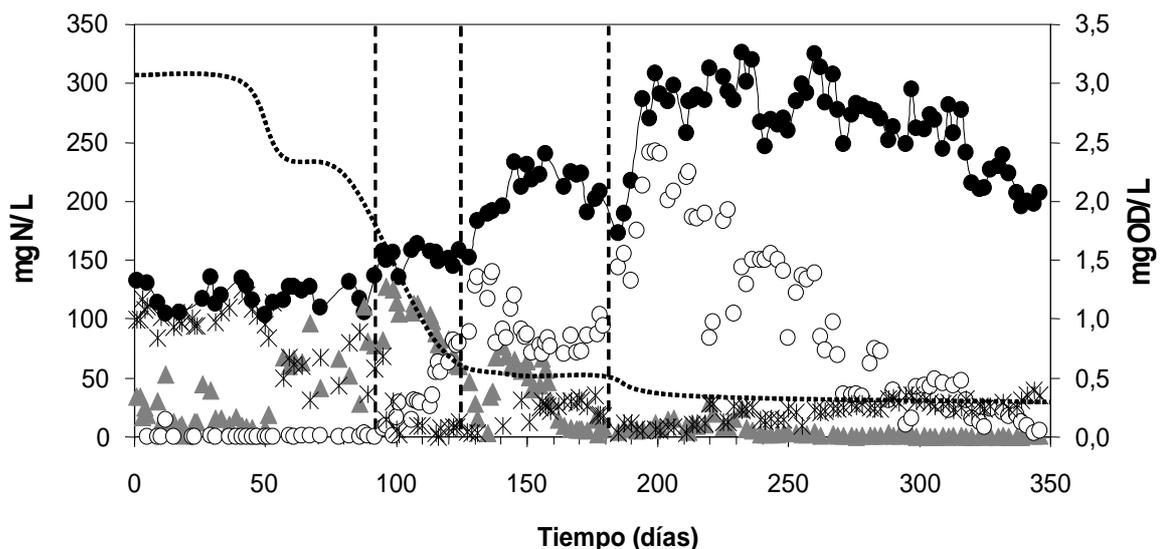
Las variaciones estudiadas en el reactor pulsante fueron:

- ✓ La disminución progresiva de la concentración de OD desde 4,0 a 0,2 mg OD/L.
- ✓ El incremento progresivo de la carga nitrogenada como amonio en la alimentación del reactor.
- ✓ La sustitución de la alimentación sintética por el efluente de un digester anaerobio de lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales, en el día 95 de operación.
- ✓ La inoculación de biomasa Anammox en una concentración del 8% en peso, con referencia al porcentaje total de biomasa en el reactor, en el día 125 de operación.

4.3.1 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS EN LA FASE LÍQUIDA

Para conocer cómo han afectado los cambios aplicados en la operación de Rp, se muestran los resultados de las analíticas aplicadas, en el gráfico 4.3-1:

Gráfico 4.3-1. Variación de las concentraciones de compuestos nitrogenados en el reactor pulsante: N-NH₄⁺ inf (●), N-NH₄⁺ efl (○), N-NO₂⁻ efl (▲), N-NO₃⁻ efl (*) y DO (---).



Fuente: Biogrup (2008).

En el gráfico se resaltan con líneas entrecortadas los cambios puntuales mencionados. La variación puntual resaltada en días posteriores a la culminación de la presente investigación, responde a una inestabilidad ocurrida en el sistema. Los datos siguientes al día 154 de operación, fueron obtenidos por el Grupo de Ingeniería Ambiental y Bioprocesos de la Universidad de Santiago de Compostela (BIOGRUP).

Durante los primeros 50 días, en los que el reactor fue alimentado con sustrato sintético y se operó a valores de oxígeno cercanos a 4 mg OD/L, se observó un porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal casi del 100%, que se reflejó en la aparición de nitrato, equivalente a la concentración de amonio que desapareció.

Con el fin de lograr una nitrificación parcial, a partir del día 55 la concentración de oxígeno fue fijada en 2,4 mg OD/L mediante la disminución del flujo de aire suministrado; en consecuencia, el sistema sufrió una ligera acumulación de amonio y de nitrito y una disminución de nitrato, minimizando la efectividad de la nitrificación por la limitación de OD que sufrieron las bacterias nitrito oxidantes (NOB), las cuales presentan menor afinidad por el oxígeno que las bacterias amonio oxidantes (AOB). Esta tendencia se conservó con las siguientes variaciones operacionales: la disminución progresiva de OD a partir del día 80 hasta alcanzar valores próximos a 0,5 mg OD/L y la sustitución de alimentación sintética por industrial.

Hasta antes de la inoculación de biomasa Anammox, el sistema había alcanzado una nitrificación parcial con una relación molar 1:1 de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$, con 80 mg/L tanto de nitrógeno como amonio, cuanto de nitrógeno como nitrito, medidos en el efluente.

En el día 125 de operación, cuando las condiciones para desarrollar biomasa Anammox eran las óptimas (bajas concentraciones de OD y concentraciones iguales de amonio y nitrito), se inocularon 100 mL de lodo con biomasa Anammox. Un mes después se observó la disminución importante de amonio y nitrito en el sistema conjuntamente con un ligero incremento de los nitratos, mostrando el inicio de la actividad Anammox.

