



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ingeniería

Trabajo de Tesis Doctoral
“Remoción simultánea de nitrógeno y carbono orgánico en
SBR usando la tecnología de granulación aeróbica”

Paula Lorena Bucci
Director: Dr. Alejandro H. Caravelli
Año 2021

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de la Plata. La misma contiene los resultados obtenidos en las investigaciones llevadas a cabo en el Departamento de Ingeniería Química y Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC) durante el período comprendido entre abril de 2016 y agosto de 2021.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) y el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) por haber solventado la realización del presente trabajo de investigación.

A mi Director de Tesis, el Dr. Alejandro Caravelli y a mi Co-Directora, la Dra. Noemí Zaritzky tanto por su trabajo profesional como por su calidez humana. Gracias por enseñarme, apoyarme y acompañarme durante todos estos años. Al grupo de profesionales que conforman nuestro equipo de trabajo, que me brindaron su ayuda y comprensión día a día. A mis amigos y amigas que me llevo del CIDCA y que perdurarán a lo largo de mi vida; y que sin dudas alivianaron cada día de trabajo intenso.

Al grupo de trabajo del CINDEFI dirigido por la Dra. Irma Morelli y la Dra. Bibiana Coppotelli, quienes me brindaron valiosos conocimientos y una gran formación en el área bioinformática. Sin su ayuda y gran profesionalismo hubiese sido muy difícil poder explorar este sector de la biotecnología.

A la Universidad Nacional de Quilmes y el grupo conformado por la Dra. Alejandra Zinni, que me brindaron un espacio de trabajo en tiempos difíciles de pandemia y me permitieron concluir con el trabajo experimental en tiempo y forma.

Agradezco a mi familia, a mi pareja, amigos y amigas de la vida por el amor y el apoyo incondicional durante todos estos años.

Gracias a todos y todas que me estuvieron acompañando a lo largo de esta formación tanto en los momentos más difíciles como de grandes satisfacciones.

- Parte de los resultados obtenidos han dado origen a las siguientes publicaciones y artículos en congresos:

1. Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification performance in a granular sequencing batch reactor supported by next generation sequencing. P.Bucci, B.Coppoteli, I.Morelli, N.Zaritzky , A.Caravelli. International Biodeterioration & Biodegradation. 2021.

2. Nitrificación heterótrofa en el tratamiento de efluentes lácteos mediante SBR granular aeróbico. Bucci P., Coppotelli B., Starevich V., Morelli I., Zaritzky N., Caravelli A. Congreso interamericano virtual de Ingeniería sanitaria y ambiental. “Innovación y Eficiencia para el Desarrollo Sostenible”. 12 al 15 de abril 2021 - Buenos Aires, Argentina (presentación oral, modalidad virtual)

3. Tratamiento de efluentes lácteos: nitrificación heterótrofa y estudio de la composición microbiana utilizando secuenciación de última generación. Bucci P; Coppotelli B; Starevich V; Morelli I ; Zaritzky N; Caravelli A. IV Jornadas de Investigadores en Formación en Ciencia y Tecnología UNQ realizadas 25, 26 y 27 de marzo de 2021 (presentación oral).

4. Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of wastewater in granular reactor: microbial composition by next generation sequencing analysis. Bucci Paula, Coppotelli Bibiana, Morelli Irma, Zaritzky Noemi, Caravelli Alejandro. Journal of Water Process Engineering. 2020.

5. Monitoreo on-line para detectar procesos de nitrificación en SBR con biomasa granular. Paula Bucci, Alejandro Caravelli, Noemí Zaritzky. IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. Universidad Nacional Arturo Jauretche. Florencio Varela, Argentina. Del 2 al 5 de diciembre de 2019.

6. Efecto de la carga de nitrógeno sobre la nitrificación heterótrofa en SBR granular aeróbico. Paula Bucci, Alejandro Caravelli, Noemí Zaritzky. Congreso de Ciencias ambientales COPIME (Consejo Profesional de Ingeniería Mecánica y Electricista). Ciudad Autónoma de Buenos Aires COPIME. 9, 10 y 11 de octubre de 2019. Trabajo acreedor del tercer premio del Congreso (presentación oral).

7. Remoción simultánea de nitrógeno y carbono orgánico utilizando un SBR granular aeróbico. Bucci Paula, Caravelli Alejandro, Zaritzky Noemi. Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de la Plata. 9,10, 11 de abril de 2019. (modalidad póster)

8. Nitrificación heterótrofa en reactor biológico secuencial granular aeróbico utilizando un efluente sintético lácteo. Bucci. P, Coppotelli. B, Starevich.V, Morelli. I, Caravelli. A, Zaritzky. N. Asociación de Química Argentina. Buenos Aires. Argentina. XXXII Congreso Argentino de Química (CAQ), 11, 12, 13 y 14 de marzo de 2019. (modalidad póster).

9. Optimización de parámetros operativos para la remoción de nitrógeno y carbono de un efluente lácteo utilizando un SBR granular aeróbico. Bucci Paula, Caravelli Alejandro, Zaritzky Noemí. Universidad de Blas Pascal. Córdoba, Argentina. Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua, 14, 15 y 15 de noviembre de 2018. (presentación oral).

10. Determinación de las condiciones operativas óptimas para la remoción simultánea de nitrógeno y carbono orgánico utilizando reactores con biomasa granulada. Bucci, P; Bertola, N; Caravelli, A; Zaritzky, N. Universidad Nacional de Cuyo. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, 11, 12 y 13 de abril de 2018. (Presentación oral).

NOMENCLATURA

AMO	Enzimas amoníaco monooxigenasas
ANR	Actividad nitrificante relativa
AR	Agua residual sintética
BOA	Bacterias Oxidantes de Amonio
CT	Carbohidratos totales (mg CT.L ⁻¹)
DBO	Demanda biológica de oxígeno (mg DBO.L ⁻¹)
DQO	Demanda Química de Oxígeno (mg DQO.L ⁻¹)
DQO_B	Demanda Química de Oxígeno de biomasa (mg DQO.L ⁻¹)
DQO_S	Demanda Química de Oxígeno Soluble (mg DQO _S .L ⁻¹)
DQO_T	Demanda Química de Oxígeno Total (mg DQO _T .L ⁻¹)
FA	Amoníaco libre (mg N.L ⁻¹)
FNA	Ácido nitroso libre (HNO ₂ , mg.L ⁻¹)
HAO	Enzimas hidroxilamina hidrogenasas
ISV	Índice de sedimentabilidad volumétrica (mL.g ST ⁻¹)
MCA₂₀	Condición operativa con micronutrientes, carga orgánica alta y TRC de 20 días
MCANB₂₀	Condición operativa con micronutrientes, carga orgánica alta, carga de nitrógeno baja y TRC de 20 días
MCM₁₀	Condición operativa con micronutrientes, carga orgánica media y TRC de 10 días
MCM₂₀	Condición operativa con micronutrientes, carga orgánica media y TRC de 20 días
NA	Carga de nitrógeno alta
NB	Carga de nitrógeno baja
(NH₃-N)_F	Concentración de nitrógeno amoniacal al final del ciclo de operación (mg.L ⁻¹)
(NH₃-N)_O	Concentración de nitrógeno amoniacal al inicio del ciclo de operación (mg.L ⁻¹)
NDS	Nitrificación-desnitrificación simultánea
%NDS	Porcentaje de nitrificación-desnitrificación simultánea
NGS	Next generation sequencing (secuenciación de última generación)
Ni_F	Concentración de nitrógeno inorgánico al final del ciclo de operación (mg.L ⁻¹)
Ni_O	Concentración de nitrógeno inorgánico al inicio del ciclo de operación (mg.L ⁻¹)
Ni_R	Nitrógeno inorgánico removido (mg.L ⁻¹)
%Ni_R	Porcentaje de Remoción de nitrógeno inorgánico
NO₂⁻-N	Nitrógeno como nitrito (mg N.L ⁻¹)
NO₃⁻-N	Nitrógeno como nitrato (mg N.L ⁻¹)
Norg	Nitrógeno orgánico (mg N.L ⁻¹)
NTK	Nitrógeno total Kjeldahl (mg N.L ⁻¹)
NTK_{AR}	Nitrógeno Total Kjeldahl del agua residual (mg N.L ⁻¹)

NTK_F	Concentración de NTK del efluente final del SBR (mg N.L ⁻¹)
NTK_{LM}	Nitrógeno Total Kjeldahl del licor de mezcla (mg N.L ⁻¹)
NTK_O	Concentración de NTK al comienzo del ciclo de operación (mg N.L ⁻¹)
NTK_P	Nitrógeno Total Kjeldahl particulado (mg N.L ⁻¹)
%NTK_R	Porcentaje de Remoción de Nitrógeno Total Kjeldahl
NTK_S	Nitrógeno Total Kjeldahl soluble (mg N.L ⁻¹)
NTK_{SQ}	Nitrógeno Total Kjeldahl contribuido por el Suero de queso (mg N.L ⁻¹)
OD	Oxígeno disuelto (mg O ₂ .L ⁻¹)
OTU	Unidades taxonómicas operativas
OUR_{END}	OUR correspondiente a la actividad endógena de los microorganismos heterótrofos (mg O ₂ .(L.h) ⁻¹)
OUR_{SQP}	OUR correspondiente a la oxidación del Suero de queso particulado (mg O ₂ .(L.h) ⁻¹)
OUR_{SQS}	OUR correspondiente a oxidación del Suero de queso soluble (mg O ₂ .(L.h) ⁻¹)
PHA	Polihidroxiclcanoatos (mg PHA.L ⁻¹)
r(NO_x-N)	Velocidad de acumulación de las formas oxidadas de nitrógeno (mol NO _x -N.(L.h) ⁻¹).
r(NH₃-N)_{OX}	Velocidad de oxidación de amoníaco (mol NH ₃ -N.(L.h) ⁻¹)
r(NH₃-N)_T	Velocidad de consumo de amoníaco total (mol NH ₃ -N.(L.h) ⁻¹)
r(NH₃-N)_X	Velocidad de consumo de amoníaco para el crecimiento heterotrófico (mol NH ₃ -N.(L.h) ⁻¹)
r(NO₂⁻-N)_{AC}	Velocidad de acumulación de nitrito (mol NO ₂ ⁻ -N.(L.h) ⁻¹)
r(NO₂⁻-N)_{OX}	Velocidad de oxidación de nitrito (mol NO ₂ ⁻ -N.(L.h) ⁻¹).
r(NO₃⁻-N)_{AC}	Velocidad de acumulación de nitrato (mol NO ₃ ⁻ -N.(L.h) ⁻¹)
r(NO₃⁻-N)_D	Velocidad de desnitrificación (mol NO ₃ ⁻ -N.(L.h) ⁻¹)
RBN	Remoción Biológica de Nutrientes
rDQOs	Velocidad volumétrica de remoción de DQOs (mg DQO _S .(L.h) ⁻¹)
rGlu_D	Velocidad de degradación de glucógeno (mmol Glu.(L.h) ⁻¹)
rH_{AC}	Velocidad de consumo de acetato (mmol H _{AC} .(L.h) ⁻¹)
rH_{NH3}	Velocidad de producción de H ⁺ asociado a consumo de NH ₃ (mmol H ⁺ .(L.h) ⁻¹)
rHP	Velocidad de consumo/producción de H ⁺ (mmol H ⁺ .(L.h) ⁻¹)
rHP_D	Velocidad de consumo de H ⁺ asociado a la desnitrificación (mmol H ⁺ .(L.h) ⁻¹)
rHP_N	Velocidad de producción de H ⁺ asociado a la nitrificación (mmol H ⁺ .(L.h) ⁻¹)
rHP_{N+D}	rHP resultante de la combinación de los procesos de nitrificación y desnitrificación (mmol H ⁺ .(L.h) ⁻¹)
rN	Velocidad de remoción de nitrógeno (mg N.(L.h) ⁻¹)
rNH₄⁺-N	Velocidad volumétrica de remoción de NH ₄ ⁺ -N (mg NH ₄ ⁺ -N.(L.h) ⁻¹)

rN_{SQP}	Velocidad de Remoción de nitrógeno asociada al consumo de Suero de queso particulado (mg.(L.h) ⁻¹)
rN_{SQS}	Velocidad de Remoción de nitrógeno asociada al consumo de Suero de queso soluble mg.(L.h) ⁻¹)
rO₂	Velocidad de consumo de oxígeno (mmol O ₂ .(L.h) ⁻¹)
rO_{2H}	rO ₂ correspondiente al crecimiento heterotrófico (mmol O ₂ .(L.h) ⁻¹)
rO_{2N}	Consumo de oxígeno para nitrificación (mmol O ₂ .(L.h) ⁻¹)
rPHA_D	Velocidad de degradación de PHA (mmol PHA.(L.h) ⁻¹).
r_S	Velocidad de degradación del sustrato (mg DQOs.(L.h) ⁻¹)
r_{SQP}	Velocidad de degradación del suero de queso particulado (mg.(L.h) ⁻¹)
r_{SQS}	Velocidad de degradación del suero de queso soluble (mg.(L.h) ⁻¹)
r_X	Velocidad de crecimiento heterotrófico (mg X.(L.h) ⁻¹)
SMCB₂₀	Condición operativa sin micronutrientes, carga orgánica baja y TRC de 20 días
SMCM₂₀	Condición operativa sin micronutrientes, carga orgánica media y TRC de 20 días
SOUR_{BOA}	Velocidad específica de consumo de oxígeno de las bacterias oxidantes de amonio (mg O ₂ .(g ST.h) ⁻¹)
SOUR_{BOAm}	Velocidad específica máxima de consumo de oxígeno correspondiente a la oxidación de amonio (mg O ₂ .(g ST.h) ⁻¹)
SOUR_{BON}	Velocidad específica de consumo de oxígeno de las bacterias oxidantes de nitrito (mg O ₂ .(g ST.h) ⁻¹)
SOUR_{BONm}	Velocidad específica máxima de consumo de oxígeno correspondiente a la oxidación de nitrito (mg O ₂ .(g ST.h) ⁻¹)
SOUR_{HET}	Velocidad específica de consumo de oxígeno de bacterias heterótrofas (mg O ₂ .(g ST.h) ⁻¹)
SOUR_{HETm}	Velocidad específica máxima de consumo de oxígeno de heterótrofos (mg O ₂ .(g ST.h) ⁻¹)
SOUR_{NITm}	Velocidad específica máxima de consumo de oxígeno de la comunidad nitrificante. (mg O ₂ .(g ST.h) ⁻¹)
SOUR_{TOT}	Velocidad específica de consumo de oxígeno total de los microorganismos (mg O ₂ .(g ST.h) ⁻¹)
SQ	Suero de queso (mg.L ⁻¹)
SQP	Suero de queso particulado (mg.L ⁻¹)
SQS	Suero de queso soluble (mg.L ⁻¹)
ST	Sólidos totales (mg ST. L ⁻¹)
TRC	Tiempo de residencia celular (días)
TRH	Tiempo de retención hidráulico (días)

$Y_{Glu/DQOs}$	Rendimiento de la producción de glucógeno en función de la remoción de DQOs (mg DQO. (mg DQOs) ⁻¹)
$Y_{N/S}$	Coeficiente que relaciona la remoción de nitrógeno y carbono (mg N.(mg DQO _S) ⁻¹)
$Y_{N/X}$	Coeficiente estequiométrico que relaciona los contenidos de nitrógeno y carbono de la biomasa (mol N.(C-mol X) ⁻¹)
$Y_{O/N1}$	Coeficiente estequiométrico para la oxidación de amoníaco (mol O ₂ .(mol NH ₃ -N) ⁻¹)
$Y_{O/N2}$	Coeficiente estequiométrico para la oxidación de nitrito (mol O ₂ .(mol NO ₂ ⁻ -N) ⁻¹)
$Y_{O/S}$	Coeficiente de oxidación del sustrato (mg O ₂ .(mg DQO _S) ⁻¹)
$\Delta(NH_3-N)_{FA}$	Nitrógeno amoniacal consumido en el período "famine" (mg N.L ⁻¹)
$\Delta(NH_3-N)_{FE}$	Nitrógeno amoniacal consumido en el período "feast" (mg N.L ⁻¹)
$\Delta(NO_x-N)$	Formas oxidadas de nitrógeno (nitrito y nitrato) acumuladas (mg NO _x .L ⁻¹)
$\Delta(NTK)_{AR}$	NTK consumido del agua residual (mg N.L ⁻¹)
$\Delta(NTK)_{ARFA}$	NTK _{AR} consumido en el período "famine" (mg N.L ⁻¹)
$\Delta(NTK)_{ARFE}$	NTK _{AR} consumido en el período "feast" (mg N.L ⁻¹)
$\Delta(NTK)_{OX}$	NTK oxidado por actividad nitrificante (mg N.L ⁻¹)
$\Delta(NTK)_X$	NTK utilizada para crecimiento heterótrofo (mg N.L ⁻¹)

RESUMEN

En los últimos años incrementó la preocupación debido a la gran cantidad de aguas residuales que contienen elevadas concentraciones de nitrógeno (N) y que son vertidas indiscriminadamente a los cuerpos de agua sin ningún tipo de tratamiento, provocando graves problemas en la salud humana y en el medio ambiente.

La remoción biológica de nutrientes (RBN) es considerada la técnica más económica y sustentable para satisfacer los requerimientos de descarga rigurosos. Si bien existen diferentes esquemas de procesos para la eliminación biológica de nitrógeno, estos presentan ciertas desventajas operativas y económicas: requerimiento de tanques aeróbico y anóxico separados, elevados costos implicados en la recirculación desde la zona aeróbica a la anóxica, la producción de óxidos de nitrógeno como producto final del proceso de desnitrificación en lugar de N_2 debido a condiciones microaerófilas generadas por la recirculación, la limitación de fuente de carbono en el tanque anóxico, costos adicionales que están asociados a la adición de carbono exógeno como metanol o acetato.

No obstante, para resolver estas limitaciones e inconvenientes se ha desarrollado una nueva tecnología basada en el crecimiento de biomasa compacta y densa en forma de gránulos (agregados compactos) formados en un reactor discontinuo secuencial (SBR) con una etapa de disponibilidad de fuente de carbono y energía (FCE) y una de inanición, conocido como proceso "feast/famine", que ofrece opciones de tratamiento de aguas residuales mucho más eficientes.

Este tipo de reactores presenta ciertas ventajas: elevada flexibilidad para el tratamiento de diferentes efluentes, precisión y versatilidad en el funcionamiento, una operación mucho más sencilla, facilidad para la recolección de datos en línea mediante la utilización de sensores, menores costos de capital en aspectos constructivos, la utilización de un único tanque tanto para ambientes aeróbicos y anaeróbicos, requerimiento de menor aporte de energía, una adecuada interacción de oxígeno entre microorganismos y sustratos evitando la necesidad de controlar el oxígeno disuelto (OD), estratificación de los gránulos en capas con diferentes condiciones redox que brinda una gran potencialidad microbiana debido a la coexistencia de diferentes grupos metabólicos permitiendo una mayor eficiencia de eliminación de diferentes contaminantes e incrementando la capacidad y tolerancia frente al impacto de cargas tóxicas. Esto ha generado o ha despertado un gran interés en la utilización de reactores con modo de operación de SBR para el tratamiento de aguas residuales tanto municipales como industriales. En el presente trabajo de tesis se

propuso desarrollar un proceso de tratamiento de efluentes de fácil operación, eficiente y confiable para la remoción conjunta de carbono orgánico y nitrógeno, mediante el uso de un SBR con biomasa granular operado con una única etapa de reacción aeróbica.

Se ha trabajado con tres tipos de efluentes con diferentes niveles de biodegradabilidad y toxicidad lo que nos permitió estudiar en cada uno de ellos diferentes aspectos. En primer lugar un efluente de fácil biodegradación, a base de acetato de sodio y amonio, mediante el cual se ha obtenido una remoción eficiente de nitrógeno y carbono, se ha cuantificado mediante balances de masa la contribución del proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS) en la remoción de nitrógeno inorgánico y se ha estudiado la técnica de titulación como herramienta potencial de monitoreo de los principales procesos que ocurren en el reactor, consumo de carbono orgánico y NDS, brindando prometedores resultados. Asimismo, se ha logrado caracterizar la comunidad microbiana presente en el SBR, mediante secuenciación de última generación (NGS) y estudios bioinformáticos, pudiendo detectar los géneros bacterianos principales y potenciales responsables de los procesos biológicos estudiados.

En segundo lugar, se ha estudiado un efluente más complejo, basado en suero de queso suplementado con amonio, conteniendo carbono orgánico y nitrógeno en forma soluble y particulada. En este estudio se logró evaluar el efecto de los micronutrientes sobre la capacidad de nitrificación del sistema y obtener la relación DQO/N óptima para lograr una eficiente remoción de N y carbono orgánico. Asimismo, también se han determinado mediante técnicas de NGS y estudios bioinformáticos los principales géneros responsables de los procesos de remoción.

Por último, se ha estudiado un efluente tóxico conteniendo básicamente fenol y amonio, en el cual se logró determinar la carga orgánica óptima de fenol que permitió lograr una remoción eficiente de nitrógeno y fenol evitando la inhibición por parte de este tóxico del proceso de nitrificación. En los tres sistemas se ha estudiado la formación de reservas intracelulares de glucógeno a partir de acetato, suero de queso y fenol, y su uso como fuente de carbono para el proceso de desnitrificación.

A partir de esta investigación se ha demostrado que este tipo de bioreactores permite trabajar con sistemas microbianos granulares de elevada diversidad metabólica, lo cual implicó la ocurrencia de diferentes procesos biológicos logrando una remoción eficiente de carbono orgánico y nitrógeno, y que además presentó la capacidad de tolerar y degradar completamente un compuesto de elevada toxicidad como es el fenol.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción	19
1.1 Aguas residuales	19
1.1.1 Características y composición del agua residual: Características físicas y químicas.....	21
1.1.1.1 Características físicas	21
1.1.1.2 Características químicas	23
1.1.1.3 Contaminantes biológicos	25
1.1.1.4 Nutrientes	25
1.2 Nitrógeno	26
1.2.1 Ciclo del nitrógeno	26
1.2.2 Efecto del nitrógeno en los ecosistemas y problemas para la salud humana	28
1.2.3 Legislación Ambiental: Normas Nacionales e Internacionales.....	32
1.3 Contaminantes prioritarios	33
1.3.1 Compuestos fenólicos.....	34
1.3.1.1 Propiedades físicas y químicas de los compuestos fenólicos.....	35
1.3.1.2 Métodos de eliminación de compuestos fenólicos del agua	37
1.4 Tratamiento biológico de aguas residuales con biomasa suspendida	38
1.4.1 Lodos activados	38
1.4.2 Reactor discontinuo secuencial (SBR)	40
1.4.3 Remoción Biológica de Nitrógeno: Procesos convencionales	41
1.5 Sistemas granulares aeróbicos	46
1.5.1 Formación de la biomasa granular aeróbica: mecanismos de granulación.....	49
1.5.2 Configuraciones del proceso y condiciones operativas que afectan la granulación aeróbica .	51
1.5.2.1 Concentración de oxígeno disuelto	52
1.5.2.2 Temperatura	52
1.5.2.3 Fuerzas hidrodinámicas, carga orgánica y régimen de alimentación.....	53
1.5.2.4 Tiempo de sedimentación y relación de intercambio volumétrico	55
1.5.2.5 Presencia de metales.....	55
1.5.2.6 Configuración del SBR granular	56
1.5.2.7 Tiempo de retención hidráulica (TRH) y duración de ciclo.....	57
1.5.2.8 Tiempo de residencia celular (TRC).....	57
1.5.3 Rol de las SPE en la formación y estabilidad de los gránulos aeróbicos	58
1.5.4 Estabilidad, composición y estratificación microbiana de los gránulos	59

1.5.5 Aplicaciones del SBR de lodo granular en el tratamiento de efluentes.....	61
1.5.5.1 Nitrificación y Desnitrificación Simultánea (NDS)	61
1.5.5.2 Nitrificación heterótrofa y desnitrificación aeróbica (NHDA)	63
1.5.5.3 Tratamiento de efluentes lácteos	64
1.5.5.4 Tratamiento de efluentes industriales tóxicos: biodegradación de compuestos fenólicos	65
1.5.5.5 Recuperación de recursos y gestión del exceso de lodos	66
1.5.6 Beneficios del sistema SBR granular en efluentes industriales	67
1.6 Secuenciación masiva	68
1.6.1 Secuenciación masiva de la microbiota	68
1.7 Objetivo general.....	70
1.8 Contenidos.....	71
Capítulo 2: Materiales y métodos generales.....	74
2.1 Generalidades de los efluentes y reactores	74
2.2 Descripción de los efluentes sintéticos y reactores	75
2.2.1 SBR _{ACET}	76
2.2.2 SBR _{SQ} y SBR _{FENOL-AC}	76
2.3 Inoculación de los reactores	77
2.4 Operación de reactores y proceso de granulación	77
2.5 Determinación del tiempo de residencia celular (TRC) y tiempo de retención hidráulico (TRH).....	78
2.6 Métodos analíticos	79
2.6.1 Determinación de la demanda química de oxígeno.....	79
2.6.2 Determinación de la biomasa.....	82
2.6.3 Determinación de nitrógeno amoniacal	83
2.6.4 Determinación de nitrito	84
2.6.5 Determinación de nitrato	85
2.6.6 Determinación del nitrógeno total Kjeldahl (NTK) por microKjeldahl.....	85
2.6.7 Propiedades de sedimentación: índice volumétrico de lodos (ISV)	88
2.6.8 Determinación del tamaño granular	89
2.7 Eficiencias de remoción de nitrógeno y determinación de FA y FNA.....	90
2.7.1 Cuantificación de la eficiencia de eliminación de nitrógeno amoniacal y nitrógeno inorgánico.....	90
2.7.2 Concentraciones de FA y FNA en el SBR	90

2.8 Parámetros cinéticos	91
2.9 Respirimetría	91
2.10 Determinación de carbohidratos totales (CT)	92
2.11 Extracción y cuantificación de polihidroxialcanoato (PHA)	93
2.12 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	95
2.13 Ensayos bioquímicos: Análisis de las comunidades nitrificadoras, desnitrificadoras y fijadores de nitrógeno presentes en los reactores.....	95
2.14 Extracción y amplificación de ADN genómico microbiano	98
2.15 Estudio del consorcio microbiano granular.....	101
2.15.1 Aplicación del software para el filtrado y análisis bioinformático de las lecturas obtenidas en el equipo HiSeq.....	101
2.15.2 Análisis de la diversidad microbiana	102
2.15.3 Predicción funcional en PICRUSt	103
Capítulo 3: Biogranulación, estabilidad y monitoreo del SBR aeróbico en el tratamiento de un efluente fácilmente biodegradable basado en acetato de sodio y nitrógeno amoniacal	108
3.1 Objetivos.....	108
3.2 Factores que influyen en la nitrificación	108
3.2.1 Temperatura	109
3.2.2 pH.....	109
3.2.3 Alcalinidad	109
3.2.4 Oxígeno Disuelto (OD).....	109
3.2.5 Relación DQO:N	110
3.2.6 Amonio libre (FA) y Ácido nitroso libre (FNA)	110
3.3 Factores que influyen en la desnitrificación.....	111
3.3.1 Temperatura	111
3.3.2 pH.....	111
3.3.3 Oxígeno disuelto (OD)	112
3.3.4 Fuentes de carbono adecuadas y relación DQO: N	112
3.3.5 Impacto de FA y FNA en la desnitrificación.....	113
3.4 Factores que influyen en la NDS.....	114

3.5 Monitoreo de sistemas para remoción de carbono y nitrógeno	114
3.6 Determinación de actividad metabólica de BOA y BON mediante respirometría	115
3.7 Materiales y métodos	115
3.7.1 Efluente sintético fácilmente biodegradable y condiciones de operación.....	115
3.7.2 Control de pH.....	117
3.7.3 Proceso de granulación, aclimatación y estabilidad	117
3.7.4 Ensayos de respirometría	118
3.8 Consumo y producción de protones (H ⁺).....	127
3.9 Resultados de la operación del SBR _{ACET} alimentado con un efluente sintético fácilmente biodegradable	128
3.9.1 Estabilidad de los sistemas: tamaño de gránulos, ISV y morfología granular	128
3.9.2 Consumo de carbono orgánico y nitrógeno.....	129
3.9.3 Amonio libre y ácido nitroso libre	134
3.10 Balance de nitrógeno en el SBR _{ACET}	136
3.10.1 Período “feast”: balance de masa para acetato de sodio, nitrógeno y oxígeno.....	136
3.10.2 Período “famine”: balance de masa para el carbono orgánico endógeno, nitrógeno y oxígeno.....	140
3.11 Ensayos de respirometría y modelado	143
3.11.1 Evaluación de los parámetros estadísticos de los ensayos respirométricos.....	149
3.11.2 Comparación entre los parámetros cinéticos de la condición NB y la condición NA	150
3.12 Velocidad de producción/consumo de protones para el monitoreo de SBR	152
3.13 Conclusiones del capítulo	160
Capítulo 4: Determinación de las vías metabólicas de remoción de nitrógeno y análisis de la composición microbiana mediante herramientas biotecnológicas	163
4.1 Objetivos.....	163
4.2 Métodos de evaluación de la biodiversidad: Metabarcoding	163
4.3 Determinación de rutas metabólicas: predicción por PICRUSt	164
4.4 Test bioquímicos.....	165
4.5 Análisis de la composición bacteriana de los gránulos.....	165
4.6 Evaluación de la contribución de las poblaciones bacterianas a los principales procesos biológicos.....	168

4.7 Procesos tentativos de eliminación biológica de nitrógeno.....	174
4.8 Conclusiones del capítulo	178
4.9 Tablas suplementarias SBR _{ACET} : Condición NB	180
Capítulo 5. Tratamiento de efluentes lácteos en sbr granular aeróbico	187
5.1. Objetivos del capítulo.....	187
5.2 Caracterización general de efluentes lácteos.....	188
5.3 Tratamiento aeróbico de efluentes lácteos.....	190
5.4. Materiales y métodos.....	191
5.4.1 Efluente sintético basado en suero de queso (SQ) suplementado con amonio.....	191
5.4.2 Composición del efluente y condiciones de operación del SBR	193
5.4.3 Cultivos microbianos: proceso de aclimatación y granulación	195
5.4.4 Cuantificación de la eficiencia de la eliminación del nitrógeno amoniacal, nitrógeno inorgánico y nitrógeno total Kjeldahl.....	196
5.4.5 Parámetros cinéticos.....	197
5.4.6 Ensayos de respirometría: determinación de la velocidad de oxidación del suero de queso particulado y suero de queso soluble	197
5.5 Resultados de la operación del sbr _{sq} alimentado con un efluente sintético basado en suero de queso suplementado con amonio	199
5.5.1 Efecto de la presencia de micronutrientes sobre la nitrificación. Análisis de parámetros físico-químicos.....	200
5.5.1.1 Estabilidad de los sistemas: tamaño de gránulos e índice volumétrico de sedimentabilidad (ISV)	201
5.5.1.2 Consumo de carbono orgánico soluble y amoníaco.....	204
5.5.1.3 Consumo de carbono orgánico particulado y nitrógeno orgánico y nitrógeno total Kjeldahl (NTK). Ensayos respirométricos	209
5.5.1.3.1 Cambios de las diferentes formas de NTK.....	209
5.5.1.3.2 Consumo de carbono orgánico particulado y nitrógeno orgánico mediante análisis respirométricos	212
5.5.1.4 Remoción de nitrógeno mediante crecimiento heterotrófico y procesos de nitrificación y nitrificación-desnitrificación simultánea: balances de masa.....	214
5.5.2 Análisis de la composición bacteriana de los gránulos mediante tecnología de secuenciación de alto rendimiento	218
5.5.2.1 Análisis de diversidad microbiana	225

5.5.3 Evaluación de la contribución de las poblaciones bacterianas a los principales procesos biológicos.....	227
5.5.4 Caracterización de los procesos biológicos.....	230
5.5.5 Alternativas para mejorar la remoción de nitrógeno inorgánico o el proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS)	236
5.5.5.1 Estabilidad de las condiciones: MCM_{10} , MCA_{20} y $MCANB_{20}$	237
5.5.6 Análisis del efecto de la relación DQO/NTK sobre la eficiencia de remoción de amonio, NTK y nitrógeno inorgánico.....	242
5.6 Conclusiones del capítulo	243
5.7 Tablas suplementarias SBR_{SQ}	246
Capítulo 6: Tratamiento de efluentes fenólicos en el SBR granular aeróbico	262
6.1 Remoción simultánea de nitrógeno y fenol.....	262
6.2 Objetivos del capítulo.....	264
6.3.1 Efluente fenólico sintético y condiciones de operación del SBR.....	265
6.3.2 Ensayo de toxicidad de fenol mediante respirometría.....	268
6.3.3 Aclimatación de los microorganismos al fenol y efecto del incremento de la carga de fenol..	269
6.4 Determinación de fenol.....	270
6.5 Resultados.....	271
6.5.1 Efectos tóxicos del Fenol sobre la biomasa granulada en reactores batch.....	271
6.5.2 Aclimatación y eficiencia de remoción de nitrógeno, fenol y acetato de sodio en el SBR.....	275
6.6 Conclusiones del capítulo	281
Capítulo 7: Conclusiones generales	285
Bibliografía.....	293

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 AGUAS RESIDUALES

La contaminación del agua se relaciona con la presencia de componentes o factores químicos, físicos o biológicos que producen una condición de deterioro de un cuerpo de agua dado con respecto a algún uso beneficioso. El nivel de contaminación necesario para deteriorar un cuerpo de agua depende en gran medida del tipo de cuerpo de agua, su ubicación y los tipos de usos beneficiosos que soporta. Un agua considerada no apta para el consumo humano puede ser adecuada para otros usos, como hábitat, riego o recreación. Aunque ciertos eventos naturales pueden causar contaminación del agua, las fuentes antropogénicas de contaminación, es decir, la contaminación que surge de las actividades humanas, es una de las formas que más estudio está requiriendo en los últimos años (Schweitzer y Noblet, 2018).

El objetivo de la Química Verde es mantener un ambiente saludable para sostener la población humana y las economías saludables que se basan en la extracción y utilización de los recursos naturales. La sostenibilidad del agua es tanto un problema de cantidad de agua como un problema de calidad del agua y depende del sostén de la infraestructura (tuberías y plantas de tratamiento), productos químicos utilizados en el tratamiento del agua y recursos energéticos y tecnologías asociadas (Schweitzer y Noblet, 2018).

El agua contaminada causada por la actividad humana proveniente de diferentes industrias, denominada aguas residuales, puede ser tratada a cualquier nivel de calidad deseado; cuya calidad está dictada por su uso previsto. Sin embargo, a medida que aumenta su pureza, también lo hace el costo para alcanzar esa pureza (Englande y col, 2015).

Las aguas residuales industriales presentan una gran cantidad de contaminantes que tienen una acción muy compleja sobre el medio ambiente, afectando el desarrollo natural de los ecosistemas por el cambio de condiciones. El agua al estar contaminada presenta alteraciones físicas (temperatura, color, densidad, suspensiones, radiactividad, etc.), químicas (composición, sustancias disueltas, etc.), o biológicas de tal forma que no puede cumplir su función ecológica (Forero y col, 2005).

Entre las principales causas de la contaminación de las aguas se encuentran (Senecah, 2004):

Capítulo 1

- **Los vertidos de aguas residuales urbanas:** La composición de estos vertidos es variada, en parte debido a la diversidad de fuentes contaminantes en espacios tan reducidos, pero en general contienen gran cantidad de microorganismos, materia orgánica, abundantes nutrientes, fosfatos y nitratos, detergentes y materias en suspensión. Estas aguas residuales pueden a su vez dividirse, dadas sus fuentes y composición en: aguas domiciliarias (productos de limpieza, jabones, materias grasas, restos de la cocina, arenas, etc.), aguas negras (aguas cloacales que incluye heces y orina presentando en su composición microorganismos patógenos procedentes de desechos orgánicos), aguas de la limpieza de las vías públicas y lluvia urbana. Los grandes edificios facilitan la ascensión de aire que puede originar condensaciones y precipitaciones, muchas veces con contaminantes atmosféricos (Senecah, 2004).

- **Vertidos de explotaciones ganaderas:** Aportan estiércol y orina con contaminantes como microorganismos patógenos, sólidos en suspensión, materia orgánica, nitrógeno y fósforo. Contribuyen principalmente al aumento de DBO (demanda biológica de oxígeno) en los cuerpos de agua a los que se descargan.

- **Vertidos de aguas residuales agrícolas:** Incluyen fertilizantes inorgánicos, estiércol y orina, otros abonos, plaguicidas diversos, herbicidas, sales del agua de riego, etc. Debido a la persistencia y afinidad que tienen una gran cantidad de contaminantes por los suelos, ésta es una de las fuentes de compuestos peligrosos más importantes.

- **Vertidos industriales:** Son la mayor fuente de contaminantes de todo tipo; las industrias utilizan agua para varios fines tales como: procesado, refrigeración, transporte, disolvente, etc., contaminándola de infinidad de formas y causando algunos de los tipos de contaminación más peligrosa (Senecah, 2004).

Las aguas residuales industriales pueden contener una variedad de contaminantes aromáticos como benzoato, ftalato, fenol y sus derivados, y varios compuestos halogenados. Estos compuestos (los halogenados) pueden haberse formado de manera desconocida en el medio ambiente en grandes cantidades debido a su uso generalizado como los son: los herbicidas, insecticidas, fungicidas, solventes, plastificantes, agentes de limpieza, propulsores, aditivos de gasolina y desengrasantes (Bhatt y col, 2007). Algunos de estos compuestos pueden ser degradados por microorganismos aclimatados en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, otros pueden permanecer sin alteración y, por lo tanto, requieren la aplicación de sistemas que favorezcan el desarrollo de nuevos consorcios de organismos para ser efectivos.

Capítulo 1

Asimismo, existe una gran variedad de organismos, sustancias y formas de energía (como por ejemplo la energía nuclear) que pueden alterar la composición y calidad del agua, aumentando niveles de toxicidad o concentración de sustancias indeseables y que pueden llegar a interferir en la dinámica agua-biota. Cuando se sobrepasa la capacidad de autodepuración de los cuerpos de agua, ésta deja de cumplir sus funciones biológicas, pasando de ser el compuesto esencial para la vida a un compuesto tóxico cuyas características son muy nocivas al medio ambiente (Krishnani y Ayyappan, 2006).