En los últimos días de operación (entorno al día 150 para este análisis) se puede determinar que la eliminación efectiva del nitrógeno amoniacal fue entorno al

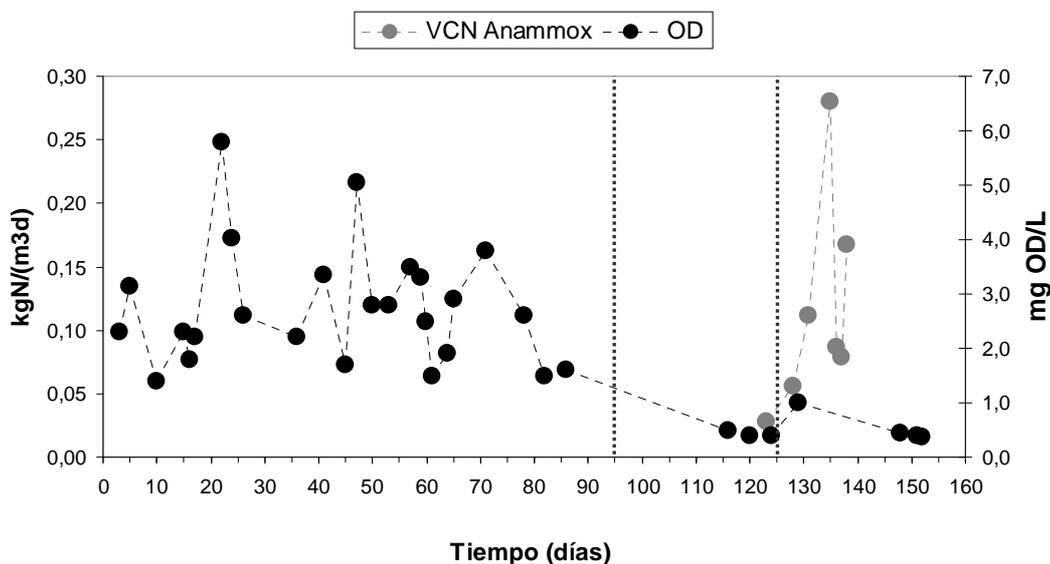
85%, se observan en el efluente muy bajas concentraciones de nitritos y nitratos, evidenciando el desarrollo de la biomasa Anammox y la ocurrencia del Proceso CANON.

La carga límite de nitrógeno como amonio que soportó bien este reactor se determinó en el rango de 200 a 250 mg NH_4^+ /L, observándose una ligera tendencia a la acumulación de amonio con cargas mayores. Cabe reiterar que fue necesario un control automático del pH, para mantener el medio en las condiciones óptimas y evitar problemas de inhibición por sustrato.

A pesar de que la biomasa Anammox crece mejor a temperaturas mayores que la ambiental, en este reactor no se evaluó la dependencia de la actividad nitrificante con respecto a la temperatura.

En cuanto a la actividad nitrificante, en este caso calculada para la biomasa Anammox (VCN Anammox) a partir de la inoculación de la misma en el sistema, se distingue claramente en el gráfico 4.3-2, que las bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el sistema contribuyen a la generación e incremento de la actividad Anammox:

Gráfico 4.3-2. Actividad Anammox y concentración de OD en el reactor pulsante.

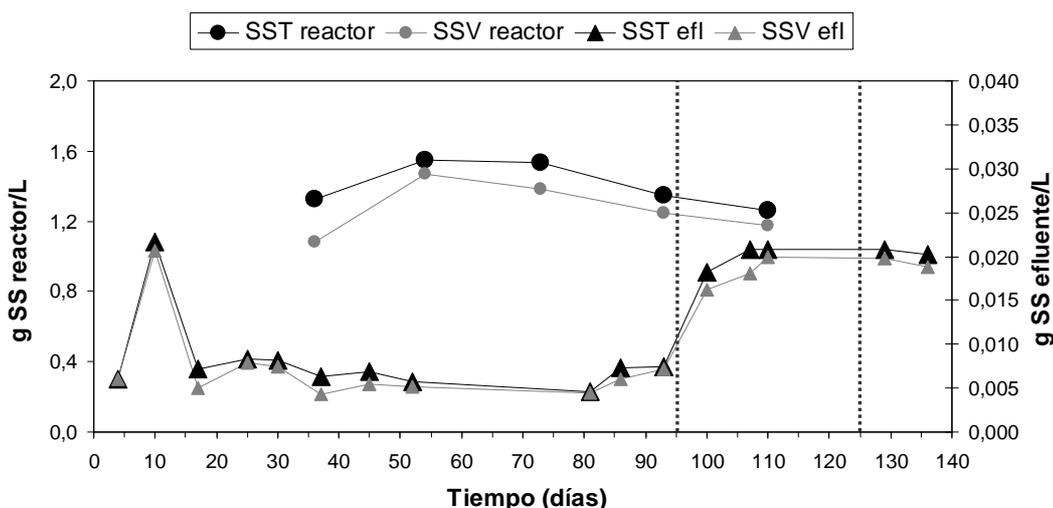


4.3.2 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA Y ASPECTOS DE LA FASE SÓLIDA

4.3.2.1 Concentración de biomasa y tiempo de retención celular

Las concentraciones de bacterias y de sólidos en el reactor pulsante y en el efluente mostraron las variaciones presentadas en el gráfico 4.3-3:

Gráfico 4.3-3. Evolución de la concentración de sólidos en el reactor pulsante.



Durante los primeros 95 días de operación, la concentración de biomasa se mantuvo prácticamente estable, en un valor promedio de 1,5 g SSV/L, mientras que la concentración de sólidos en el efluente se mantuvo en valores entorno a 5 mg SST/L, de los cuales casi la totalidad fueron SSV debido a que en la alimentación sintética el contenido de sólidos es prácticamente nulo. El tiempo de retención celular presentó una variación entre 60 y 80 días. A partir del cambio de alimentación se observa un incremento de los sólidos en el efluente hasta 20 mg SS/L, la concentración de biomasa en el reactor sufrió una ligera disminución a 1,2 g SSV/L, así como el tiempo de retención celular que se determinó en 40 días. En adelante, la concentración de bacterias, la concentración de sólidos, y el tiempo de retención celular no presentaron variaciones importantes y se mantuvieron entorno a los últimos valores mencionados. Sin embargo, los datos posteriores a esta investigación y reportados por el BIOGRUP, mencionan que la concentración de biomasa se incrementó hasta 4,5 g SSV/L y el TRC hasta 150 días. Las cantidades estimadas de biomasa amonio-oxidante, nitrito-oxidante y Anammox se reportaron en 1,27; 0,01 y 2,64 g SSV/L respectivamente, que