1.1.1 Características y composición del agua residual: Características físicas y químicas

1.1.1.1 Características físicas

Las características físicas más importantes del agua residual son:

- **Contenido de sólidos disueltos totales (SDT) y sólidos suspendidos totales (SST):** Comprenden todo el material orgánico como inorgánico que no se evapora a una temperatura entre 103° y 105°C. Estos sólidos se pueden clasificar a su vez en filtrables (disueltos) y no filtrables (sólidos en suspensión) (Metcalf, 1995).

El componente sólido del efluente se compone de dos fracciones: sólidos suspendidos (denominados sólidos suspendidos totales, SST) y sólidos disueltos (denominados sólidos disueltos totales, SDT). Estas fracciones son básicas para establecer la necesidad del diseño del tratamiento que se va a llevar a cabo.

Los valores de SST permitidos para aguas residuales tratadas deben ser generalmente menores de 30 mg L⁻¹ (NSF International, 2017), como resultado de los requisitos reglamentarios para cumplir con los estándares y la certificación de la industria (Amador y Loomis, 2018). Sin embargo, otras instituciones han informado rangos de valores de SST para sistemas sépticos convencionales de 50 a 100 mg L⁻¹ (EPA, 2002)

La fracción SST incluye partículas inorgánicas (tierra, arena) y partículas orgánicas (micropartículas de plástico, fibras sintéticas y naturales, y partículas de heces y alimentos sin descomponer). Las partículas que pueden permanecer suspendidas en las aguas residuales pueden estar inicialmente presentes en el agua de origen, tal vez generadas por la descomposición física de partículas más grandes, o pueden formarse a partir de la coagulación de materiales disueltos o de partículas muy pequeñas. La fracción SDT está compuesta de iones inorgánicos y orgánicos, que contribuyen a la conductividad eléctrica, así como a compuestos orgánicos neutros, no volátiles. Los valores de SST y SDT en el

Capítulo 1

efluente varían según la cantidad y los tipos de partículas presentes en las aguas residuales sin tratar, el nivel de perturbación del lodo y espuma en el tanque o reactor y el establecimiento de condiciones que eviten la coagulación de partículas (Amador y Loomis, 2018).

- **Olores:** Son el producto de la liberación de los gases tanto presentes originalmente como productos del proceso de descomposición de la materia orgánica. El agua residual séptica produce este olor debido a la degradación de sulfatos a sulfitos y sulfuros por la acción de microorganismos anaeróbicos. La caracterización y medida de olores se realiza en función a la intensidad (fuerza en la percepción del olor), el carácter (asociación mental al percibir el olor por un sujeto), la sensación de desagrado y la detectabilidad (número de diluciones en aire requerido para reducir un olor a su umbral mínimo detectable) (Metcalf, 1995).

- **Temperatura:** Parámetro que incide en el desarrollo de la vida acuática, las reacciones químicas y velocidades de reacción. Desaparecen especies poco tolerantes a las altas temperaturas, o todas, dependiendo de la magnitud de la misma. Además la solubilidad del oxígeno disminuye con el incremento de la temperatura del agua (Metcalf, 1995), porque éste al igual que otros gases tiende a vaporizarse, lo que pone en riesgo la supervivencia de especies superiores. La temperatura del efluente es una función de: (i) la temperatura y volumen de los afluentes que ingresan al reactor, (ii) el tipo y la profundidad de instalación del tanque, (iii) el nivel de la actividad microbiana en el reactor, (iv) el volumen de agua en el reactor y (v) la temperatura exterior (Amador y Loomis, 2018). El gran volumen de agua en el reactor y la capacidad calorífica del agua ayudan a amortiguar los cambios de temperatura.

- **Conductividad eléctrica:** La conductividad eléctrica (CE) hace referencia a la suma de cationes y aniones presentes en el agua. La presencia de iones en el agua lo convierte en un buen conductor eléctrico, siendo que el agua pura presenta solo iones hidronio (H_3O^+) e hidróxido (OH^-) y por ende presenta una muy baja capacidad para conducir electricidad. La mayor parte de los iones que contribuyen a la CE son inorgánicos, con una pequeña contribución de iones orgánicos. Los compuestos neutros (que no están cargados) no contribuyen a la CE. Generalmente los iones responsables de la CE de las aguas residuales forman parte de los SDT descritos anteriormente. Bajos valores de CE pueden indicar la mezcla de aguas residuales con fuentes de agua limpia como resultado de la infiltración de lluvia y aguas pluviales. Grandes cambios en la CE del efluente se

Capítulo 1

traducen en cambios en la presión osmótica ejercida por el efluente, lo que puede afectar la actividad y la supervivencia de los microorganismos responsables de la transformación y eliminación de contaminantes (Amador y Loomis, 2018).

- **Color:** En general el color gris, gris oscuro o negro del agua residual es debido a la formación de sulfuros metálicos por reacción del sulfuro liberado en condiciones anaerobias con metales presentes en el agua residual descargada (Metcalf, 1995).

- **Oxígeno disuelto (OD):** OD indica una medida de la cantidad de O_2 disuelto en el agua. Las unidades de OD corresponden a la masa de O_2 por volumen de agua, generalmente expresada como $mg\ O_2\ L^{-1}$ o ppm. El nivel de OD también se puede expresar como el % (porcentaje) de saturación. Para obtener una medición precisa de OD en el efluente debe determinarse in situ. La concentración de OD en el efluente varía según el tipo de tratamiento (Amador y Loomis, 2018). Cabe destacar que sistemas que airean activamente las aguas residuales, permiten un aumento en el nivel de OD promoviendo la descomposición microbiana y procesos como la nitrificación. Los microorganismos aeróbicos en el tanque agotan el O_2 a medida que descomponen los compuestos orgánicos en las aguas residuales (Amador y Loomis, 2018). El oxígeno es una de las variables que debe considerarse ya que controla muchos de los procesos en los tratamientos de efluentes.

1.1.1.2 Características químicas

- **pH:** El pH del efluente es una función de: (i) el pH del agua que ingresa al reactor (aguas grises y negras), (ii) los procesos que producen H^+ , como la oxidación microbiana de los compuestos C, N y S y (iii) procesos que consumen o neutralizan H^+ , como la reacción con compuestos alcalinos. El efluente de los sistemas de tratamiento aeróbicos presenta un pH ácido porque la aireación de las aguas residuales, utilizadas para mejorar la descomposición microbiana del C orgánico y/o la oxidación de amoníaco, conduce a la producción de H^+ por parte de la acción de los microorganismos, reduciendo de esta forma el pH del efluente. La medida en que se reduce el pH depende de la cantidad de H^+ producida por estos procesos y de la capacidad neutralizadora de la fuente de agua, también conocida como alcalinidad. El pH del efluente puede variar con el tiempo, si no se le aplica un tratamiento (Amador y Loomis, 2018).

Capítulo 1

- **Alcalinidad**: La alcalinidad se refiere a la capacidad de una solución acuosa para amortiguar o neutralizar la acidez. La capacidad de amortiguación de las aguas residuales domésticas resulta principalmente de la capacidad de los iones de carbonato (HCO_3^- y CO_3^{2-}) para reaccionar con H^+ , aunque OH^- , aniones orgánicos y HS^- también pueden contribuir a la alcalinidad. La alcalinidad se expresa en $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (ppm). El agua subterránea o superficial en contacto con minerales que contienen carbonato de calcio o magnesio da como resultado la disolución de estos minerales y un aumento en la concentración de carbonato e iones hidroxilo; el efluente de los sistemas de tratamiento aeróbicos presenta una alcalinidad más baja debido a que los microorganismos oxidan el amoníaco para producir nitrato generando acidez (Amador y Loomis, 2018).

- **Demanda de oxígeno**: La demanda de oxígeno de las aguas residuales se refiere a la cantidad de oxígeno consumido a medida que los compuestos presentes en el agua se oxidan química o bioquímicamente. Las mediciones de la demanda de oxígeno son una indicación de la calidad del agua y el impacto potencial de las aguas residuales en las aguas receptoras. La descarga de aguas residuales con alta demanda de oxígeno son problemáticas ya que conducen al agotamiento del oxígeno en el agua subterránea y superficial, lo que resulta en hipoxia o anoxia. Los bajos niveles de O_2 afectan a los organismos aeróbicos desde las bacterias hasta los peces y también pueden conducir a la liberación de metales tóxicos y P desde suelos y sedimentos. Hay dos formas de expresar la demanda de oxígeno: demanda química de oxígeno (DQO) y demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (Amador y Loomis, 2018).

- ✓ **Demanda química de oxígeno (DQO)**: La DQO del agua residual es una medida del O_2 requerido para oxidar químicamente aquellos compuestos que resisten la oxidación bioquímica, así como aquellos que pueden oxidarse bioquímicamente. El agente oxidante más común es el dicromato de potasio en un medio ácido y a altas temperaturas (Metcalf, 1995).

- ✓ **Demanda biológica de oxígeno (DBO)**: La DBO de las aguas residuales es una medida del O_2 requerida para oxidar bioquímicamente compuestos orgánicos oxidables y amoníaco por medio de los microorganismos. Debido a que los procesos bioquímicos requieren más tiempo que las reacciones químicas involucradas en la determinación de DQO, se ha propuesto un tiempo de 5 días para medir la DBO (DBO_5) La DBO_5 se refiere a la cantidad de O_2 consumida por una muestra de aguas residuales en el transcurso de una incubación de 5 días, mientras que la DBO final representa la cantidad

Capítulo 1

de O_2 consumida después de que las reacciones bioquímicas se hayan completado. Asimismo, la DBO carbonácea (DBOc) se refiere a la cantidad de O_2 consumida en una muestra de aguas residuales cuando se suprime la oxidación microbiana de NH_4^+ .

En todos los casos, la demanda de oxígeno se expresa en masa de O_2 consumida por volumen de solución ($mg\ O_2.L^{-1}$, ppm) e incluye tanto la materia disuelta como la particulada (Amador y Loomis, 2018).

La diferencia entre DBO y DQO es que la última determina adicionalmente sustancias orgánicas no biodegradables.

- **Materia orgánica refractaria:** Esta materia suele resistir a los métodos tradicionales de tratamiento como por ejemplo los fenoles.
- **Metales pesados:** Es necesario eliminarlos si se requiere reutilizar el agua residual (Metcalf, 1995), ya que pequeñas cantidades pueden provocar graves alteraciones en los seres vivos.

1.1.1.3 Contaminantes biológicos

- **Patógenos:** Los patógenos humanos encontrados en los efluentes incluyen virus, bacterias, protozoos, hongos y helmintos (nematodos, cestodos y trematodos). La exposición a los efluentes que contienen estos organismos, por contacto directo, inhalación y/o ingestión, puede causar una variedad de enfermedades en los seres humanos, como gastroenteritis, meningitis y conjuntivitis (virus), disentería y cólera (bacterias), giardiasis (protozoos) y ascariasis (helmintos). Los organismos patógenos en el efluente varían en tamaño desde $0.01\ \mu m$ para virus hasta $1000\ \mu m$ para huevos de helmintos (Amador y Loomis, 2018).

1.1.1.4 Nutrientes

- **Nitrógeno:** El nitrógeno (N) en el efluente puede incluir especies inorgánicas (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) y orgánicas (proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, urea). La suma de especies de N orgánicas e inorgánicas se conoce como nitrógeno total (NT). La concentración de N total en el efluente es uno de los parámetros a menudo regulados por entidades estatales (incluyendo regionales o locales a nivel municipio) debido a que los niveles elevados en las aguas subterráneas y superficiales pueden afectar la salud pública y los ecosistemas. La concentración de especies de nitrógeno se informa como $mg\ N\ L^{-1}$ o

Capítulo 1

como mg de compuestos que contienen N L⁻¹. Esta es una distinción importante, ya que este último puede incluir elementos distintos de N, como C, H, O, P y S, mientras que el primero representa N exclusivamente (Amador y Loomis, 2018).

- **Fósforo:** El fósforo en las aguas residuales está presente tanto en formas orgánicas (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácido fítico) como inorgánicas (PO₄³⁻). El fósforo total (PT) es la suma de las especies P orgánicas e inorgánicas presentes en el efluente. La concentración se informa generalmente como mg P.L⁻¹ (ppm) o mg de compuestos que contienen P L⁻¹. Como es el caso de N, esta es una distinción importante, ya que este último puede incluir elementos distintos de P, como C, H, O, N y S, mientras que el primero representa P exclusivamente (Amador y Loomis, 2018).

1.2 NITRÓGENO

1.2.1 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es un componente estructural integral de las proteínas y los ácidos nucleicos que se encuentran en todas las células vivas. Aunque es un componente esencial para la vida de los organismos, éstos sólo pueden utilizar este elemento en sus formas reactivas. El nitrógeno molecular (N₂) es el elemento más abundante en la atmósfera y representa el 78% de todos los gases atmosféricos. Desafortunadamente, el N₂ no está disponible para la mayoría de los organismos porque contiene un triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, que muy pocos organismos pueden romper. Por lo tanto, esta abundante forma no reactiva de nitrógeno necesita convertirse en formas de nitrógeno utilizables o "reactivas", es decir como nitrógeno amoniacal (NH₃-N) o nitrato (NO₃⁻) para permitir el desarrollo de la mayoría de las formas de vida u organismos (Holmes y col, 2018).

Hay un número limitado de procesos biológicos y no biológicos en que el N₂ puede convertirse en nitrógeno reactivo y es fijado por las bacterias en formas de iones y nitrato. La fijación de nitrógeno es el proceso mediante el cual se lleva a cabo la reducción de nitrógeno molecular a amonio (Newton y Fisher, 2002). La mayor parte del nitrógeno fijo está formado biológicamente por un grupo limitado de procariontes (de los dominios Bacteria y Archaea) llamados diazotrofos que utilizan una vía enzimática única (metabolismo quimio-órgano-heterótrofo) para convertir N₂ en NH₃ (la reacción está catalizada por un complejo enzimático denominado nitrogenasa o di nitrogenasa). Algunos de estos

Capítulo 1

procariotas forman asociaciones simbióticas con plantas y animales, mientras que otros viven libres en ambientes terrestres y acuáticos (Petersen y col, 2016). Las fuentes no biológicas de fijación de nitrógeno incluyen combustión, fijación industrial y quema de biomasa (Holmes y col, 2018).

Muchos de los flujos de nitrógeno en la capa terrestre son llevados a cabo por diferentes procesos biológicos, los cuales transforman los compuestos nitrogenados para obtener nutrientes o energía (Figura 1.1). Una vez que el nitrógeno no reactivo (N_2) se convierte en una forma reactiva, las raíces de las plantas pueden absorberlo e incorporarlo a proteínas y ácidos nucleicos. La mayoría de las plantas no pueden utilizar directamente el amoníaco formado por procariotas fijadores de nitrógeno, sino que necesitan que otro grupo de microorganismos llamados bacterias nitrificantes los convierta primero en nitrato. Comúnmente, la nitrificación requiere que dos grupos de bacterias aeróbicas trabajen juntas para oxidar el amonio a nitrato. Primero, las bacterias oxidantes de amoníaco convierten el NH_3 en NO_2^- , seguido de la oxidación de NO_2^- en NO_3^- llevada a cabo por las bacterias oxidantes de nitrito. Mientras que las plantas y otros productores primarios pueden utilizar fuentes de nitrógeno reactivas inorgánicas, los miembros de niveles tróficos más altos en la red alimentaria necesitan recibir sus suministros de nitrógeno al consumir fuentes de nitrógeno orgánico como las que se encuentran en plantas o animales (Holmes y col, 2018).

Finalmente, todas las plantas y animales mueren y se descomponen por microorganismos fermentativos que convierten las fuentes de nitrógeno orgánico en amonio. Este proceso se llama mineralización (o bien amonificación) y permite que las fuentes de nitrógeno reactivo inorgánico entren nuevamente en el ciclo del nitrógeno (Figura 1.1). El nitrógeno reactivo también puede ingresar a la atmósfera después de que se convierte nuevamente en nitrógeno molecular (N_2) por desnitrificación, de nitrito o nitrato por bacterias heterótrofas, o por oxidación anaeróbica de amonio mediante un proceso denominado anammox (Figura 1.1) (Holmes y col, 2018) que se detallará posteriormente.

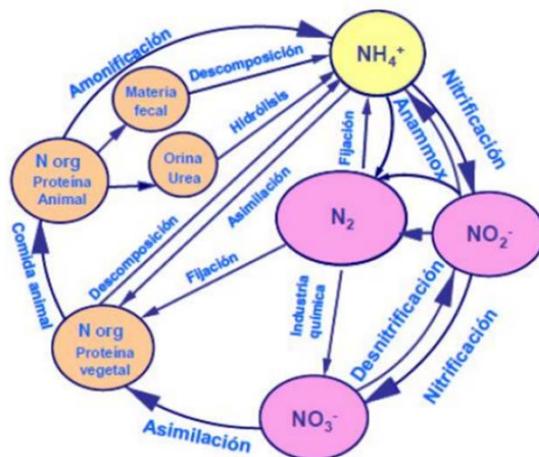


Figura 1.1: Ciclo del nitrógeno (Aguirre y col, 2014)

En síntesis, los compuestos nitrogenados se pueden encontrar en diversas formas debido al número de estado de oxidación que puede presentar el nitrógeno, siendo el amoníaco la forma más reducida (NH_3) y el nitrato (NO_3^-) la forma más oxidada.

1.2.2 Efecto del nitrógeno en los ecosistemas y problemas para la salud humana

El nitrógeno reactivo es un componente necesario para la vida, no obstante, un exceso de este compuesto puede causar serios problemas ambientales. El nitrógeno reactivo se transporta fácilmente en el aire, el agua y suelos y puede tener efectos nocivos en todos los niveles tróficos de un ecosistema. El crecimiento de la población mundial en las últimas dos décadas causaron un aumento considerable en la producción de nitrógeno reactivo que se libera al medio ambiente (Holmes y col, 2018). Ejemplos de ello son el uso de fertilizantes, la combustión de combustibles fósiles, la quema de biomasa (cuando la madera se utiliza como combustible y los bosques y pastizales se talan para la agricultura) y la generación de aguas residuales y desechos industriales (Holmes y col, 2018).

Los óxidos de nitrógeno (NO_x) son gases de nitrógeno diferentes: óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2). El término NO_x se refiere a la combinación de estos dos gases debido a las facilidades de interconversión mutua que presentan en presencia de oxígeno. Aunque desde un punto formal, el término general de los óxidos de nitrógeno, engloba los siguientes compuestos: NO, NO_2 , N_2O_2 , N_2O_4 , N_2O , N_2O_3 , N_2O_5 y NO_3 , siendo este último inestable.

Capítulo 1

Una de las especies de NO_x que se produce en mayor abundancia es el N_2O . El óxido nitroso se emite durante las actividades agrícolas e industriales y durante la combustión de combustibles fósiles y desechos sólidos. Además, la contaminación se genera desde el escape de los vehículos y la quema de carbón, petróleo, combustible diesel y gas natural, especialmente de las plantas de energía eléctrica (Law y col, 2012). El óxido nitroso actúa como gas de efecto invernadero, con una capacidad de calentamiento global de aproximadamente 300 veces superior al dióxido de carbono.