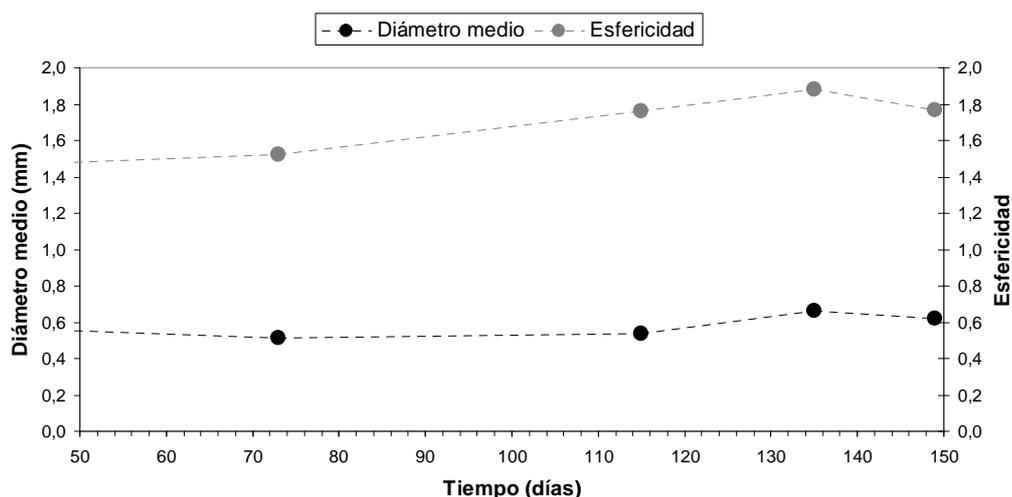
involucran una capacidad de retención del 87% de la biomasa generada. Una alta capacidad de retención celular es el factor clave para la operación de reactores con biomasa de baja velocidad de crecimiento como la biomasa Anammox.

El último enriquecimiento de biomasa en cuanto a su concentración provocó el incremento de los TRC y esto fue favorable para la adaptación y generación de las bacterias Anammox, así como para mantener el sistema en condiciones estables.

4.3.2.2 Esfericidad y diámetro medio de la biomasa

Para el reactor pulsante las tendencias reflejadas en el gráfico 4.3-4, muestran los aspectos concernientes al crecimiento y aspecto de la biomasa granular:

Gráfico 4.3-4. Diámetro medio (mm) y Esfericidad de la biomasa granular en Rp.

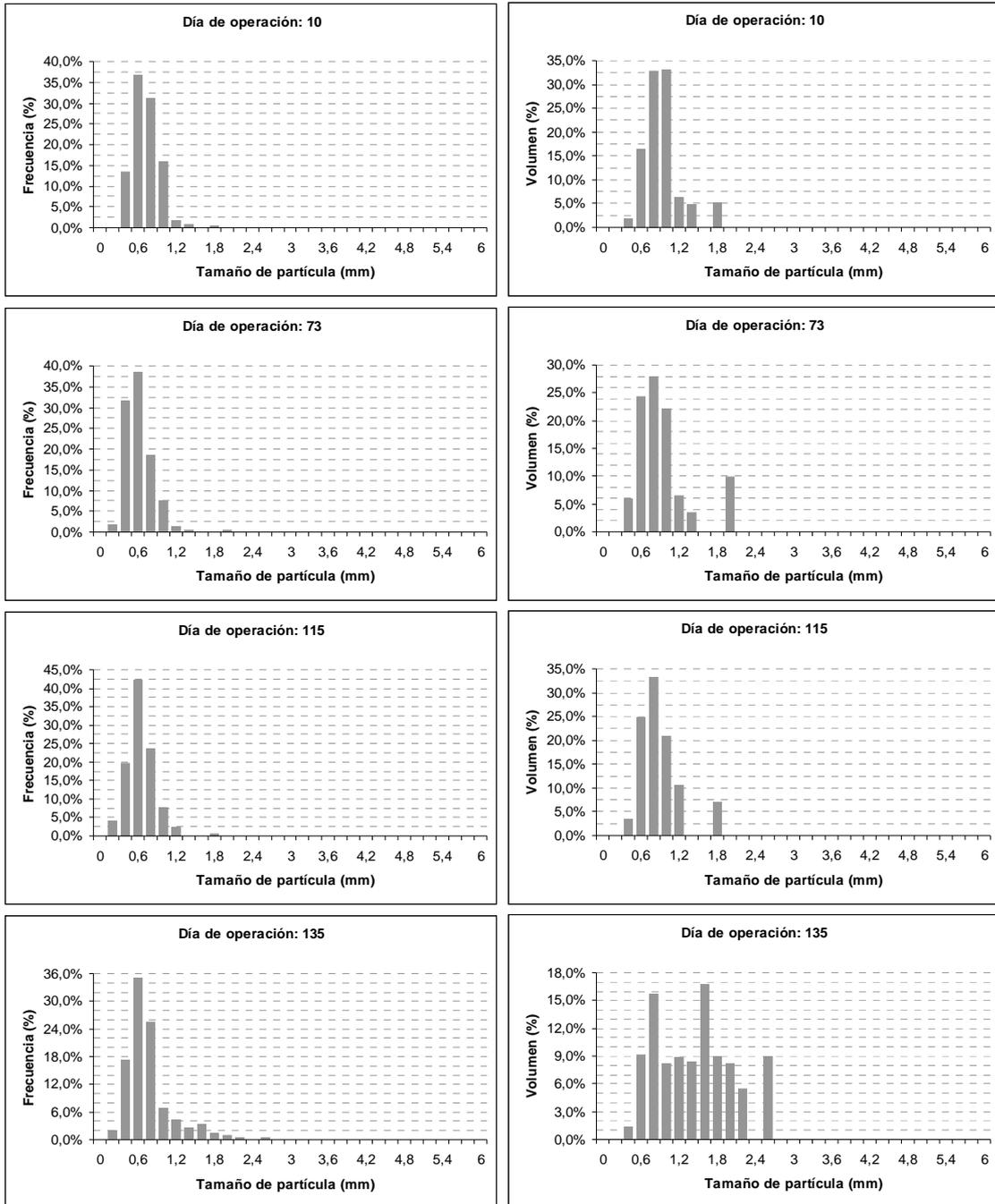


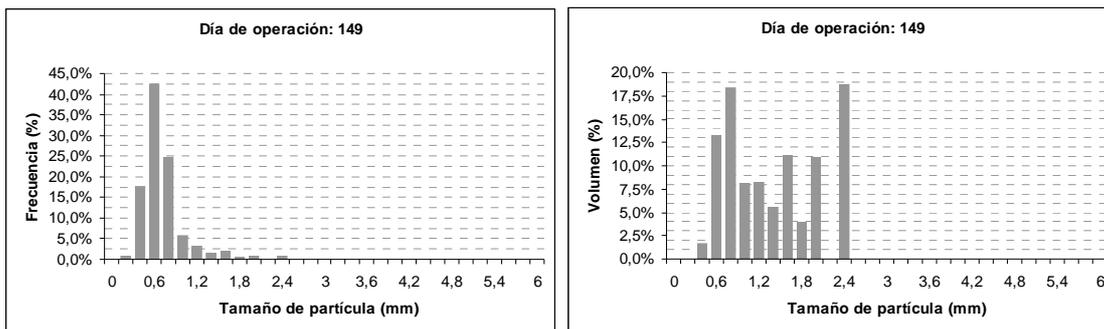
Se observa en el gráfico 4.3-4 en base a las imágenes adquiridas mediante el programa RS Image, que el diámetro de gránulo promedio se mantiene prácticamente constante durante los 150 días de operación, con valores próximos a 0,6 mm, pero la esfericidad que inicia con valores cercanos a 1,4 mm termina incrementándose hasta valores cercanos a 2,0 mm. Esto explica, como se mostrará en las fotografías con estereomicroscopio, que la forma casi redondeada que presentaban los gránulos en el inicio se modificó hasta presentar un aspecto más ovalado al final.

Según los datos reportados por el BIOGROUP, el diámetro medio de los gránulos se incrementó durante los últimos meses de operación hasta 1,6 mm, pudiéndose encontrar gránulos de hasta 3,6 mm de diámetro.

En el gráfico 4.3-5 se exponen las distribuciones de tamaños de diámetro por frecuencia y por volumen para la biomasa del reactor pulsante:

Gráfico 4.3-5. Distribución porcentual de la frecuencia y el volumen de diámetros de gránulo en el reactor pulsante.