Un exceso de nitrógeno reactivo en forma de NO_x (NO y NO_2) en la atmósfera promueve la creación de ozono y smog, lo que puede desencadenar enfermedades respiratorias y dañar la vegetación. También hay evidencia creciente que muestra una conexión entre el nitrógeno reactivo en el aire y varios tipos de cáncer y enfermedades cardiopulmonares (Holmes y col, 2018). Otros de los inconvenientes se relacionan con la deposición atmosférica de nitrógeno reactivo (NO_x), especialmente en combinación con sulfato, que contribuye a la acidificación de suelos y cuerpos de agua, conduciendo a una disminución de las poblaciones de peces, anfibios e invertebrados. Además, los óxidos de nitrógeno y el dióxido de azufre reaccionan con sustancias en la atmósfera para formar lluvia ácida (Law y col, 2012).

Las formas reactivas de nitrógeno son altamente solubles en agua y tienden a filtrarse en el suelo y contaminar las aguas subterráneas y los ecosistemas acuáticos. Cuando llega a ambientes acuáticos como estuarios u otros ecosistemas costeros, promueve el crecimiento de algas que resultan en eutrofización. Las floraciones de algas formadas por este efecto fertilizante, bloquean la luz solar e interfieren con la productividad de las plantas y animales acuáticos, la temperatura del agua y su flujo. Finalmente, las algas se descomponen y se hunden en el fondo del ecosistema acuático, en este proceso de descomposición de las algas intervienen las bacterias aeróbicas consumiendo oxígeno, lo que genera regiones hipóxicas o anóxicas, con concentraciones de oxígeno demasiado bajas para sustentar la vida, a menudo denominadas zonas muertas (Holmes y col, 2018).

El impacto de la descarga de aguas residuales en el ambiente se manifiesta en varios niveles, desde daños a la salud humana hasta complejos problemas ecológicos, técnicos y económicos. Los compuestos de nitrógeno ponen en peligro la salud humana: el amoníaco es tóxico, tiene efectos subletales acumulativos, ralentiza el crecimiento y el desarrollo de niños y adolescentes; los nitritos son muy peligrosos, tanto para los humanos

Capítulo 1

(ya que producen cáncer gástrico) como para la fauna acuática (Singureanu y Woinaroschy, 2017).

Los nitratos como tales no son tóxicos, pero comienzan a ser peligrosos cuando se someten a procesos de reducción y se convierten en nitritos. Una vez infundidos en la sangre, los nitritos se combinan con la hemoglobina formando metahemoglobina y creando una deficiencia de oxígeno. Los bebés expuestos al agua con altas concentraciones de nitrato corren el riesgo de desarrollar metahemoglobinemia (también conocido como síndrome del bebé azul). Por lo tanto, un exceso de nitrato hace que el sistema digestivo de un bebé convierta el nitrato en nitrito y esto priva al cuerpo de oxígeno, lo que lleva a fallas digestivas y respiratorias (Holmes y col, 2018). Cabe destacar que los nitratos son menos peligrosos para los adultos (pueden causar ciertos trastornos gástricos).

Investigaciones recientes también han demostrado que el cuerpo puede convertir el nitrato ingerido con el agua potable en compuestos N-nitrosos (NOC), los cuales son potentes carcinógenos tanto en animales como seres humanos (Holmes y col, 2018), como por ejemplo las nitrosaminas. Las nitrosaminas se pueden producir en el alimento o en el propio organismo. En el primer caso que involucra la formación de este compuesto de forma exógena, el riesgo se limita a aquellos productos que se calientan mucho durante la cocción o que son ricos en aminos nitrosables. En el segundo caso se podrían formar nitrosaminas de forma endógena en las condiciones ambientales del estómago (Duarte y col, 2014). Las nitrosaminas según estudios clínicos son causantes de tumores, aún en pequeñas concentraciones, capaces además de cruzar la barrera placentaria produciendo tumores en la siguiente generación (Rodas-Hernandez, 2005).

La acción humana ha causado un enorme impacto en el ciclo global del nitrógeno, produciendo la entrada de nitrógeno antropogénico en el sistema terrestre y generando una serie de impactos ambientales. La intervención del ser humano en los diferentes ecosistemas ha provocado una alteración del ritmo natural del ciclo del nitrógeno, lo que conlleva una serie de consecuencias ambientales (Figura 1.2). Cabe destacar que, del total de nitrógeno antropogénico introducido en el ciclo terrestre, aproximadamente 150 Tg N a^{-1} (teragramos de nitrógeno al año), 9 Tg N a^{-1} permanecen retenidos a largo plazo en los suelos agrícolas y la mayor parte (65 Tg N a^{-1}) es transferida hacia los ecosistemas acuáticos, especialmente mediante contaminación difusa desde los campos agrícolas. Del total, 15 Tg N a^{-1} son lixiviados hacia el agua subterránea, permaneciendo retenidos, y 35-

Capítulo 1

50 Tg N a⁻¹ son exportadas a través de los ríos y juegan un papel crucial en el suministro de nutrientes a los océanos (Schlesinger, 2009).

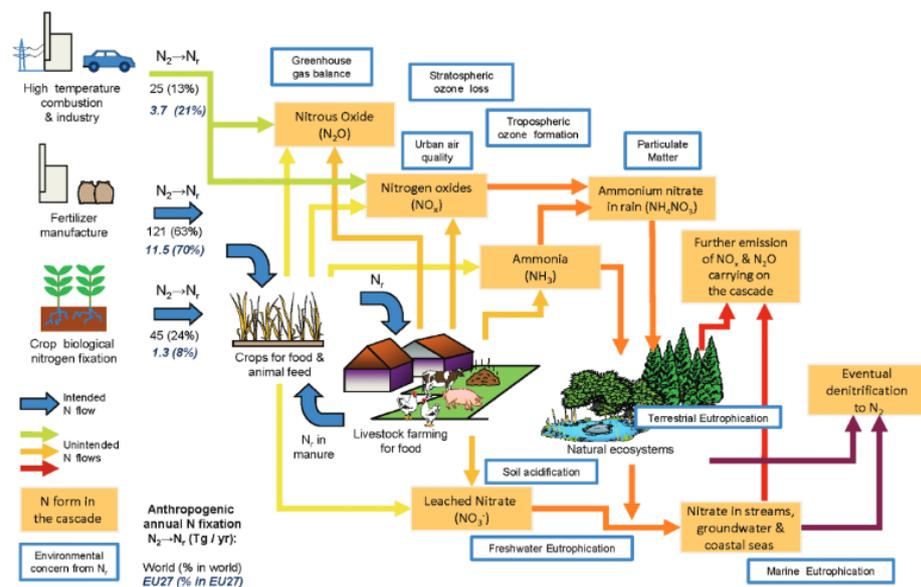


Figura 1.2: Ciclo del nitrógeno y fuentes antropogénicas (Sutton y col, 2011)

La contaminación de los recursos hídricos por nitrógeno se puede producir por fuentes de tipo puntual o difusa. En los casos de fuente de tipo puntual, la contaminación se produce en un área localizada y restringida, tratándose normalmente de vertidos residuales o efluentes, en los que el usuario causante del daño normalmente está identificado. La contaminación difusa se produce por la lixiviación de nitrógeno desde la superficie hacia los cuerpos de agua subterráneos y superficiales a través de un área muy amplia, en el que se identifican un gran número de usuarios como causantes de la misma. Así, la agricultura es una de las principales fuentes de contaminación difusa de los recursos hídricos por nitrógeno, además de producir otros impactos a nivel mundial, como por ejemplo la escasez de agua, pérdida de biodiversidad, deforestación entre otras causas (Cherry y col, 2008; FAO 2011),

El hecho de que la acción humana haya aumentado las entradas de nitrógeno en el ciclo global del nitrógeno provoca su acumulación en todos los reservorios terrestres (atmósfera, suelo y agua), y conlleva a consecuencias negativas, tanto para el medio ambiente como para la salud humana. Una de las formas de poder disminuir la contaminación por estas formas nitrogenadas es mediante la remoción biológica de

Capítulo 1

nutrientes (RBN), la cual es considerada la técnica más económica y sustentable para satisfacer requerimientos de descarga rigurosos (Xu y col, 2013).

1.2.3 Legislación Ambiental: Normas Nacionales e Internacionales

La descarga de formas nitrogenadas en los efluentes se encuentra regulada por la legislación ambiental tanto a nivel nacional como internacional. Según la agencia de protección ambiental (EPA, 2007) y el sistema nacional de eliminación de descargas contaminantes de los EE. UU, los niveles máximos de contaminantes permitidos de las formas de nitrógeno son los que se pueden observar en la Tabla 1.1. Es de suma importancia considerar y respetar los límites expuestos para cuerpos de aguas superficiales ya que como se mencionó anteriormente la exposición al nitrato por encima del límite máximo permitido puede causar diversos trastornos (Dapena-Mora y col, 2006).

Tabla 1.1: Límites máximos permitidos para la descarga de efluentes respecto a las diferentes especies nitrogenadas (EPA, 2007)

Especies nitrogenadas	Máximo diario de descarga (mg N.L⁻¹)
<i>Nitrógeno amoniacal</i>	30
<i>Nitrato + Nitrito</i>	10*

*Nitrato + Nitrito como N. Con base en el análisis de la EPA se ha determinado que la descarga tiene un potencial razonable de causar o contribuir a un exceso de nitrato + nitrito como N. Por lo tanto, el permiso retiene los límites de efluente para nitrato + nitrito como N basado en el uso designado como suministro de agua doméstico, el cual se aplica a la protección de la salud humana y se evalúa mediante exposición a largo plazo.

No obstante la provincia de Buenos Aires bajo la resolución de 336-03, especifica que los valores permitidos para la descarga de efluentes a cuerpos de agua superficiales, deben ser menores o iguales 25 mg.L⁻¹ para el nitrógeno amoniacal, menores o iguales a 35 mg.L⁻¹ para el nitrógeno total y menores o iguales a 10 mg.L⁻¹ para el nitrógeno orgánico.

Capítulo 1

1.3 CONTAMINANTES PRIORITARIOS

Existe una amplia gama de compuestos industriales que pueden ser liberados al medio ambiente. Muchos de estos causan graves problemas en la salud, tales como metales, metales pesados, pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos orgánicos volátiles, hidrocarburos de petróleo, incluidos los hidrocarburos poli-aromáticos y el combustible oxigenado metil terbutil éter (MTBE), plastificantes, resinas, disolventes inorgánicos y compuestos orgánicos refractarios. Este último grupo de contaminantes es amplio y consiste en alcanos clorados (tetracloruro de carbono), etenos clorados (cloruro de polivinilo o PVC), hidrocarburos aromáticos polinucleares (naftaleno, alquitrán de hulla), pesticidas, herbicidas y fumigantes, mono-diclorobencenos (solventes), bencenos (benceno, tolueno), fenoles, clorofenoles y trihalometanos (cloroformo, bromoformo) (Holmes y col, 2018).

La mayoría de estos compuestos industriales se clasifican como contaminantes prioritarios, los cuales son compuestos orgánicos o inorgánicos seleccionados en función de su carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad o toxicidad elevada aguda conocida o sospechada.

Cabe destacar que el conocimiento de tóxicos que tienen efecto deletéreo reconocido se ha compilado en listados de contaminantes prioritarios e incluyen límites de exposición para seres humanos y animales de experimentación. Se reconocen por ejemplo los contaminantes prioritarios clasificados según la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA) (Murray y col, 2010), que incluyen 126 sustancias, de acuerdo a su potencial cancerígeno (IARC, 2015), además de medidas de categorización de plaguicidas según su toxicidad aguda con el interés de proteger a las personas que los manipulan.

Tal como se mencionó anteriormente, los compuestos fenólicos se encuentran entre los contaminantes más importantes presentes en el medio ambiente; algunas organizaciones como la Unión Europea y la EPA los han incluido dentro de los primeros 45 contaminantes prioritarios (Atieh, 2014) debido a su alta toxicidad y persistencia en el medio ambiente (Mahugo y col, 2009). Cabe destacar que los compuestos fenólicos no solo se generan por la actividad humana, sino que también se forman de forma natural (Murray y col, 2010). Los fenoles están presentes en los suelos y sedimentos y, por lo tanto, producen contaminación de aguas subterráneas. Las estructuras de once compuestos fenólicos considerados contaminantes prioritarios por la EPA se muestran en la Figura 1.3.

Capítulo 1

La eliminación de estos compuestos orgánicos o bien su reducción hasta los niveles permitidos por los estándares ambientales representa un gran desafío (Mahugo y col, 2009).

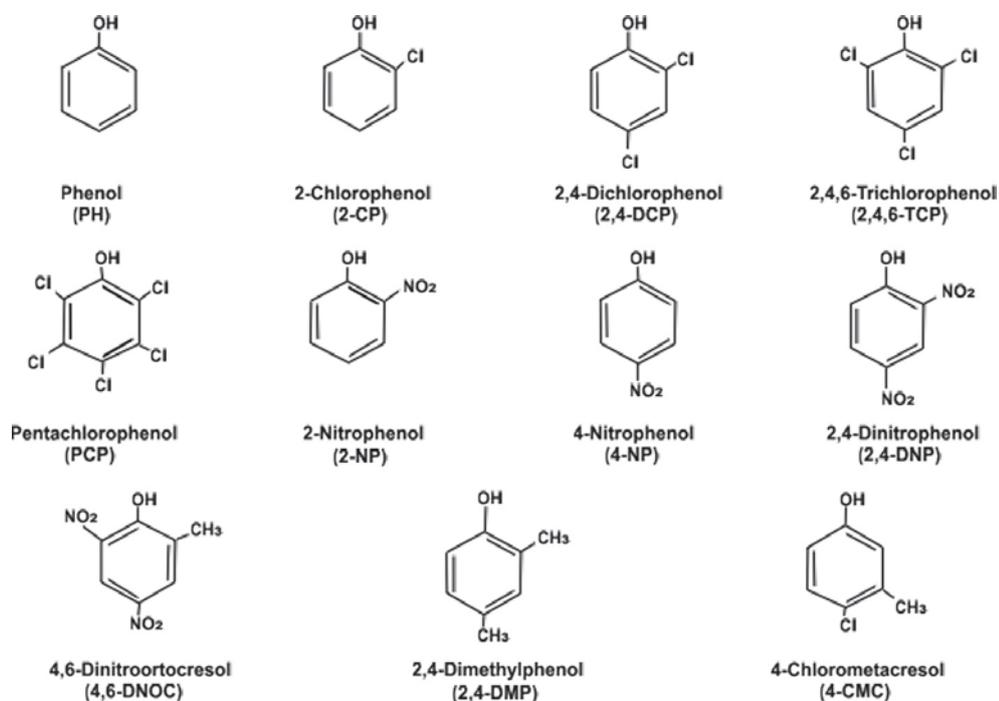


Figura 1.3: Estructuras de compuestos fenólicos considerados contaminantes prioritarios por la EPA. (Ramirez y col, 2017)

1.3.1 Compuestos fenólicos

Las industrias generan grandes volúmenes anuales de aguas residuales que contienen compuestos peligrosos, como fenoles, ácidos tánicos, lignina, celulosa, compuestos clorados, pesticidas, hidrocarburos aromáticos, etc., para el medio ambiente. Muchos de estos compuestos se encuentran en concentraciones demasiado bajas para recuperarlos, pero suficientemente altas para actuar como contaminantes (Ramirez y col, 2018).

En los últimos años, los compuestos fenólicos han atraído un gran interés debido a que se encuentran presentes en diferentes productos, entre los cuales se destacan: adhesivos, espumas, emulsionantes, detergentes, insecticidas, colorantes, explosivos, productos químicos de caucho, nanomateriales para autoensamblaje, entre otros (Ramírez y col, 2018; Baruah y col, 2011). Los compuestos fenólicos son empleados ampliamente en la industria química, lo que conduce a que sean contaminantes comunes que se encuentran cotidianamente en las descargas de aguas residuales industriales (Ramírez y

Capítulo 1

col, 2018). Estos compuestos son producidos en gran medida por diferentes industrias entre las que se destacan: las industrias petroleras, farmacéuticas, alimenticias, plantas de procesamiento de carbón, etc. (Figura 1.4).

Asimismo, es importante resaltar que los compuestos fenólicos son difícilmente biodegradables y presentan una elevada resistencia a la degradación por microorganismos mediante la utilización de tratamientos biológicos convencionales (Villegas y col, 2016). En los últimos años, los compuestos fenólicos formaron parte de uno de los grupos que mayor atención ha requerido, dentro de los contaminantes prioritarios, en el estudio de aguas residuales, debido a su elevada toxicidad y a la frecuencia con que los procesos industriales producen efluentes con elevadas concentraciones de estos compuestos (Santos y col, 2001). Los compuestos fenólicos disueltos en las aguas residuales industriales causan contaminación en el agua subterránea y, debido a su efecto nocivo, afectan este tipo de recursos hídricos. Además, son muy peligrosos para la salud humana ya que la exposición a este tipo de productos químicos, una vez que ingresan al cuerpo, puede dañar el sistema nervioso, respiratorio, circulatorio y los riñones (Ramirez y col, 2018).

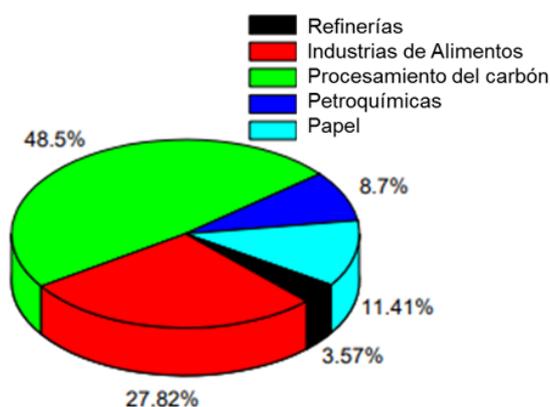


Figura 1.4: Concentración de contaminantes prioritarios en efluentes de diferentes industrias
(Modificado de Raza y col, 2018)

1.3.1.1 Propiedades físicas y químicas de los compuestos fenólicos

El fenol y sus derivados tienen ciertas propiedades químicas y físicas relacionadas a sus fuentes originales y sectores de aplicación. A temperatura y presión estándar, estos compuestos son aromáticos con una estructura sólida cristalina higroscópica y presentan

Capítulo 1

puntos de ebullición más altos que los hidrocarburos del mismo peso molecular (Solomons, 2014).

La mayoría de los compuestos fenólicos tienen una acidez débil con una limitada solubilidad en agua pero elevada solubilidad en solventes orgánicos como benceno, éter y etanol (Raza y col, 2018), siendo el pKa (K_a es la constante de disociación del compuesto) del fenol 10 y el log Pow (n-octanol/agua) 1.5. La toxicidad de los compuestos orgánicos en el medio ambiente está influenciada por propiedades como el valor de pKa, la hidrofobicidad y la reactividad (Raza y col, 2018).

El pKa es un factor relevante que altera la hidrofobicidad, mientras que el Log Pow es el parámetro utilizado para medir hidrofobicidad. La acidez del fenol es el resultado de la deslocalización de la carga negativa (electrones) sobre el anillo aromático y el efecto de resonancia (Sobiesiak, M, 2017).