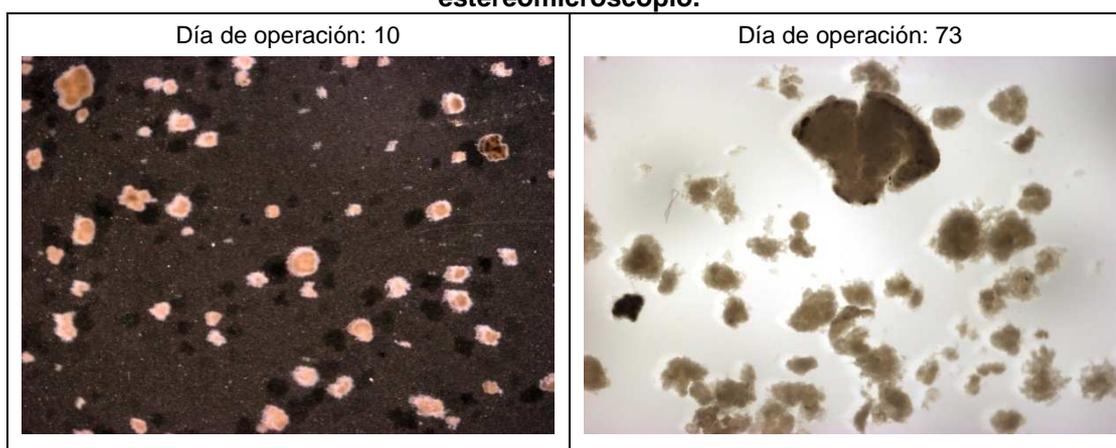


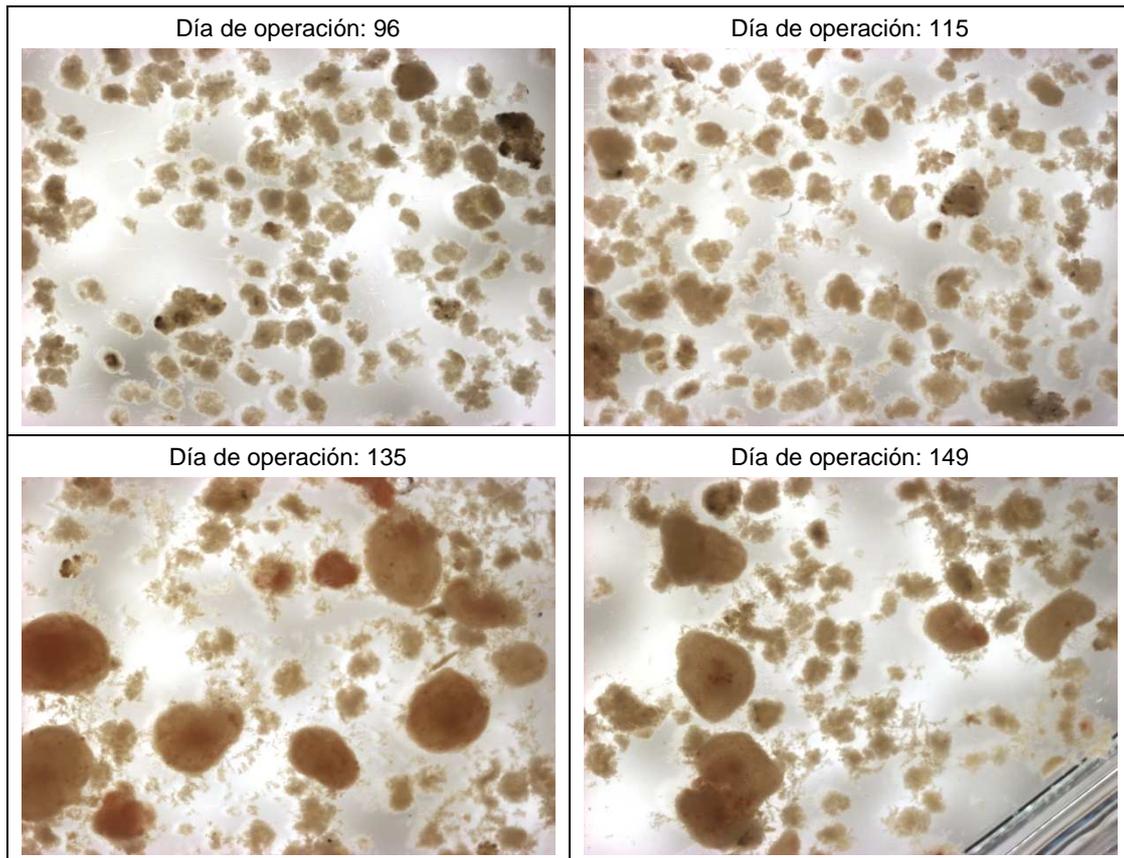
Como lo expresa el gráfico 4.3-5, la tendencia a conservar biomasa granular de diámetros próximos a 0,6 mm prevalece hasta el día 115 de operación; los gránulos se fortalecen y sus tamaños se diversifican, a partir de que se reduce la concentración de OD y se inocula en el sistema biomasa Anammox. Nielsen *et al.* (2005) aplicando la tecnología de microelectrodos concluyó que los responsables de la actividad Anammox son agregados mayores a 500 μm .

4.3.2.3 Aspecto de la biomasa

La biomasa en el reactor pulsante tuvo variaciones en cuanto al color, la forma y la apariencia de la superficie. Para evaluar estos cambios, se empleó la misma metodología que para los reactores R1 y R3, con la diferencia de que para estos gránulos se utilizó una resolución de 1X a partir del día 96 de operación para poder visualizarlos mejor; los resultados pueden observarse en el gráfico 4.3-6:

Gráfico 4.3-6. Fotografías de la biomasa en el reactor pulsante, tomadas con estereomicroscopio.





En las fotografías mostradas en el gráfico 4.3-6, se observa que la biomasa tiene una apariencia esponjosa que responde a las limitaciones de difusión de oxígeno hacia la parte interna del gránulo debido a la disminución de la concentración de oxígeno disuelto en el sistema. A partir del día 135 de operación se observa una superficie más lisa y un aspecto más definido a pesar de que no es tan redondeado; aparecen pigmentos rojizos en los gránulos que evidencian la presencia de biomasa Anammox.

4.3.2.4 Caracterización de las poblaciones bacterianas

Para identificar las poblaciones bacterianas en el reactor y confirmar la existencia de biomasa Anammox, se aplicó la técnica de marcaje de ADN denominada FISH, de la cual se explicó el procedimiento experimental en la sección 3.2.4.

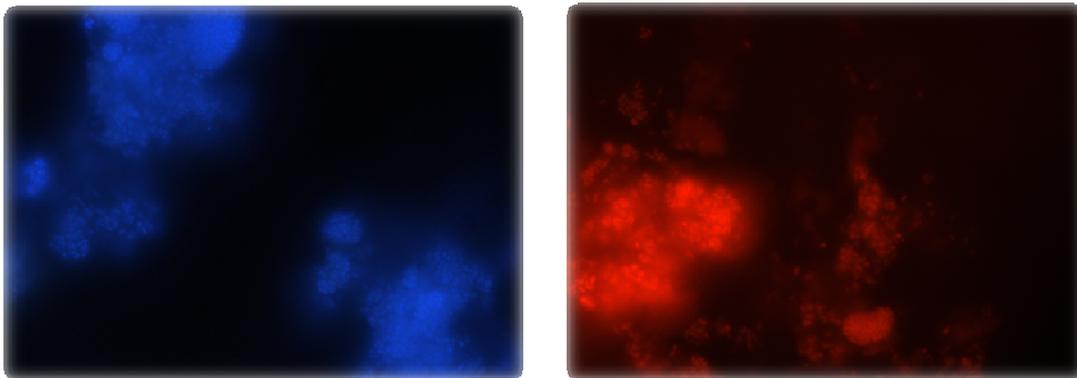
Una muestra bacteriana fue tomada entre los días 135 y 149 de operación y tras aplicar la técnica FISH, se determinó que las poblaciones predominantes pertenecían al género *Nitrosomonas*, en un porcentaje de 85 – 65% del total de la biomasa. EL marcaje para bacterias Anammox resultó positivo para dos tipos de sondas: PLA46 y Amx820, indicando la presencia de *Candidatus Brocadia Anammoxidans* y/o *Candidatus Kuenenia Stuttgartiensis*. Además se obtuvieron

resultados positivos para sondas Alf1b y Gam42a determinando la presencia de algunas Proteobacterias α - y γ -. Por otra parte, no se obtuvieron resultados positivos para las sondas Nit3 y Nitspa712, por lo tanto las bacterias nitrito oxidantes ya no estaban presentes.

Esto indicó que la coexistencia se dio entre bacterias tipo Anammox y bacterias oxidantes de amonio, las mismas que se encargaron de llevar a cabo el proceso CANON en el SBR pulsante.

En el gráfico 4.3-7 se observan los resultados obtenidos, observados a una resolución 100x en el microscopio de epifluorescencia; la sonda Beta NEU 653 emite una fluorescencia en azul, mientras que la sonda AMX 820 emite una fluorescencia roja cuando los resultados son positivos.

Gráfico 4.3-7. Resultados de la técnica FISH para biomasa del reactor pulsante, 100x.



La fluorescencia significa un resultado positivo.

CAPÍTULO V

5 CONCLUSIONES

5.1 CONCLUSIONES GENERALES

Se logró mantener la estabilidad de los procesos en los tres reactores, por lo tanto, para la operación de sistemas con bacterias caracterizadas por su lento crecimiento, parece interesante utilizar sistemas como los reactores SBR en los que además la biomasa forma gránulos.

Se logró desarrollar y adaptar biomasa heterótrofa obtenida de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), a condiciones de biomasa granular autótrofa nitrificante, aún cuando se aplicaron diferentes condiciones y mecanismos de operación.

La estabilidad de operación en los tres reactores y las características de la biomasa se controlaron bien cuando se aplicaron variaciones en las condiciones operativas e incrementos de cargas nitrogenadas.

Se obtuvieron las condiciones requeridas en los reactores R1 y Rp para desarrollar biomasa autótrofa Anammox y en consecuencia ocurrió en los dos reactores el proceso conjunto de nitrificación-desnitrificación con altas eficiencias.

5.2 REACTOR AMONIO OXIDANTE

Se ha logrado mantener y fortalecer la biomasa granular autótrofa ya existente, logrando que conserve sus óptimas propiedades de decantación con un índice volumétrico de 50 mL/g y un diámetro medio máximo de gránulos de 4 mm.

El proceso de nitrificación se llevó a cabo en un porcentaje entre el 50% y el 80% de eficiencia en el transcurso del tiempo de operación, logrando tratar cargas de hasta 400 mgN-NH₄⁺/L.

Se logró seleccionar biomasa autótrofa amonio oxidante con una actividad de nitrificación de 1,1 kgN/m³·d y en una concentración de 7,5 gSSV/L en el reactor. Esto es un indicador del elevado grado de enriquecimiento de la biomasa granular con microorganismos nitrificantes.

5.3 REACTOR NITRITO OXIDANTE:

Se logro enriquecer la biomasa granular autótrofa de condición netamente nitrito oxidante, cuyos valores de densidad e IVL fueron 100 g/L y 20 mL/g respectivamente, que evidencian buenas características de decantación.

La biomasa alcanzó valores de actividad específica entorno a los 0,4 g N-NO₂⁻/gSSV·d, que son mayores que los alcanzados en sistemas con biopelícula. El diámetro medio de los gránulos alcanzó de 0,4 a 0,6 mm.

El proceso de nitratación tuvo una eficiencia entre el 90 y 100%, logrando tratar cargas de nitrógeno como nitritos de hasta 500 mgN-NO₂⁻/L.

Se obtuvo biomasa de condición única nitrito oxidante, en una concentración dentro del reactor, igual a 0,75 gSSV/L.

5.4 REACTOR PULSANTE:

Se obtuvo al final de la investigación, biomasa de tipo amonio oxidante en coexistencia con biomasa de tipo Anammox en estructuras granulares de 2 mm de diámetro en promedio, en una concentración de 4,5 gSSV/L en el reactor y con buenas características de sedimentación.

La actividad Anammox de la biomasa fue calculada en 0,275 kgN/m³·d y la eficiencia de remoción fue entorno al 85% a nitrógeno gas, por lo tanto la ventaja fue que tampoco quedó como residuo nitrato en el efluente.

El reactor logró tratar cargas nitrogenadas de hasta 325 mgN-NH₄⁺/L, sin embargo se determinó que el rango óptimo para una mayor estabilidad fue de 200 a 250 mgN-NH₄⁺/L.

Se logró identificar mediante la técnica FISH, bacterias de tipo Anammox responsables del proceso CANON que se estableció rápidamente en este reactor, tras la inoculación con una cantidad de biomasa Anammox de otro reactor en experimentación.

El sistema logró estabilizarse durante los últimos meses de operación y los microorganismos presentes se adaptaron bien al sustrato industrial y a las condiciones de funcionamiento del reactor, sin embargo, el tiempo para que ocurra esa adaptación fue largo, lo cual constituye una desventaja de este tipo de

sistemas, al igual que lo es la elevada sensibilidad de las bacterias a los cambios operacionales del sistema.

Un sistema de aireación por pulsos favorece más un proceso microaerobio que uno aerobio, pero al mismo tiempo crea las condiciones de estrés necesarias para que se formen gránulos compactos y ricos en diversidad de bacterias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves M, Cavaleiro A.J., Ferreira E.C., Amaral A.L., Mota M, da Motta M, Vivier H, Pons M.N. (2000). Characterization by image analysis of anaerobic sludge under shock conditions. *Water Science and Technology*, 41, pp. 207-214.

Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S. y Srinath E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 48 (5), pp. S35-S52.

APHA-AWWA-WPCF. (1985). *Standard Methods for examination of water and wastewater*. 16th Ed. Washington.

Arrojo B., Mosquera-Corral A., Garrido J.M.* y Méndez R. (2004) Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors. *Water Research*, 38, pp. 3389 – 3399.