La toxicidad del fenol está relacionada con la formación de radicales libres y su hidrofobicidad, la cual afecta la solubilidad del fenol en la célula y, por tanto, la posibilidad de interacción del compuesto con las células. Los fenoles, después de la penetración en la célula, sufren una transformación activa, principalmente por oxidasas del citocromo P450. Los procesos de transformación pueden conducir al aumento de la toxicidad por la formación de metabolitos electrófilos que afectan al ADN o las enzimas (Michałowicz y Duda, 2007).

Es conocido que los compuestos fenólicos causan efectos agudos en la salud que van desde problemas simples de la piel hasta enfermedades fatales asociadas a órganos como riñones, pulmones y estómago. Asimismo, el manejo de compuestos fenólicos requiere mucha precaución ya que la mayoría son corrosivos y causan ampollas inmediatas al contacto con la piel humana (Raza y col, 2018). Por ende, la descarga de efluentes industriales que contienen compuestos fenólicos está restringida a menos que la concentración de estos compuestos esté por debajo de los niveles estándar (Raza y col, 2018).

El agua que va a ser sometida al proceso de desinfección, puede contener precursores, como por ejemplo fenoles, que reaccionan con el desinfectante, dando lugar a la aparición de una serie de sustancias indeseables, que en el caso de la desinfección por cloro se trata en general de compuestos orgánicos clorados, muchos de los cuales tienen comprobada su capacidad tóxica y/o mutagénica para el hombre. Estos son subproductos de la reacción del cloro con compuestos fenólicos. Los tres clorofenoles más probables

Capítulo 1

que pueden resultar de la cloración son: 2- clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol. Son los causantes del “sabor y olor fenólico”. A medida que aumenta el contenido en cloro, los sabores y olores también aumentan hasta un punto máximo, luego disminuyen hasta desaparecer totalmente cuando se agrega suficiente cloro y el tiempo de contacto es el adecuado para que las reacciones de oxidación del fenol se completen. La intensidad de los olores varía con el tipo de compuesto. Estas reacciones, al igual que otras reacciones químicas, dependen de la concentración, tiempo, temperatura y pH. La toxicidad de estos compuestos está relacionada con su alto grado de hidrofobicidad, lo que facilita su adhesión en las membranas celulares, interfiriendo así en el metabolismo de los seres vivos (Reckhow y col, 2010).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una concentración de fenol máxima permitida de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el agua potable y la EPA de $1.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en efluentes industriales (Salari y col, 2019).

1.3.1.2 Métodos de eliminación de compuestos fenólicos del agua

Hay dos métodos comunes utilizados para eliminar el contenido de fenol en las aguas residuales: los métodos fisicoquímicos y los métodos biológicos (Hussain y col, 2015).

Los métodos fisicoquímicos generalmente utilizados para el tratamiento de aguas residuales conteniendo fenol involucran la ionización, adsorción, ósmosis inversa, oxidación electrolítica, la utilización del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y fotocatalisis.

El fenol generalmente se separa de las aguas residuales a través de procesos de separación como la destilación a vapor, la extracción, la adsorción y la extracción con solventes a base de membrana. El proceso de adsorción mediante el uso de carbón activado es utilizado ampliamente para la eliminación de contaminantes en las aguas residuales (Radovic y col, 2000, Hussain y col, 2015). La adsorción implica diferentes procesos como la saturación, adsorción, desorción y regeneración. Se ha informado que algunos de los derivados de fenoles pueden adsorberse irreversiblemente en el carbón activado, donde el fenol adsorbido irreversiblemente no puede ser desorbido en agua (Terzyk, 2007). Esto presenta una desventaja que radica en la dificultad para regenerar el adsorbente (Hussain y col, 2015).

El fenol también puede ser removido mediante oxidación y biofiltración (Guido y col, 2008). La razón de usar agentes oxidantes es reducir eficientemente el contenido de

Capítulo 1

compuestos fenólicos en las aguas residuales. Durante el proceso de oxidación, los agentes oxidantes transforman estas sustancias tóxicas en elementos menos nocivos que son seguros para liberar al medio ambiente (Hussain y col, 2015). No obstante, en el caso del uso de la cloración para la degradación de fenol, se generan clorofenoles de elevada toxicidad (Marrot y col, 2006). El ozono es uno de los oxidantes más fuertes que se utiliza para la degradación del fenol debido a su disponibilidad, solubilidad y generación de sustancias menos tóxicas. Las moléculas de ozono reaccionan con sitios ricos en electrones del contaminante orgánico. Durante este proceso se generan radicales hidroxilos a partir de la reacción del ozono que actúan como oxidantes para la molécula contaminante (Hussain y col, 2015). También se ha investigado y utilizado el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el acoplamiento de este con sales de hierro (II), reacción que es denominada reacción de Fenton, para la oxidación de fenol. El peróxido de hidrógeno es rico en contenido de oxígeno y actúa como un oxidante fuerte (Hussain y col, 2015).

A pesar de la efectividad de los métodos fisicoquímicos para la eliminación de fenol, éstos generan comúnmente productos secundarios que eventualmente ingresan al medio ambiente actuando como contaminantes acuáticos tóxicos, provocando graves problemas ambientales. La mayoría de los métodos fisicoquímicos causan problemas secundarios en los efluentes y requieren un elevado capital y costo energético para degradar los compuestos fenólicos (Hussain y col, 2015; Raza y col, 2018).

Una alternativa para superar estos inconvenientes es la utilización de métodos de tratamiento biológico para la eliminación de fenol (Hussein y col, 2015). En el tratamiento biológico, los microorganismos degradan el fenol generando compuestos no tóxicos (Hussein y col, 2015).

1.4 TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE AGUAS RESIDUALES CON BIOMASA SUSPENDIDA

1.4.1 Lodos activados

En los últimos años un gran problema de preocupación para la humanidad es la gran cantidad de aguas residuales que son vertidas indiscriminadamente a los cuerpos de agua sin ningún tipo de tratamiento. Como consecuencia, se han ido desarrollando métodos de tratamiento de aguas residuales que involucran microorganismos, debido a que son económicos, eficientes y no generan subproductos contaminantes.

Capítulo 1

El proceso de lodos activados convencional está constituido por dos tanques físicamente separados: un tanque de aireación en el que tienen lugar reacciones biológicas para la eliminación de carbono orgánico y de nitrógeno amoniacal mediante el proceso de nitrificación, y un tanque de sedimentación en el que el lodo activado se separa del agua tratada (Figura 1.5) (Nancharaiah y col, 2018). Los flóculos microbianos conjuntamente con los compuestos orgánicos e inorgánicos solubles y particulados, presentes en el tanque de aireación, constituyen lo que se denomina licor de mezcla (Figura 1.5). La materia orgánica biodegradable contenida en el agua residual es degradada en forma aerobia por microorganismos presentes en los flóculos. Los constituyentes orgánicos e inorgánicos del agua residual son utilizados por los microorganismos como fuente de carbono y energía y son transformados en sustancias más simples e inocuas para el ambiente. Teniendo en cuenta que los flóculos son más densos que el agua, el licor de mezcla se descarga al tanque de sedimentación donde el lodo activado se separa del agua residual tratada por gravedad, permitiendo que el efluente tratado sea descargado eficientemente y libre de biomasa suspendida. La velocidad de sedimentación depende de la estructura física de la biomasa (Nancharaiah y col, 2018). Para ajustar el TRC (tiempo de residencia celular), conocido también como edad de lodos, parte del lodo procedente del decantador secundario se purga del sistema y el resto del lodo se recircula hacia el reactor aerobio para mantener una concentración elevada y constante de biomasa en los reactores biológicos.

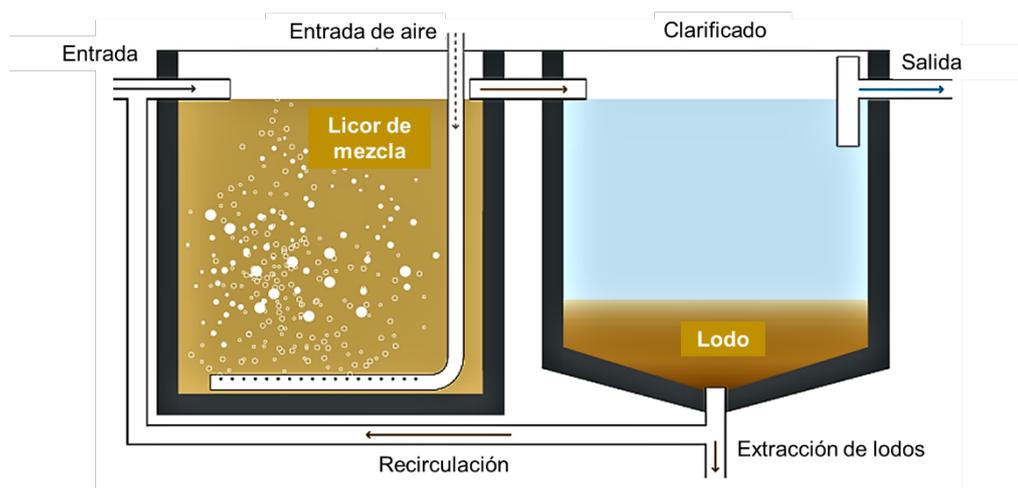


Figura 1.5: Esquema de un sistema de lodos activados (Modificación de Tilley y col, 2014)

Gran parte de las plantas de tratamiento de agua residual municipal alrededor del mundo utilizan el proceso de lodos activados (Nancharaiah y col, 2018). Sin embargo,

Capítulo 1

estos sistemas convencionales presentan ciertas desventajas entre las que se destacan: presencia de bajas concentraciones de biomasa en el tanque de aireación, requerimiento de aireación y tanques de aireación y sedimentación separados, elevada área del tanque aireado y altos requerimientos de energía para permitir flujos adecuados de aireación y recirculación. Asimismo, la escasa capacidad de sedimentación de los lodos activados, debido en muchos casos a problemas de “bulking”, puede conducir a un deterioro de la calidad del efluente debido a la pérdida excesiva de lodo y a una edad de lodos no controlada, lo cual conlleva a la pérdida de la eficiencia en el tratamiento (Nancharaiah y col, 2018). Por lo tanto, la eficiencia del tratamiento no solo depende de la selección y la capacidad de crecimiento de los microorganismos, sino que en segundo lugar también depende de la eficiencia de separación de los microorganismos del efluente tratado (McSwain, 2008)

1.4.2 Reactor discontinuo secuencial (SBR)

Una alternativa al proceso tradicional de lodo activado son los reactores de operación discontinua secuencial (SBR, sequencing batch reactor) que siguen ciclos ordenados de 5 fases que hacen referencia a: a) llenado, b) aireación y reacción, c) sedimentación de la biomasa, d) descarga del efluente o decantación y e) reposo (Figura 1.6) (Maszenan y col, 2011).

La separación del lodo del agua tratada se logra en el mismo reactor por medio del proceso de sedimentación, lo cual implica una ventaja, ya que no se requiere de un tanque de sedimentación separado. Los reactores con modo de operación discontinuo y mezcla completa desarrollan flóculos de lodos activados (Maszenan y col, 2011).

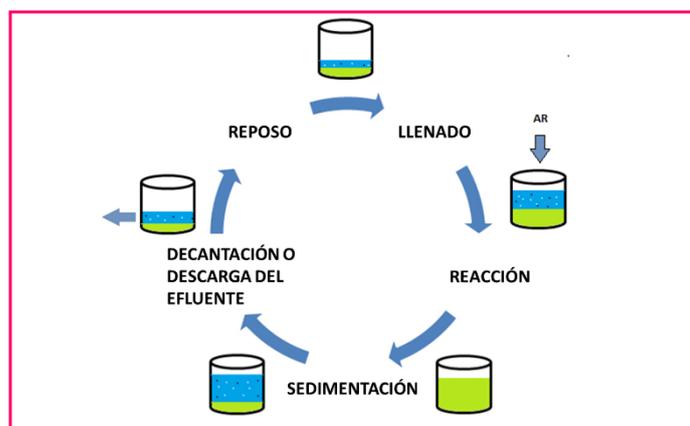


Figura 1.6: Esquema de las distintas etapas de un SBR

Capítulo 1

1.4.3 Remoción Biológica de Nitrógeno: Procesos convencionales

Este proceso se basa en nitrificación autótrofa aerobia y desnitrificación heterótrofa en condiciones anóxicas. La nitrificación es la oxidación biológica de amonio con oxígeno para dar nitrito, seguida por la oxidación de esos nitritos a nitratos. La desnitrificación es un proceso metabólico que usa el nitrato como aceptor terminal de electrones en condiciones anaerobias principalmente, conduciendo finalmente a nitrógeno molecular (gas, N_2).

Recordemos que las bacterias autótrofas crecen sintetizando sus materiales a partir de sustancias inorgánicas sencillas (H_2O , CO_2 , N_2 , NO_3^- , NH_3 , SO_4^{2-} , fosfatos, etc.) mientras que en las heterótrofas su fuente de carbono es orgánica.

El proceso de nitrificación es generalmente realizado por bacterias quimiolitotótrofas que emplean el carbono inorgánico como fuente de carbono para la síntesis celular y el nitrógeno inorgánico para obtener energía. Los microorganismos involucrados en este proceso se dividen en dos grupos bien diferenciados: las bacterias oxidantes de amonio (BOA) que se encargan de la conversión del nitrógeno amoniacal a nitrito (NO_2^-), formando hidroxilamina como producto intermediario, y las bacterias oxidantes de nitrito (BON) que se encargan de la transformación del nitrito a nitrato (NO_3^-) (Metcalf y Eddy, 1995). Como se ha mencionado en el proceso de desnitrificación, el nitrato es reducido a nitrógeno gaseoso (N_2). En la Figura 1.7 se presenta un esquema de las transformaciones del nitrógeno en las aguas residuales a partir de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato. Además, en el esquema se encuentran representados los procesos de hidrólisis del nitrógeno orgánico, los procesos de asimilación y crecimiento a partir de nitrógeno inorgánico en forma amoniacal y lisis bacteriana.

Capítulo 1

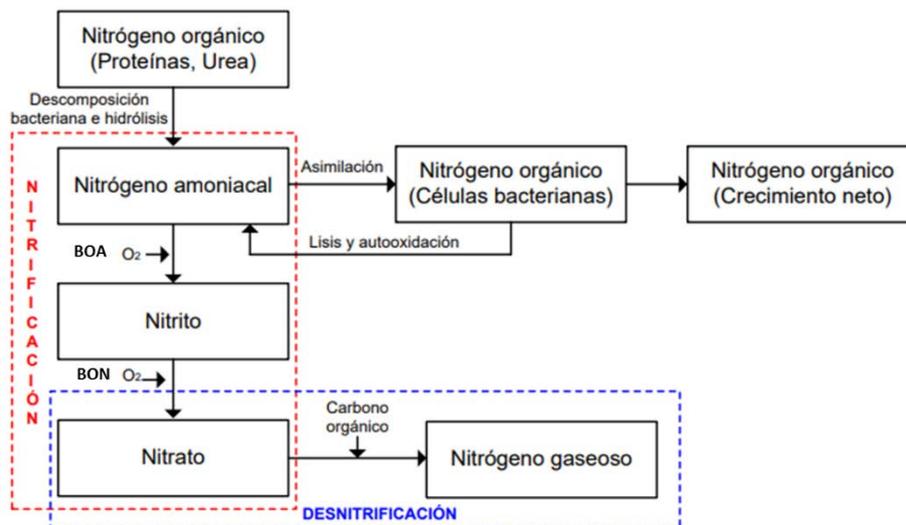
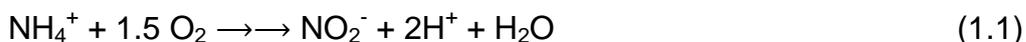


Figura 1.7: Transformaciones del nitrógeno mediante los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato (Metcalf y Eddy, 1995).

Las reacciones relevantes del proceso de nitrificación son las siguientes (Metcalf y Eddy, 1995):



Cabe destacar que la ecuación (1.1) es la etapa característica de las BOA mientras que la ecuación (1.2) representa la reacción producida por las BON.

Asimismo, la reacción que forma parte del proceso de desnitrificación se destaca a continuación (Third, 2003):



Existen diferentes esquemas de procesos para la eliminación biológica de nitrógeno (a partir de la nitrificación y desnitrificación) diseñados y operados generalmente mediante cultivos mixtos de bacterias autótrofas y heterótrofas, donde las etapas anóxica y aerobia se combinan de diversas formas y bajo diversas condiciones de operación, dando lugar a sistemas denominados sistemas de pre-desnitrificación y post-desnitrificación (Kim y col, 2019).

Capítulo 1

Con el objetivo de mejorar el proceso estándar de lodo activado en las plantas de tratamiento de aguas residuales, Ludzack y Ettinger (1961) y Wuhrmann (1964) fueron los primeros que desarrollaron sistemas de tratamiento biológico con el fin de eliminar nitrógeno de las aguas residuales incorporando nuevas etapas (nitrificación-desnitrificación) al proceso tradicional (Applegate y col, 1990).

La configuración Wuhrmann (aeróbico-anóxico) requiere que el tanque de desnitrificación sea colocado luego del tanque de aireación (Figura 1.8). Este tipo de configuración corresponde a un proceso de tipo post-desnitrificación. Para que se pueda realizar el proceso de desnitrificación se requiere de la adición de una fuente de carbono orgánico externa en el reactor anóxico. Esta configuración no cuenta con recirculación interna debido a que los nitratos pasan directamente desde el reactor aerobio hacia el reactor anóxico, en donde se lleva a cabo la desnitrificación. Parte del lodo procedente del decantador secundario se purga del sistema y el resto del lodo se recircula hacia el reactor aerobio.

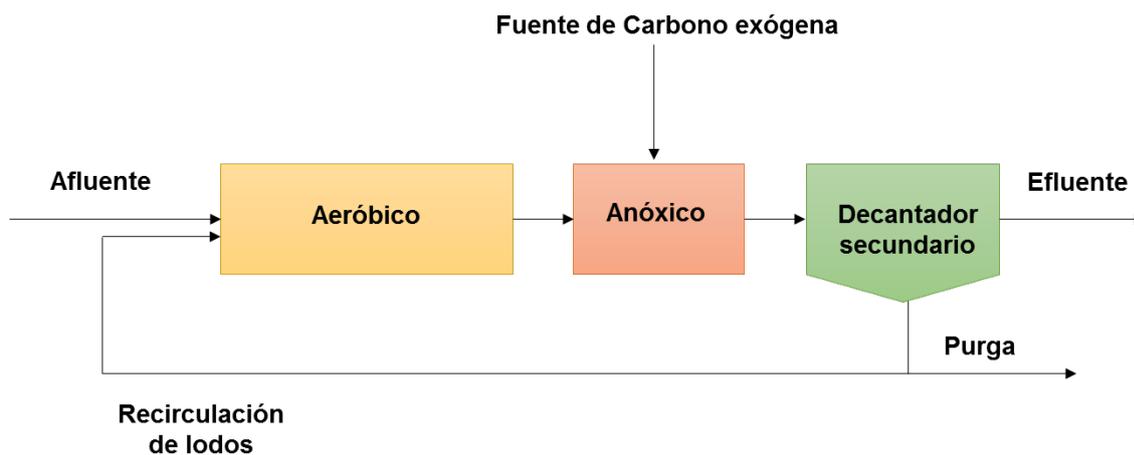


Figura 1.8: Esquema de la configuración de Wuhrmann

La configuración Ludzack-Ettinger hace referencia a un proceso biológico de dos etapas desnitrificación-nitrificación, con una zona anóxica seguida de una aeróbica (pre-desnitrificación). La zona anóxica se coloca antes que la aeróbica, esto permite que la zona de desnitrificación posea una fuente de materia orgánica. Esta fuente es necesaria para llevar a cabo el proceso de desnitrificación, tarea realizada por las bacterias desnitrificantes que utilizan el oxígeno contenido en el nitrato para metabolizar la materia orgánica presente en el agua residual. Por otro lado, en la segunda etapa, se produce la

Capítulo 1

reducción final de la materia orgánica mediante un proceso de biodegradación en condiciones aerobias (Ontiveros y col, 2010).

Posteriormente, a principio de los años sesenta, Barnard planteó un tratamiento de pre-desnitrificación denominado proceso de Ludzack Ettinger Modificado donde el proceso es similar al anterior con la adición de un reciclo interno (Bedoya y col, 2012).

La configuración Ludzack-Ettinger modificada (anóxico-aeróbico) es un esquema sencillo de tipo pre-desnitrificación que dispone de dos reactores en serie. En el primer reactor se realiza la desnitrificación empleando la fuente de carbono orgánico presente en el agua residual afluyente al proceso de lodos activados. La nitrificación ocurre en la zona aeróbica, la cual constituye la segunda etapa de este sistema modificado. Es operada como una simple etapa de nitrificación. El reactor anóxico recibe una corriente de recirculación interna procedente del reactor aerobio para llevar a cabo el proceso de desnitrificación. Gracias al reciclo interno, parte de la corriente nitrificada retorna a la zona anaeróbica donde, una vez consumido el oxígeno remanente, tiene lugar la desnitrificación. De esta manera, se obtienen altos niveles de desnitrificación debido a la retroalimentación del sistema. Una parte del lodo procedente del decantador secundario se recircula al reactor anóxico y la otra parte de este lodo se purga del sistema para ajustar el TRC. El licor de mezcla pasa del reactor anóxico al reactor aerobio con el objetivo de degradar simultáneamente la materia orgánica y oxidar el nitrógeno amoniacal a nitrato (Bedoya y col, 2012) (Figura 1.9).



Figura 1.9: Esquema de la configuración Ludzack-Ettinger modificada

Cabe destacar que este sistema condujo al fracaso de comercialización debido a la liberación de $\text{NH}_3\text{-N}$ en el proceso y al aumento de la turbidez en el efluente clarificado (Bedoya y col, 2012). Otra desventaja del sistema de pre-desnitrificación se relaciona con las condiciones microaerofílicas generadas a partir de la transferencia de oxígeno

Capítulo 1

mediante la mezcla en el reactor anóxico, lo cual puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la tasa de desnitrificación, que finalmente desencadena en la producción de óxidos de nitrógeno por desnitrificación incompleta (Plósz y col, 2003).

Este proceso presenta las siguientes desventajas: a) los altos costos implicados en la recirculación, b) la producción de óxidos de nitrógeno como producto final en lugar de N_2 debido a condiciones microaerófilas generadas por la recirculación (Robertson y col, 1995), c) la limitación de fuente de carbono en el tanque anóxico, causada por la dilución ejercida por la recirculación de nitratos, resultando una acumulación de productos intermedios como nitritos y óxidos de nitrógeno (Winkler y col, 2011).

Existe un tipo de configuración denominado Bardenpho, que representa una variación del esquema Ludzack-Ettinger modificado, el cual presenta cuatro etapas en donde se alternan zonas anóxicas y aerobias (Figura 1.10). En este proceso existe una corriente de recirculación interna desde el primer reactor aerobio (situado en la segunda posición) hacia el reactor anóxico inicial. En el tercer reactor, también anóxico, se reducen los nitratos producidos en el segundo reactor (aerobio), completando el proceso de desnitrificación. En esta etapa se utiliza como fuente de carbono la materia orgánica resultante del proceso endógeno de los microorganismos (post-desnitrificación). El último de los reactores es aerobio, y permite la desorción del nitrógeno gaseoso producido anteriormente, para facilitar la sedimentación de los fangos en el decantador secundario. Por último, se destaca que hay una corriente de recirculación de lodos hacia el reactor anóxico situado en la primera posición y una corriente de purga de lodos para ajustar el TRC (Bedoya y col, 2012). El principal problema asociado con dicha configuración es la necesidad de una fuente adicional de carbono para el proceso de desnitrificación, el cual agrega costos de operación al proceso.

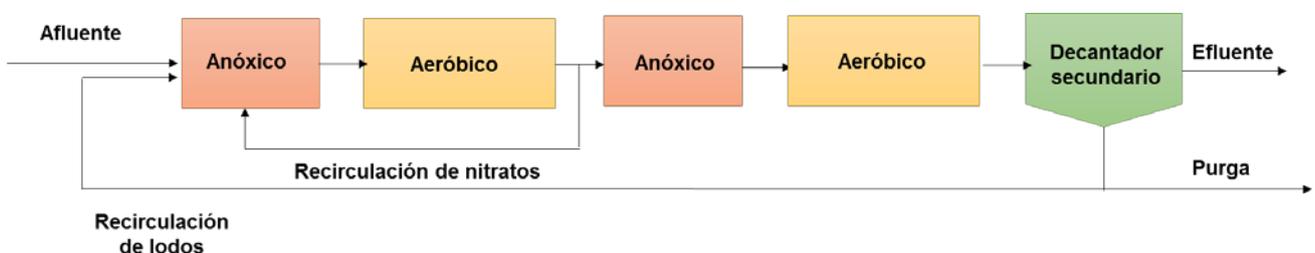


Figura 1.10: Esquema de la configuración Bardenpho

Capítulo 1

La aplicación de estos sistemas convencionales de remoción biológica de nitrógeno puede resultar difícil para el caso de aguas residuales industriales (Ramos y col, 2007), debido a la presencia de compuestos tóxicos. Estudios han demostrado que la presencia de compuestos tóxicos en estos sistemas puede afectar significativamente el rendimiento del reactor (Hazen y Sawyer, 2011).

Las bacterias nitrificantes son sensibles a la acción de diferentes sustancias inhibitoras que pueden actuar interfiriendo en el metabolismo general de la célula o reduciendo la velocidad de formación de los intermediarios. El efecto tóxico que causan dichas sustancias puede ser parcial o total. Cuando es parcial los microorganismos nitrificantes continúan creciendo y oxidando amonio, pero a menor velocidad; sin embargo, cuando es total puede provocar la muerte de los microorganismos y detener la actividad hasta que cese la inhibición (Henze y col, 1996). Entre los compuestos orgánicos que poseen un efecto inhibitorio sobre el proceso de nitrificación se encuentran: compuestos alifáticos como cloroformo y dicloroetano, compuestos aromáticos como clorobenceno, nitrobenzono, fenol y anilina, sulfuros, cianuros, entre otros.

1.5 SISTEMAS GRANULARES AERÓBICOS

Para resolver las limitaciones e inconvenientes del sistema de lodos activados (secciones 1.4.1 y 1.4.3), en particular para el tratamiento de efluentes industriales tóxicos, se ha desarrollado una nueva tecnología basada en el crecimiento de biomasa compacta y densa en forma de gránulos. Los sistemas granulares aeróbicos pueden superar muchas de las limitaciones de los sistemas de tratamiento de lodos convencionales y de esta forma ofrecer opciones de tratamiento de aguas residuales más eficientes (Nancharaiyah, y col, 2018). Esta tecnología nace a través de trabajos realizados por Beun y col, (1997) mediante la observación de la formación de lodo granular aeróbico en una columna de burbujas a escala de laboratorio, inoculada con lodo activado, y operada en modo discontinuo secuencial (SBR) y con un tiempo de sedimentación corto. Desde entonces, la tecnología de lodo granulado (granulación) ha atraído una mayor atención entre los científicos e ingenieros dado su gran potencial para mejorar la eficiencia de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales. La tecnología SBR fue utilizada en los últimos años por la mayoría de los investigadores para mejorar la eficiencia de los sistemas de tratamiento de efluentes debido a que logran un cultivo rápido y confiable de

Capítulo 1

biomasa granulada y presenta además flexibilidad operativa (Nancharaiah y col, 2018; Yu y col, 2019; Pat y col, 2011).

En reactores con operación discontinua y configuración de columna de burbujas se promueve la formación de agregados compactos y densos a partir de lodos activados. La operación secuencial de un SBR con un tiempo de sedimentación corto, típicamente de 2 a 10 min, permite seleccionar agregados microbianos densos de sedimentación rápida, mientras que el lodo con características de sedimentación deficiente se va eliminando en cada fase de decantación hasta removerse por completo. Este tipo de operación del biorreactor permite la inducción del fenotipo de agregación (el cual será detallado posteriormente) y la selección de agregados microbianos de sedimentación rápida (Nancharaiah y col, 2018). El SBR consiste de un tanque de configuración vertical, en lugar del tanque de aireación con mayores áreas superficiales, lo cual permite minimizar el tamaño de la planta (Nancharaiah y col, 2018).

Además de poseer un sistema de diseño más simple, los sistemas de lodo aeróbico granular permiten la retención de elevadas concentraciones de biomasa en el biorreactor (Nancharaiah y col, 2018). Las principales características de este sistema que favorecen un tratamiento eficiente son las siguientes (Nancharaiah y col, 2018):

- Gránulos de gran tamaño (milímetro) y elevada densidad.
- Mantenimiento de diferentes microambientes redox, es decir, regiones aeróbicas, anóxicas y anaeróbicas en los gránulos.
- Elevada retención de biomasa.
- Estricto control sobre las reacciones metabólicas mediante la regulación del oxígeno disuelto (OD).
- Cooperación metabólica entre microorganismos autotróficos y heterotróficos.

En la Tabla 1.2 se presentan las ventajas de la biomasa granular aeróbica con respecto al lodo activado (Nancharaiah y col, 2018)

Capítulo 1

Tabla 1.2: Diferencias entre lodo activado y lodo granular aeróbico

PARÁMETROS	LODO ACTIVADO	LODO GRANULAR AERÓBICO	OBSERVACIONES
FORMA Y TAMAÑO MEDIO	Tamaño irregular ~ < 0.2 mm	Partículas individuales de gran tamaño milimétrico con forma esférica bien definida; > 0.2 mm	El gran tamaño junto con la alta densidad permite que los gránulos aeróbicos decanten rápidamente mediante sedimentación cuando se apaga la aireación (sin mezcla)
GRAVEDAD ESPECÍFICA	0.997–1.01	1.010–1.017	Los gránulos aeróbicos con alta densidad permiten una separación sólido-líquido más rápida
VELOCIDAD ESPECÍFICA	Menores velocidades de sedimentación ~ < 10 m.h ⁻¹	Elevadas velocidades de sedimentación, > 10 m.h ⁻¹	Los gránulos aeróbicos sedimentan por sí solos, sin necesidad de depender de agentes o fuerza externa.
ÍNDICE DE SEDIMENTABILIDAD VOLUMÉTRICA DE LODO (ISV)	ISV ₅ ≠ ISV ₃₀	ISV ₅ = ISV ₃₀	Debido a las capacidades superiores de sedimentación, se ha recomendado el uso de ISV ₅ en caso de gránulos aeróbicos.
ESTRUCTURA EN CAPAS O COEXISTENCIA DE MICROAMBIENTES AEROBIOS, ANÓXICOS Y ANAERÓBICOS	Posibilidades mínimas de zonas anaerobias.	Distintas capas o microambientes: zonas aeróbicas, anóxicas y anaeróbicas prevalecen en los gránulos de tamaño milimétrico.	Microambientes aerobios, anóxicos y anaeróbicos coexistentes permiten la operación de conversiones biológicas tanto oxidativas como reductoras.
SUSTANCIAS POLIMÉRICAS EXTRACELULARES (SPE)	Bajo contenido de SPE	Alto contenido de SPE en gránulos aeróbicos en comparación con el lodo activado	Las SPE tienen un papel destacado en la agregación, estabilidad y función de los gránulos aeróbicos.
TOLERANCIA A COMPUESTOS TÓXICOS	Baja tolerancia a contaminantes tóxicos	Elevada tolerancia a contaminantes tóxicos	Debido a los atributos de biofilm, los gránulos aeróbicos tienen una mayor tolerancia a los contaminantes tóxicos.
RENDIMIENTO BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS Y CARGA ORGÁNICA FLUCTUANTE	Mala eliminación bajo shock o carga fluctuante	Capaz de eliminar contaminantes bajo shock o carga fluctuante	La estructura granular de la biopelícula ayuda a disminuir la toxicidad de los contaminantes a pesar que estos se encuentren en altas concentraciones en el líquido.

Capítulo 1

En síntesis, este tipo de reactores permite cultivar biomasa granulada a partir de un inóculo de lodos activados y un funcionamiento en modo SBR con aireación continua de burbujas y tiempos de sedimentación cortos (Nancharaiah y col, 2018).

1.5.1 FORMACIÓN DE LA BIOMASA GRANULAR AERÓBICA: MECANISMOS DE GRANULACIÓN

La granulación aeróbica es un proceso altamente complejo que involucra factores biológicos, químicos y físicos (Maszenan y col, 2011). Es el resultado de interacciones bióticas y abióticas entre microorganismos y partículas de lodo, resultando en el desarrollo de agregados muy compactos de forma esférica (Figura 1.11) donde las células microbianas se auto-inmovilizan en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) en ausencia de materiales de soporte. La estrecha asociación entre grupos metabólicos junto a la degradación de los contaminantes orgánicos a través de múltiples pasos da como resultado las estructuras en capas que se ven asociadas en los gránulos aeróbicos (Tay y col, 2002; Li y col, 2008), protegiendo a los microorganismos del impacto de la toxicidad aguda directa de los contaminantes presentes en los efluentes. Sin embargo, debido a que las bacterias no son propensas a agregarse naturalmente debido a las fuerzas electrostáticas de repulsión e interacciones de hidratación que existen entre ellas (Lui y Tay, 2004), para lograr la formación de gránulos se requiere la utilización de un SBR (Nancharaiah y col, 2018).



Figura 1.11: Imagen obtenida mediante microscopía óptica del lodo granuloso aeróbico (Wilén y col, 2018)

Si bien se han propuesto varios mecanismos de granulación, hasta el momento no se ha logrado un consenso respecto a un único mecanismo (Wilén y col, 2018), aunque se

Capítulo 1

conoce que estos mecanismos no necesariamente actúan solos, sino que probablemente estén involucrados simultáneamente en el mecanismo de granulación, influyendo en los procesos de manera diferente. Sin embargo, el mecanismo de granulación más aceptado es el que se describe a continuación y que ocurre en varios pasos (Liu y Tay 2002; Nancharaiah y col, 2018) que incluyen:

- I. Contacto de célula a célula por hidrodinámica, difusión, gravedad y/o fuerzas termodinámicas.
- II. Fuerzas de atracción físicas (van der Waals, cargas opuestas, fuerzas termodinámicas, hidrofobicidad) y químicas (enlaces de hidrógeno, fusión membrana celular, atracción receptora de la célula, deshidratación de la superficie celular) entre las células que conducen a la agregación (unión inicial de microorganismos para formar agregados).
- III. Maduración de los agregados microbianos formando una matriz de SPE sobre el cual las células pueden unirse y multiplicarse.
- IV. Formación de una estructura tridimensional conformada por fuerzas de corte hidrodinámicas y los microorganismos involucrados.

Dado que los gránulos aeróbicos se cultivan comúnmente a partir de flóculos, los primeros dos pasos, como el contacto de célula a célula y la unión inicial de microorganismos, no son un requisito previo para iniciar el proceso de granulación, sino que son necesarios cuando se intenta la granulación de cultivos bacterianos individuales y con crecimiento disperso (Adav y Lee, 2008). Los otros dos procesos mencionados son necesarios de forma obligatoria para la formación de gránulos debido a que son procesos que ocurren de forma constante, formando parte del crecimiento dinámico de los microorganismos, permitiendo la selección de ellos y su posterior unión y autoinmovilización (Nancharaiah y col, 2018).

La fuerza de corte hidrodinámica y el régimen de alimentación basado en condiciones alternantes de disponibilidad de carbono orgánico e inanición, son las fuerzas de activación importantes en los SBR. La fuerza de corte hidrodinámica influye en los aspectos estructurales y funcionales de las biopelículas y en la selección de las cepas agregadas en la biopelícula. Por otro lado, el tiempo de sedimentación es un parámetro relevante y ejerce una presión de selección sobre los aglomerados microbianos, permitiendo retener aquellos consorcios que al disponerse en forma agregada tienen una mayor tolerancia a distintos compuestos tóxicos (Nancharaiah y col, 2018) (Figura 1.12).

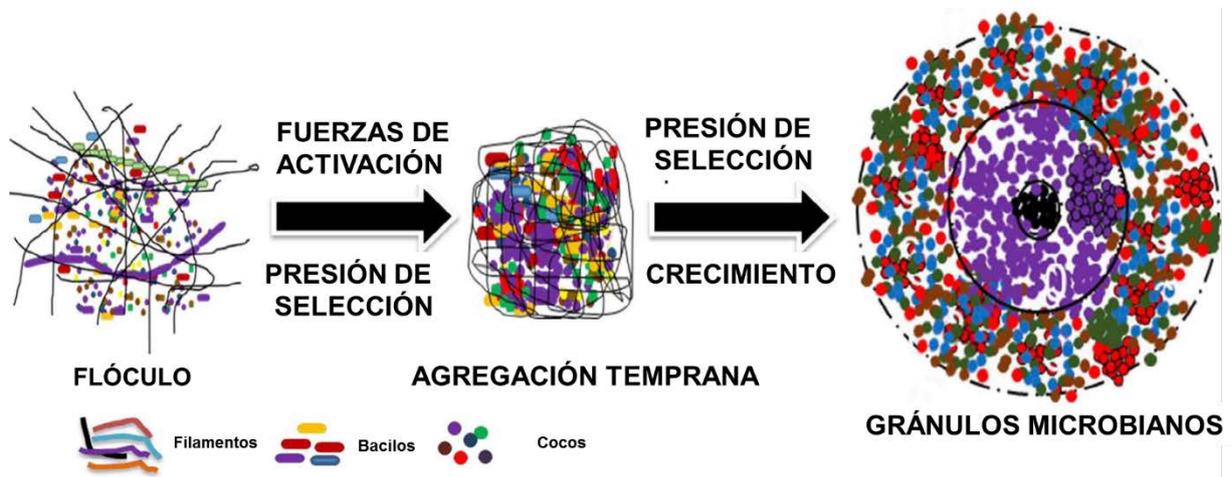


Figura 1.12: Mecanismo de formación de lodo granular aeróbico en reactores discontinuos secuenciales (Sarma y col, 2017)

Finalmente, en algunos casos se ha informado que los hongos filamentosos y los protozoos pueden ser importantes para la formación de la estructura granular, ya que podrían provocar un aumento de la superficie donde las bacterias podrían unirse (Beun y col, 1999; Weber y col, 2007). Sin embargo, cada paso en la formación de gránulos es complejo y está influenciado por diferentes mecanismos físicos, químicos y celulares.