Beun J.J., Hendriks A., Van Loosdrecht M.C.M., Morgenroth E., Wilderer P.A. y Heijnen J.J. (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research* 33 (10), pp. 2283-2290.

Beun J.J., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. (2001) N-removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 75 (1), pp. 82-92.

Beun J.J., van Loosdrecht M.C.M. y Heijnen J.J. (2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research*, 36, pp. 702-712.

Bock, E., I. Schmidt, R. Stueven and D. Zart (1995). Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 163, pp. 16-20.

Brond S. y Sund C. (1994). Biological removal of nitrogen in toxic industrial effluents, high in ammonia. *Water Science and Technology*, 29(9), pp. 231-240.

Campos J.L., Méndez R. y Lema J.M (2000). Operation of a nitrifying activated sludge airlift (NASA) reactor without biomass carrier. *Water Science and Technology*, 41, pp. 113-120.

Campos J.L., Mosquera-Corral A., Sánchez M., Méndez R. y Lema J. M. (2002). Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Research*, 36 (10), pp. 2555-2560.

Chudoba P. y Pujol R. (1994). Kinetic selection of microorganisms by means of a selector - Twenty years of progress: history, practice and problems. *Wat. Sci. Tech.*, 29 (7), pp. 177-180.

Daims H., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Schleifer K.H. y Wagner M. (2001). In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp. 5273-5284.

Dangcong P., Bernet N., Delgenes J.-P. y Moletta R. (1999). Aerobic granular sludge case report. *Water Research*, 33(3), pp. 890-893.

Dapena-Mora A., Van Hulle S., Campos J.L., Méndez R., Vanrolleghem P.A. y Jetten M.S.M. (2004b). Enrichment of Anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, pp. 1421-1428.

Dapena-Mora A., Arrojo B., Campos J.L., Mosquera-Corral A. y Méndez R. (2004c). Improvement of the settling properties of Anammox sludge in an SBR. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, pp. 1417-1420.

Dapena-Mora A., Fernández I., Figueroa M., Vázquez-Padín J., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Méndez R. (2007). Proceso Anammox: un cortocircuito en el Ciclo del Nitrógeno para la depuración de aguas residuales. *Retema, Medio Ambiente*, 34.

Dautan R., Pérez M.L., Contreras A., Marzana A., Rincones B. (1988). Diseño y construcción de un Reactor Discontinuo Secuencial para remoción de DBO. XXVI Congreso Interamericano de AIDIS, Lima-Perú.

de Bruin L.M.M., de Kreuk M.K., van der Roest H.F.R., Uijterlinde C. y van Loosdrecht M.C.M. (2004). Aerobic granular sludge technology: and alternative to activated sludge. *Water Science and Technology*, 49(11-12), pp. 1 – 7.

de Bruin L.M.M., van der Roest H.F., de Kreuk M.K. y van Loosdrecht M.C.M. (2005). Promising results pilot research aerobic granular sludge technology at WWTP Ede. En: *Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series*. IWA Publishing. Munich, pp. 135-142.

Doi. (1990). *Microbial polyesters*. New York. VCH Publishers, p. 156.

Etterer T. y Wilderer P.A. (2001). Generation and properties of aerobic granular sludge. *Water Science and Technology* 43 (3), pp. 19-26.

Franco Uría A. (2004). *Biorreactores pulsantes para el tratamiento anaerobio/anóxico de aguas residuales de alta carga*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Gupta S.K. y Sharma R. (1996). Biological oxidation of high strength nitrogenous wastewater. *Water Research*,, 30(3), pp. 593-600.

Gómez-Hernández, J., J. M. Lema-Rodicio and J. R. Méndez-Pampín. (1995). La nitrificación biológica con cultivos axénicos o lodos activados. *Ciencia* 46, pp. 507-523.

Gómez J.,* Cervantes-Carrillo, F. y Pérez J. (2000). Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42, pp. 73-82. Asociación Latinoamericana de Microbiología.

Hooper, A., T. Vannelli, D. Bergmann and D. Arciero (1997). Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, pp. 59-67.

Ivanov V., Tay J.-H., Liu Q.-S., Wang X.-H., Wang Z.-W., Maszenan B.A.M., Yi S., Zhuang W.-Q., Liu Y.-Q., Pan S. y Tay S.T.-L. (2005). Microstructural optimization of wastewater treatment by aerobic granular sludge. En: *Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series*. IWA Publishing. Munich, pp. 43-51.

Jens E. Schmidt y Birgitte K. Ahring* (1996). Granular Sludge Formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, pp. 229-246.

Kroneck, P. M. M., J. Beuerle and R. W. Schumacher (1992). Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds, p. 455-505. In: H. Siegel and A. Siegel (ed.). *Metal ions in biological systems*, v. 28. Marcel Dekker, U.S.A.

Kuai L. y Verstraete W. (1998). Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11), pp. 4500-4506.

Lettinga G, Alphenaar P.A., Visser A. (1993) The effect of liquid upflow velocity and hydraulic retention time on granulation in UASB reactors treating wastewater with a high-sulphate content. *Bioresour Technol*, 43, pp. 249-258.

Morgenroth E., Sherden T, van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. y Wilderer P.A. (1997). Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 31(12), pp. 3191-3194.

Mosquera-Corral A., Montràs A., Heijnen J. J. y van Loosdrecht M. C. M. (2003). Degradation of polymers in a biofilm airlift suspension reactor. *Water Research*, 37 (3), pp. 485-492.

Mosquera-Corral A., Vázquez-Padín J.R., Arrojo B., Campos J.L. y Méndez R. (2005). Nitrifying granular sludge in a sequencing batch reactor. En: *Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series*. IWA Publishing. Munich, pp. 63-70.

Mosquera-Corral A., González F, Campos J.L. y Méndez R. Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochemistry*, (en prensa).