1.5.2 Configuraciones del proceso y condiciones operativas que afectan la granulación aeróbica

El proceso de granulación es afectado por una serie de parámetros operativos que influyen en la formación y estabilidad de los gránulos (Liu y Tay, 2004). El diseño y operación del reactor pueden controlar algunos de los factores intervinientes en el proceso de granulación, como las fuerzas de cizalla hidrodinámicas, el tiempo de sedimentación, la relación de intercambio de volumen (volumen del efluente extraído en relación al volumen de trabajo total del reactor) (Wang y col, 2006) y la carga orgánica. Otros factores, como la temperatura y la composición de las aguas residuales, son más difíciles de controlar (Figura 1.13) (Wilén y col, 2018).

Capítulo 1



Figura 1.13 Ilustración esquemática de los diversos parámetros del proceso que afectan la formación de gránulos, el funcionamiento del reactor y calidad del efluente final.

1.5.2.1 Concentración de oxígeno disuelto

Los gránulos aeróbicos se pueden formar en un amplio rango de concentraciones de oxígeno disuelto (OD), que abarcan desde un nivel tan bajo como 0.7–1.0 hasta 2–7 mg L⁻¹ (Winkler y col, 2018). Sin embargo, las concentraciones de OD inferiores a 2–5 mg L⁻¹ conduce a la formación de gránulos inestables (McSwain y col, 2008; Wilén y col, 2018). El OD es un parámetro de control eficiente para la eliminación simultánea de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo debido a las fuertes limitaciones de difusión en los gránulos donde las altas concentraciones de OD conducen a una fracción aeróbica mayor y, por lo tanto, a una mayor tasa de nitrificación, mientras que las concentraciones más bajas de OD aumentan la tasa de desnitrificación. Al controlar el OD durante el ciclo en un SBR se puede lograr un efluente de elevada calidad (Pronk y col, 2015).

1.5.2.2 Temperatura

La formación de gránulos se ha descrito a diferentes temperaturas desde 8°C hasta 30°C, encontrándose algunos estudios que informan temperaturas hasta 50°C (Ab Halim y col, 2015). Sin embargo, se ha informado que la estabilidad de los agregados no es igual en todo el rango mencionado. A baja temperatura (8°C-10°C), los gránulos presentarían una forma irregular e inestabilidad con baja eficiencia de eliminación de nutrientes (de Kreuk y col, 2005; Wilén y col, 2018). Asimismo, debido a que la actividad microbiana es menor a bajas temperaturas, el OD podría penetrar en la zona interna

Capítulo 1

anóxica, dificultando los procesos de desnitrificación (de Kreuk y col, 2005). A pesar de esto, algunos reactores inoculados con biomasa granular han funcionado con una elevada eficiencia de eliminación de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo a temperaturas que rondan los 10–12°C (Jiang y col, 2016; Gonzalez-Martinez y col, 2017). A temperaturas más altas (20-50°C), se ha observado una completa remoción de nitrógeno y fósforo (Ab Halim y col, 2015).

1.5.2.3 Fuerzas hidrodinámicas, carga orgánica y régimen de alimentación

La fuerza hidrodinámica de cizalla o de corte, el régimen de alimentación basado en un período “feast” (alimentación, es decir disponibilidad de la fuente de carbono) y “famine” (inanición), el tiempo de sedimentación y la relación de intercambio volumétrico son factores de gran importancia en la operación de los SBR ya que influyen en la formación y características de los gránulos microbianos aeróbicos.

En los SBRs utilizados para la formación de biomasa granular aeróbica, la fuerza de corte se cuantifica dividiendo la velocidad de aireación sobre el área de la sección transversal del biorreactor. La misma se representa como la velocidad superficial de aire ascendente (caudal (cm^3/s) / sección transversal (cm^2) = velocidad ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)).

Inicialmente, a partir de estudios a escala de laboratorio, se ha demostrado que las velocidades superficiales de aire iguales o superiores a $1.2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ son esenciales para la formación de gránulos aeróbicos (Beun y col, 1999; Tay y col, 2001). Estos autores han señalado además que la velocidad superficial de aire favorece la producción de SPE, la hidrofobicidad de la superficie celular y la gravedad específica de la biomasa granular aeróbica. Estudios posteriores han demostrado que también es posible formar biomasa granular aeróbica utilizando una velocidad superficial de $0.8 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, pero con la particularidad que los gránulos obtenidos presentan una estructura microbiana carente de firmeza, provocando gránulos inestables (Lochmatter y Holliger, 2014). También se ha informado la formación de gránulos aeróbicos a una velocidad superficial de $0.42 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (Henriet y col, 2016) sugiriendo que el efecto de la velocidad del aire de flujo ascendente se relaciona además con otros parámetros importantes, como la carga del sustrato, para lograr un proceso de granulación adecuado. Mas recientemente se ha demostrado que la formación de gránulos aeróbicos es también posible a una baja velocidad de aire de flujo ascendente ($0.41 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) cuando se tratan aguas residuales con baja carga orgánica (300

Capítulo 1

mg DQO.L⁻¹), pero no es posible utilizar esta velocidad cuando la carga orgánica es mayor (600 o 1200 mg DQO.L⁻¹) (Devlin y col, 2017 y Nancharaiah y col, 2018).

Esto implica que, si bien los primeros estudios han demostrado que es esencial utilizar elevadas velocidades del aire de flujo ascendente para formar gránulos aeróbicos estables, posteriormente se demostró que la formación de los aglomerados es posible incluso a bajas velocidades de flujo ascendente de aire, además debe tenerse en cuenta la presencia de otros parámetros que afectan el proceso de granulación (Nancharaiah y col, 2018). En general, la fuerza de corte hidrodinámico causado por la aireación en forma de burbujas induce la producción de SPE, la hidrofobicidad de la superficie celular y desencadena interacciones célula-célula que contribuyen al inicio de la formación de gránulos. La fuerza de cizalla también actúa como una fuerza de compactación en la superficie de los agregados microbianos permitiendo dar forma a los gránulos al separar los microorganismos “suelos” de la superficie externa (Nancharaiah y col, 2018).

Además de la fuerza de cizalla es necesario considerar otros factores. Entre estos se destaca la aplicación de un régimen de alimentación dinámica aeróbica, que consiste en dos fases, una fase de degradación o fase “feast”, donde el sustrato es consumido completamente y una fase de inanición o fase “famine”, donde el sustrato externo ya no está disponible y si lo está, es en muy pequeñas cantidades. Este régimen “feast/famine” es necesario para maximizar la eliminación de carbono y favorecer la síntesis de SPE (Nancharaiah y col, 2018).

A partir de distintos estudios se ha demostrado que un régimen de alimentación “feast/famine” permite un aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana, acelerando la agregación microbiana y creando los gradientes de sustrato y oxígeno apropiados en el gránulo (Liu y Tay, 2002; Gao y col, 2011b). La alternancia de disponibilidad de carbono e inanición favorece el almacenamiento de sustancias de reserva (Adav y Lee 2008a; Liu y col, 2004; Wilén y col, 2018), provocando una disminución en la tasa de crecimiento bacteriano y permitiendo el desarrollo de los microorganismos de crecimiento lento dentro de los gránulos lo que permite obtener gránulos más compactos (de Kreuk y col, 2007b; Pronk y col, 2015). Es importante destacar que en el período “famine”, el crecimiento bacteriano surge a partir de las reservas intracelulares como lo es el glucógeno y PHA formadas durante el período “feast”. De esta forma, se requiere de un período “famine” suficiente y prolongado, después de la etapa alimentación, para

Capítulo 1

garantizar la estabilidad de los gránulos y evitar el crecimiento de bacterias filamentosas (Franca y col, 2018).

1.5.2.4 Tiempo de sedimentación y relación de intercambio volumétrico

Otro de los factores importantes es el tiempo de sedimentación, debido a que los períodos de sedimentación cortos seleccionan únicamente agregados de sedimentación rápida mientras que los flóculos de sedimentación lenta son lavados (retirados con el efluente) (Nancharaiah y col, 2018). Los tiempos de sedimentación óptimos para el desarrollo de gránulos aeróbicos se encuentran entre 2 y 10 min (Adav y col, 2008).

Por último, otros de los parámetros relevantes que se debe tener en cuenta es la relación de intercambio volumétrico. Al respecto se ha demostrado que la formación de gránulos aeróbicos es más rápida en reactores con una mayor relación de intercambio de volumen al incrementarse de 20 a 80% (Wang y col, 2006).

De esta forma se puede observar que el tiempo de sedimentación, la relación de intercambio volumétrico y el tiempo de descarga son criterios importantes para seleccionar agregados de sedimentación rápida. Liu y col, (2005) mostraron que estos tres parámetros se pueden unificar matemáticamente en una sola presión de selección unificada llamada velocidad mínima de sedimentación (V_s mínima, $m \cdot h^{-1}$). La formación de gránulos aeróbicos tiene lugar en el SBR cuando la V_s se encuentra por encima de $1 m \cdot h^{-1}$, sin embargo, la biomasa granular se convierte en el lodo dominante solo cuando se aplican valores mínimos de V_s superiores a $4 m \cdot h^{-1}$ (Nancharaiah y col, 2018).

1.5.2.5 Presencia de metales

La alimentación de un SBR con metales (Ca^{2+} , Mg^{2+} y hierro cerivalente) en las aguas residuales sintéticas disminuye el tiempo necesario para la formación de gránulos aeróbicos (Sarma y col, 2017). Los metales pueden promover la granulación aeróbica a partir de diferentes mecanismos:

- I. Facilitando la unión (auto y co-agregación) entre microorganismos al disminuir o neutralizar las cargas negativas en la superficie de la célula microbiana.
- II. Promoviendo la producción de SPE.
- III. Actuando como un núcleo para la unión bacteriana con el fin de formar agregados.
- IV. Permitiendo la formación de estructuras microbianas más compactas y densas.

Capítulo 1

En síntesis, los cationes metálicos ayudan en la agregación microbiana y la formación de gránulos, incrementando la estabilidad de estos agregados a partir de una mayor producción de SPE e interacciones de estas sustancias con el metal (Ye y col, 2017).

1.5.2.6 Configuración del SBR granular

Los gránulos aeróbicos son típicamente formados en reactores tipo columna con flujo ascendente y alta relación altura-diámetro (A/D). Se han recomendado relaciones A/D entre 5 y 20 (Luo y col, 2014, De Sanctis y col, 2013). En los reactores de columna de burbujeo (Figura 1.14) se puede crear un flujo circular relativamente homogéneo y un vórtice localizado a lo largo del eje principal del reactor; bajo estas condiciones, los agregados microbianos están sometidos constantemente a un desgaste hidráulico. El flujo circular aparentemente forzaría a los agregados microbianos a adoptar una forma granular regular donde tengan en la superficie una mínima energía libre (Liu y Tay, 2004). En reactores de columna con flujo ascendente y alta relación A/D se puede asegurar una trayectoria de flujo circular más larga haciendo más efectivos los fenómenos de roce (Liu y Tay, 2004) y por lo tanto favoreciendo la agregación microbiana. A diferencia de estos sistemas, en los reactores de mezcla completa, los agregados se mueven en todas direcciones por lo que están sometidos a colisiones al azar, debido a las diferentes trayectorias de flujo de aire y variaciones en la fuerza de corte, produciendo como consecuencia la formación de flóculos irregulares (Liu y Tay, 2002).

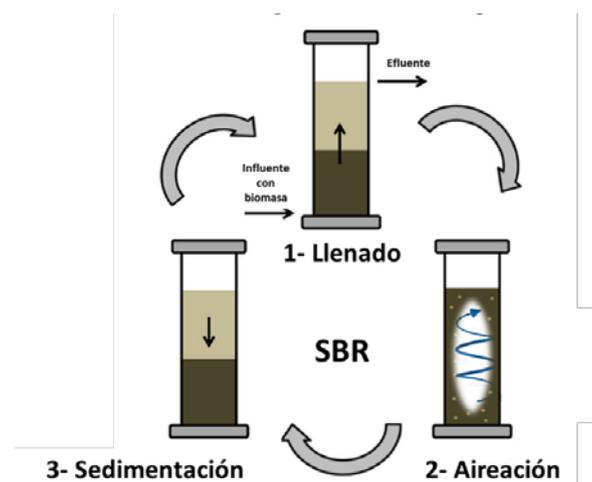


Figura 1.14: Esquema de un reactor discontinuo secuencial de columna con flujo ascendente (Wagner y col, 2002)

Capítulo 1

1.5.2.7 Tiempo de retención hidráulica (TRH) y duración de ciclo

El tiempo de retención hidráulica (TRH) es el tiempo promedio que un volumen elemental de agua residual permanece en un tanque (reactor), desde la entrada hasta la salida. El TRH en el reactor define el tiempo promedio durante el cual el sustrato orgánico oxidable está sometido a tratamiento (Orozco, 2005).

Como se explicó anteriormente, durante la granulación, la biomasa dispersa es lavada, mientras que los gránulos pesados son retenidos en el reactor. La duración de un ciclo en un SBR representa la frecuencia de descarga de sólidos en el efluente de salida, mejor conocida como frecuencia de lavado, la cual está relacionada con el TRH. Estudios han demostrado que se debe seleccionar criteriosamente un TRH adecuado para optimizar el rendimiento del reactor (Fang y Yu, 2001). El TRH ejerce una profunda influencia en las condiciones hidráulicas y el tiempo de contacto entre los diferentes sustratos y compuestos dentro del reactor (Rosman y col, 2014).

Se ha determinado que los rangos óptimos del TRH para sistemas granulares deben ser lo suficientemente cortos como para suprimir el crecimiento de lodos suspendidos y favorecer el crecimiento del lodo granular, y lo suficientemente largos como para evitar la pérdida extrema de lodo como resultado del lavado hidráulico en el reactor. Pan y col, (2004) cultivaron gránulos aeróbicos a cuatro TRH diferentes (2, 6, 12 y 24 h) e informaron que el rango óptimo de presión de selección hidráulica para la formación y retención de gránulos aeróbicos en el reactor estuvo entre 2 y 12 hs, obteniéndose mejores resultados (mayor hidrofobicidad celular) a las 6 horas. Este rango es consistente con los hallazgos para otros sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales (Hulshoff Pol 1989; Tijhuis y col, 1994; O'Flaherty y col, 1997). La TRH regula la presión de selección hidráulica para elegir preferentemente células microbianas que sean más hidrófobas y que tengan una mejor producción de polisacáridos. Dichas estrategias de supervivencia microbiana permiten que las células se agreguen en gránulos y evitan el lavado hidráulico (Tay y col, 2004).

1.5.2.8 Tiempo de residencia celular (TRC)

El tiempo de residencia celular (TRC) es un parámetro importante que indica la edad del lodo, se puede expresar como el cociente entre la biomasa total en el reactor y la biomasa que sale del reactor por unidad de tiempo (Winkler y col, 2013). Sintéticamente,

Capítulo 1

se define como el tiempo promedio que las partículas de biomasa permanecen en el reactor antes de ser desechadas (Orozco, 2005).

El TRC se utiliza tradicionalmente en el diseño y operación de sistemas de remoción biológica de nutrientes (RBN) (Ekama, 2010). Este parámetro operacional (TRC) tiene gran influencia sobre el desarrollo de unas u otras poblaciones de microorganismos, de forma que debe ser adecuado para asegurar el crecimiento de los distintos tipos de organismos que constituyen la biomasa granular. Se ha informado que, para formar gránulos aeróbicos estables, el TRC se encuentra entre 4-20 días (Zhu y col, 2013).

1.5.3 Rol de las SPE en la formación y estabilidad de los gránulos aeróbicos

Las SPE son un componente importante para la formación de gránulos aeróbicos debido a que juegan un papel relevante en la agregación de microorganismos y la estabilidad estructural. Tanto la microscopía in situ como el análisis químico ex situ revelaron que las concentraciones y la distribución de los componentes de SPE, como proteínas y polisacáridos, son diferentes entre los lodos activados y los gránulos aeróbicos (McSwain y col, 2005; Seviour y col, 2010). McSwain y col, (2005) observaron que el contenido proteico es 50% veces mayor en las SPE de los gránulos aeróbicos. Asimismo, se ha observado a partir de estudios llevados a cabo mediante el uso de fluoróforos específicos y microscopía confocal de escaneo láser que las células microbianas y los polisacáridos se distribuyen principalmente en la zona exterior de los gránulos, mientras que el centro, que carece de células, está compuesto principalmente de proteínas (Figura 1.15). Estas características, sumado a la identificación de que β -polisacáridos no solubles ubicados en el borde exterior de los gránulos aeróbicos proporcionarían una fuerza cohesiva (Hu y col, 2005), permitieron conjeturar que la presencia de un núcleo proteico en el centro juegue un papel relevante en la formación y estabilidad de los gránulos (McSwain y col, 2005).

También es conocido que las SPE extraídas de los gránulos presentan un poder de adhesión mayor que las extraídas de los lodos activados (Seviour y col, 2010) y que los gránulos aeróbicos a diferencia de los lodos activados pueden presentar polisacáridos y proteínas con carga negativa (Seviour y col, 2012). De esta forma, se evidencia que las condiciones de operación del biorreactor no solo promueven la producción de SPE, sino que también inducen cambios de composición de estas sustancias que a su vez facilitan la agregación microbiana, permitiendo la granulación.

Capítulo 1

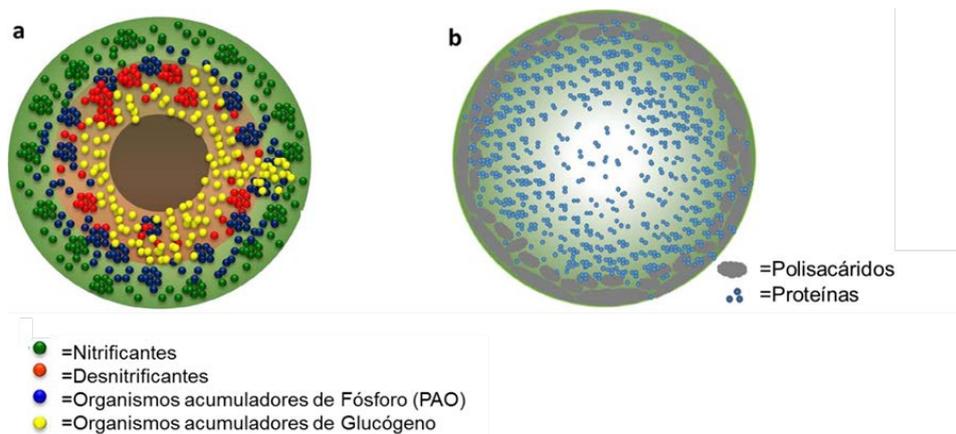


Figura 1.15: Representación gráfica de la distribución de (a) microorganismos, (b) carbohidratos y proteínas de la matriz SPE de un gránulo aeróbico (McSwain y col, 2005; Nancharaiyah, y col, 2018)

1.5.4 Estabilidad, composición y estratificación microbiana de los gránulos

Dentro del gránulo, los microorganismos compiten por sustratos, pero también por espacio para crecer. La difusión de sustratos y oxígeno disuelto crea diferentes zonas dentro del gránulo: zonas aeróbicas en la superficie externa donde crecen microorganismos heterótrofos y filamentos de rápido crecimiento y zonas anóxicas y anaeróbicas que se encuentran hacia el centro del gránulo. Los canales (dentro del gránulo), que pueden contribuir a una mejor difusión, pueden obstruirse debido a partículas y coloides en las aguas residuales como así también a la producción de SPE (Zheng y Yu 2007). Las condiciones de inanición sumado a las condiciones anaeróbicas dentro del gránulo, específicamente en el centro, conducen a la necesidad de las células de respirar de forma endógena y también dan lugar a procesos de lisis celular, provocando cavidades huecas y finalmente la desintegración de los gránulos (Franca y col, 2018).