Mulder A., van de Graaf A.A., Robertson L.A. y Kuenen J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16, pp. 177-184.

Nielsen, M., Bollmann, A., Sliemers, O., Jetten, M., Schmid, M., Strous, M., Schmidt, I., Larsen, L.H., Nielsen, L.P. and Revsbech, N.P. (2005). Kinetics, diffusional limitation and microscale distribution of chemistry and organisms in a CANON reactor. *Fems Microbiol. Ecol.* 51(2), pp. 247-256.

O'Flaherty V, Lens P.N., de Beer D, Colleran E. (1997). Effect of feed composition and upflow velocity on aggregate characteristics in anaerobic upflow reactors. *Applied Microbiology Biotechnology*, 47, pp. 102-107.

Prosser, J. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. In: Rose, A. and Tempest, D. (Eds.) *Advances in microbial physiology*, pp. 125-181. Academic Press, London.

Schwarzenbeck N. y Wilderer P.A. (2005). Treatment of food industry effluents in a granular sludge SBR. En: *Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series*. IWA Publishing. Munich, pp. 95-102.

Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G. y Jetten M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, pp. 589-596.

Strous M, Fuerst J.A., Kramer E.H.M., Logemann S, Muyzer G, Van de Pas-Schoonen K.T., Webb R, Kuenen J.G. y Jetten M.S.M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete, *Nature*, 400, pp. 446-449.

Strous M., Kuenen J.G. y Jetten M. (1999). Key physiological parameters of anaerobic ammonium oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, pp. 3248-3250.

Strous M, Van Gerven E, Zheng P, Kuenen J.G., y Jetten M.S.M. (1997). Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, 31, pp.1955–1962.

Strous M. (2000). *Microbiology of anaerobic ammonium oxidation*. Universidad Técnica de Delft. Tesis Doctoral.

Suthersand S. y Ganczarczyk J.J. (1986). Inhibition of nitrite oxidation during nitrification. Some observations. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 21, pp. 423-445.

Tay J.H., Liu Q.S., Liu Y. (2001). Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge reactor. *J Appl Microbiology*, 91, pp. 168-175.

Tay J.-H., Liu Q.-S. y Liu Y. (2001b). The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp. 227-233.

Tay J-H, Liu Q-S and Liu Y. (2002b). Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, pp. 332-337.

Tsuneda S, Ejiri Y, Ogiwara M, Nagano T, Hirata A. (2005). Characteristics and applicability of nitrifying granules produced in an anaerobic upflow fluidized bed reactor. En: *Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series*. IWA Publishing. Munich, pp. 15-24.

Van Benthum, T., (1996). Integrated nitrification and denitrification in biofilm airlift reactors: biofilm development, process design and hydrodynamics. Ph. D. Thesis, Technical University Delft, The Netherlands.

van de Graaf A.A., Mulder A., de Bruijn P., Jetten M.S.M., Robertson L.A. y Kuenen J.G. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, pp. 1246-1251.

van de Graaf A.A., de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M. y Kuenen J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology (UK)*, 142, pp. 2187-2196.

Vázquez Padín, José R. (2005). Obtención de gránulos aerobios/anóxicos en reactores SBR. Universidad de Santiago de Compostela. España. Tesis.

Villaseñor J., van Loosdrecht M.C.M., Picioreanu C. y Heijnen J.J. (2000). Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Water Science and Technology*, 41(4-5), pp. 323-330

Wang F., Liu Y.-H., Yang F.L., Zhang X.W. y Zhang H.M. (2005). Study on the stability of aerobic granules in a SBAR- effect of the superficial upflow air velocity and carbon source. Water and Environmental Management Series. IWA Publishing. Munich, pp. 35-42.

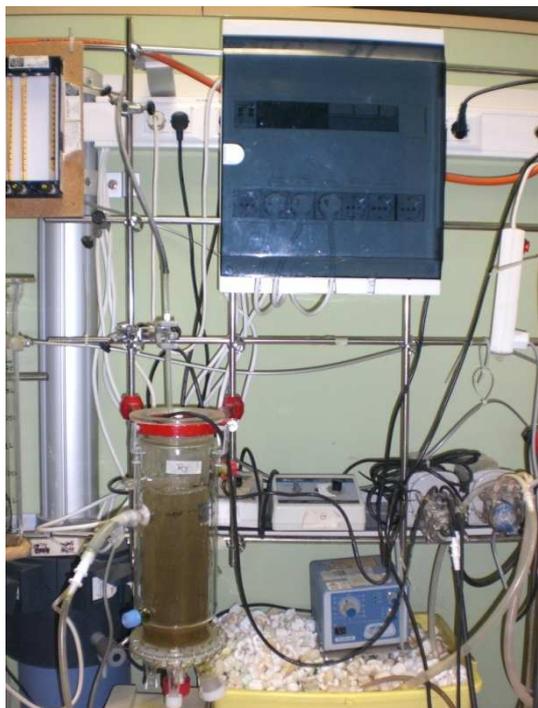
Yu Liu*, Joo-Hwa Tay. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. Water Research, 36, pp. 1653 – 1665.

ANEXOS

Montaje de los reactores de vidrio, panel de Controlador Lógico Programable, bombas y conducciones de alimentación y descarga.

ANEXO 1: FOTOGRAFÍAS DEL MONTAJE EXPERIMENTAL DE R1



ANEXO 2: FOTOGRAFÍAS DEL MONTAJE EXPERIMENTAL DE R3

ANEXO 3: FOTOGRAFÍAS DEL MONTAJE EXPERIMENTAL DE RP





ANEXO 4: FOTOGRAFÍAS DE LOS EQUIPOS Y MATERIALES

	
Circuitos del Controlador Lógico Programable	Electroválvula
	
Medidor de caudal de aire	Bomba peristáltica para llenado y vaciado
	
Espectrofotómetro	Envases de recolección del efluente