Los microorganismos crecen tanto en la superficie como dentro del gránulo y esto conducirá a diferencias en tamaño y estructura. Las bacterias no se distribuyen por igual dentro de los gránulos, ya que algunas son más abundantes en las capas externas del gránulo y otras en el interior (de Kreuk y van Loosdrecht, 2005). La selección microbiana actúa mediante los siguientes parámetros operativos: tipo de sustrato, la carga orgánica, la relación A/M, la relación DQO/N, el tiempo de retención de sólidos, el tiempo de sedimentación y las condiciones redox. Se ha estudiado la estructura de la comunidad

Capítulo 1

microbiana en diferentes sistemas granulares y se ha encontrado que la composición difiere cuando se suministran diferentes fuentes de carbono (Maszenan y col, 2011; Wilén y col, 2018).

Se ha afirmado que los gránulos aeróbicos presentan una mayor diversidad microbiana a nivel de filo o clase que el lodo floculante, debido a que los gradientes de sustrato creados dentro del agregado proporcionan más nichos ecológicos (Guo y col, 2011; Winkler y col, 2012). El desarrollo en el tamaño de los gránulos depende de las interacciones de diferentes parámetros ambientales, las cuales son complejas y difíciles de controlar. Los gránulos alcanzan un cierto tamaño determinado en términos generales por el equilibrio entre el crecimiento, el desgaste y la rotura del gránulo, que es una consecuencia de las condiciones operativas del proceso, como la fuerza de cizalla o corte (Verawaty y col, 2013).

En la Figura 1.16 se presenta la estructura granular modelo considerando a los gránulos como una esfera multicapa con gradientes decrecientes de oxígeno y sustrato desde el exterior hasta el centro del gránulo. De acuerdo con este modelo y en términos generales, las bacterias nitrificantes se ubican en las capas externas penetradas por el oxígeno, mientras que las bacterias desnitrificantes y los organismos acumuladores de fosfato (PAO) se ubican en las capas internas (Winkler y col, 2012; de Kreuk y col, 2007).

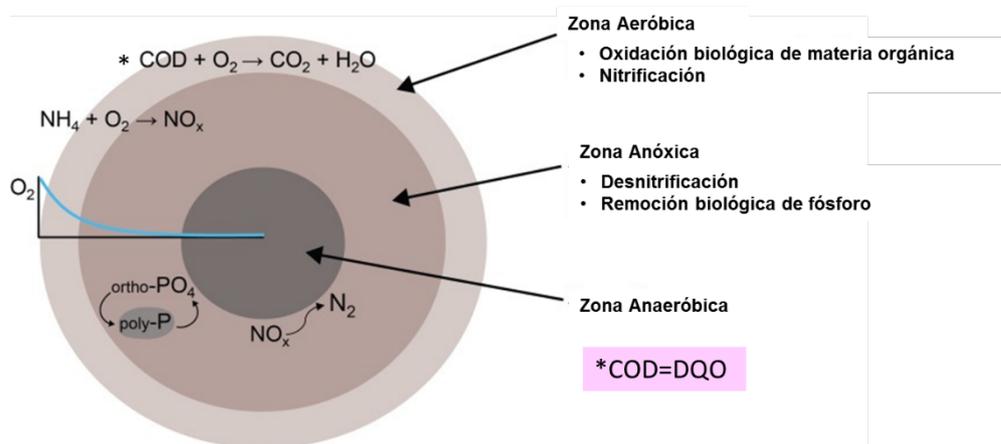


Figura 1.16: Esquema de un gránulo aeróbico con los diferentes procesos de conversión para materia orgánica, nitrógeno y fósforo, que tienen lugar dentro de las diferentes zonas redox (Wilén y col, 2018)

Otros estudios han demostrado la existencia de una estratificación microbiana en sistemas granulares, alimentados con agua residual de baja carga orgánica, presentando

Capítulo 1

remoción de DQO y nitrógeno. En este sistema, las BOA dominaban la capa externa, mientras que las BON y las bacterias desnitrificantes se encontraban en las zonas internas (Guimarães y col, 2017). También se demostró la existencia de microorganismos nitrificantes tanto en la superficie como en el interior del gránulo y en los canales internos del mismo, detectados mediante la utilización de técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH) y microscopía confocal de escaneo láser (Szabó y col, 2017b).

1.5.5 Aplicaciones del SBR de lodo granular en el tratamiento de efluentes

Los reactores con biomasa granular aeróbica ofrecen la posibilidad de eliminar carbono orgánico, nitrógeno (N), fósforo (P) y diferentes contaminantes prioritarios como es el fenol (Wilén y col, 2018).

1.5.5.1 Nitrificación y Desnitrificación Simultánea (NDS)

La eliminación convencional de nitrógeno en SBR operando con lodos activados requiere de condiciones aeróbicas y anaeróbicas/anóxicas para la nitrificación de amonio como para la desnitrificación de nitrato o nitrito, respectivamente. Por lo tanto, se requiere la integración de períodos con distintas concentraciones de OD (altas y bajas) para lograr la eliminación completa de este nutriente (Motlagh, y Goel, 2014).

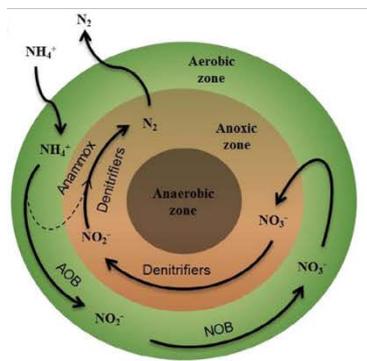
En los gránulos es posible la presencia de diferentes condiciones redox en un solo gránulo haciendo posible que ocurran procesos de nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS) bajo las mismas condiciones en el reactor (Nancharaiah y col, 2016; Coma y col, 2012; Nancharaiah y col, 2018). Para esto es importante controlar la concentración de OD, la cual debe ser lo suficientemente alta como para mantener la nitrificación en la capa externa y lo suficientemente baja para evitar que el oxígeno penetre en las partes anóxicas más profundas del gránulo donde puede tener lugar la desnitrificación. Esto permite la coexistencia de regiones aeróbicas y anóxicas (Figura 1.16 y 1.17).

Los parámetros que pueden influir en los procesos de NDS incluyen tal como se mencionó recientemente la concentración de OD en el licor de mezcla, pero además el tamaño del gránulo, la disponibilidad de donantes de electrones y la actividad microbiana (Coma y col, 2012). La elevada concentración de OD en el licor de mezcla favorece la nitrificación, pero puede limitar la desnitrificación (Nancharaiah y col, 2018).

Capítulo 1

El nivel estricto de OD es uno de los principales parámetros de control de difusión para regular los procesos de desnitrificación-nitrificación simultánea en sistemas granulares (Hocaoglu y col, 2011). Algunos estudios han informado que valores por debajo de 4 mg.L^{-1} de OD en el agua residual generan zonas anóxicas dentro de los gránulos y, por lo tanto, aumentan la NDS (Layer y col, 2020).

Para un proceso eficiente de NDS, el material orgánico debe ser consumido y almacenado como poli- β -hidroxibutirato (reserva de carbono) para su posterior uso como fuente de carbono por los microorganismos desnitrificantes (Beun y col, 2001).



Diferentes conversiones biológicas ocurren en diferentes capas o zonas de un gránulo aeróbico formado en el SBR.

- **Zonas externas:** Microorganismos nitrificantes debido a la presencia de elevadas concentraciones de OD (regiones aeróbicas)
- **Zonas internas:** Microorganismos desnitrificantes y organismos acumuladores de fósforo (PAOs) (regiones anóxicas/anaeróbicas).
- **Zonas con microambientes anóxicos/anaeróbicos:** también ocupadas por organismos acumuladores de glucógeno.
- Diferentes concentraciones de SPE se han observado en los gránulos

Figura 1.17: Vías de eliminación de nitrógeno en un gránulo aeróbico individual (Winkler y col, 2015).

La relación DQO:N es otro de los parámetros de mayor relevancia para un proceso de NDS eficiente, ya que ejerce una presión de selección sobre la comunidad microbiana favoreciendo el enriquecimiento de microorganismos heterótrofos o bacterias nitrificantes. Se ha demostrado que altos valores de DQO:N, entre 7.5 y 30, permiten la formación de gránulos grandes y esponjosos que favorecen el crecimiento de los microorganismos heterótrofos, mientras que relaciones DQO:N más bajas (2-5) conducen a la formación de gránulos más pequeños y densos con microorganismos nitrificantes que presentan una baja velocidad de crecimiento (Kocaturk y Erguder, 2015). Similares resultados fueron informados por Liu y col, (2004) estudiando el desarrollo de bacterias nitrificantes bajo diferentes relaciones DQO:N (3-20), estos autores informaron que las relaciones más bajas dieron lugar a la formación de gránulos más pequeños y más compactos enriquecidos en nitrificantes. Wei y col, (2014) trabajando con aguas residuales sintéticas ricas en amonio obtuvieron una mayor remoción de nitrógeno con una relación DQO:N de 9.

Capítulo 1

Por otro lado, estudios realizados en reactores en columna con biomasa granular aeróbica indicaron que es posible llevar a cabo procesos de desnitrificación de nitrato de forma exitosa, ya sea a partir de dicho compuesto presente en el agua residual o bien formado mediante el proceso de nitrificación, utilizando acetato como donante de electrones (Suja y col, 2015).

1.5.5.2 Nitrificación heterótrofa y desnitrificación aeróbica (NHDA)

Hace pocos años, numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de bacterias con capacidad de nitrificación heterotrófica y desnitrificación aeróbica (BNHDA) en el tratamiento de aguas residuales nitrogenadas (Chen y col, 2014; He y col, 2016; Dong y col, 2019). Se descubrió que gran mayoría de las BNHDA pueden presentar un metabolismo activo a bajas temperaturas (Tan y col, 2020).

La mayoría de las BNHDA requieren de una fuente de carbono orgánico oxidable para su óptimo crecimiento como donante de electrones para completar el proceso de desnitrificación en condiciones aeróbicas. Sin embargo, hasta el momento no hay demasiada información que respalde la eliminación de nitrógeno mediante BNHDA a partir de diferentes relaciones C/N (Tan y col, 2020).

Estos microorganismos, debido a su alta tasa de crecimiento y su capacidad para convertir amoníaco en nitrógeno gaseoso aeróbicamente, tienen muchas ventajas para la eliminación de nitrógeno: (i) la simplicidad de proceso donde la nitrificación y desnitrificación pueden tener lugar en un solo proceso; (ii) menor dificultad de aclimatación; y (iii) un menor requerimiento de buffer debido a que la alcalinidad generada durante la desnitrificación puede compensar en parte el consumo de alcalinidad en la nitrificación (Yao y col, 2013).

Además, en la desnitrificación, los polímeros sintéticos biodegradables, como el ácido poli-3-hidroxibutírico (PHB), son utilizados como fuentes de carbono externas, permitiendo una elevada eficiencia de este proceso y una liberación mucho menor de carbono orgánico disuelto que fuentes de carbono natural. Sin embargo, cabe destacar que su uso es bastante costoso (Hiraishi y Khan 2003). Es por este motivo que es de gran importancia la elección correcta de una fuente de carbono que sea tanto económica como adecuada para una reducción eficiente de nitrógeno (Rajta y col, 2019).

Cabe destacar que si bien este proceso se encuentra basado en BNHDA, ya que la mayoría de los microorganismos heterótrofos nitrificantes tienen la capacidad de

Capítulo 1

desnitrificar aeróbicamente (Rajta y col, 2019), otros sólo presentan la capacidad nitrificante (Srivastava y col, 2016). Además, otros microorganismos tienen la capacidad de desnitrificar aeróbicamente, denominados desnitrificantes aeróbicos, pudiendo intervenir en el proceso NHDA (Ye y col, 2017).

1.5.5.3 Tratamiento de efluentes lácteos

Con el rápido crecimiento de las industrias, la contaminación de ambientes acuáticos por los desechos industriales ha aumentado enormemente (Muthusamy y Jayabalan, 2001). La industria láctea es considerada una de las industrias más importantes que causa la contaminación de cuerpos de agua.

El agua juega un papel clave en el procesamiento de la leche debido a que se utiliza en cada paso de las líneas tecnológicas, incluidas la limpieza y el lavado, la desinfección, la calefacción y la refrigeración (Sarkar y col, 2006). La mayor parte de las aguas residuales de la industria láctea proviene del proceso de fabricación de los diferentes productos. Se ha estimado que la cantidad de aguas residuales es aproximadamente 2.5 veces mayor que el volumen de la leche procesada. En las plantas lecheras, las grandes fluctuaciones en la calidad y cantidad de las aguas residuales son muy problemáticas porque cada producto lácteo necesita una línea tecnológica separada (Carvalho y col, 2013; Karadag y col, 2015). Esto da como resultado el cambio de la composición del efluente lácteo con el inicio de un nuevo ciclo en el proceso de fabricación, que afecta el funcionamiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales en fábrica (Slavov, 2017). La concentración de contaminantes en los efluentes lácteos varía ampliamente según el perfil y la capacidad de la empresa, la tecnología de producción, el equipo utilizado, el grado de reutilización de aguas residuales, la pérdida de materias primas, la gestión de residuos, etc. (Slavov, 2017). Los efluentes del procesamiento de productos lácteos incluyen principalmente: leche o productos lácteos perdidos en los ciclos tecnológicos (leche derramada, leche en mal estado, leche desnatada y trozos de cuajada), cultivos iniciadores utilizados en la fabricación, subproductos de las operaciones de procesamiento (suero, leche y suero permeado), contaminantes del lavado de camiones de leche, tanques, latas, equipos, botellas y pisos, reactivos aplicados en procedimientos de limpieza, enfriamiento de leche y subproductos del proceso productivo lácteo, daños en equipos o problemas operativos y diversos aditivos introducidos en la fabricación (Slavov, 2017). La mayoría de estos contaminantes contribuyen en gran medida a la alta DBO y

Capítulo 1

DQO (Muthusamy y Jayabalan, 2001). Tal como se mencionó, los efluentes lácteos contienen principalmente desechos orgánicos, por lo que la degradación biológica es la opción más prometedora para la eliminación de material orgánico. Los métodos de tratamiento de aguas residuales lácteas suelen involucrar procesos biológicos como el proceso de lodos activados, el reactor discontinuo secuencial (SBR), los filtros percoladores, los filtros anaeróbicos, las lagunas aireadas y el reactor anaeróbico de flujo ascendente (UASB) (Demirel y col, 2005).

Si bien los procesos anaeróbicos son ampliamente utilizados para el tratamiento de aguas residuales lácteas, presentan algunas desventajas (Tchobanoglous y Burton, 2003). Las grasas de las aguas residuales de la industria láctea tienen una acción inhibitoria sobre los procesos anaeróbicos y pueden producirse problemas operativos como la formación de espuma, la flotación de lodos y la pérdida de la eficiencia de eliminación de DQO (Cammarota y col, 2001). Asimismo, en la digestión anaerobia están involucrados varios grupos microbianos con diferentes tasas de crecimiento, por lo tanto, los procesos principales, acidogénesis y metanogénesis, no están comúnmente en equilibrio, conduciendo a una menor formación de metano y fallas relevantes en el proceso (Hassan y col, 2012). Por ende, el tratamiento anaeróbico de los efluentes lácteos requiere comúnmente un postratamiento aeróbico para cumplir con los límites de descarga de los efluentes (Alayu y col, 2018).

Los sistemas granulares aeróbicos han sido evaluados para el tratamiento de diferentes aguas residuales provenientes de industrias textiles (Lotito y col, 2014), lácteas (Bumbac y col, 2015), mataderos, ganado, bodegas, molinos de aceite de palma, lixiviados de vertederos y cervecerías (Corsino y col, 2017).

1.5.5.4 Tratamiento de efluentes industriales tóxicos: biodegradación de compuestos fenólicos

Tal como se ha mencionado anteriormente, los sistemas convencionales de tratamiento de lodos activados son ineficaces para eliminar compuestos xenobióticos tóxicos o recalcitrantes de las aguas residuales derivadas de actividades industriales (Nancharaiah y col, 2018). Asimismo, se ha demostrado que los sistemas celulares inmovilizados ofrecen un mejor tratamiento al retener altas concentraciones de biomasa (cepas degradantes) y exhibir una mayor tolerancia a los xenobióticos tóxicos. El SBR con biomasa granular aeróbica es efectivo para la remoción de contaminantes tóxicos como el

Capítulo 1

fenol o mezcla de compuestos fenólicos. Al respecto, se ha logrado eficiente biodegradación de compuestos fenólicos en aguas residuales que contenían concentraciones de hasta 1000 mg.L^{-1} de fenol (Adav y col, 2007; Jiang y col, 2004).

Wosman y col, (2016) estudiaron dos estrategias de aclimatación distintas (únicamente con fenol o combinación entre fenol y acetato) para adaptar el lodo activado a una elevada concentración de fenol, proceso sujeto posteriormente al proceso de granulación aeróbica.

Numerosas industrias descargan efluentes con elevadas concentraciones de nitrógeno y fenol, que causan un grave deterioro al medio ambiente si se eliminan sin un tratamiento previo (Jia y col, 2014). Entre estas se destacan las aguas residuales de gasificación de carbón (Xu y col, 2016), refinerías (Rezakazemi y col, 2018), petroquímicas, industrias de producción de aceros (Ghanavati y col, 2008) entre otras importantes.

Actualmente, a pesar que hay pocos trabajos de investigación acerca de la remoción conjunta de contaminantes como nitrógeno y fenol en efluentes industriales utilizando la tecnología de granulación aeróbica en SBR, se destaca la importancia y potencial que presenta el uso del SBR para la eliminación simultánea de compuestos fenólicos y nitrógeno a través de la oxidación aeróbica de amoníaco y la desnitrificación anóxica con fenol como fuente de carbono orgánico (Liu y col, 2017).

1.5.5.5 Recuperación de recursos y gestión del exceso de lodos

El exceso de lodo formado durante el tratamiento de las aguas residuales debe ser gestionado de manera segura con el fin de implementar prácticas sostenibles de aguas residuales (Nancharaiah y col, 2018). Si bien existen diferentes opciones para el manejo del exceso de lodo, dos de ellas (uso de lodo granular en exceso como adsorbentes de bajo costo y producción y recuperación de productos de base biológica como polihidroxibutirato y exopolímeros similares a alginato) son prometedoras para la gestión de lodos en plantas de tratamiento de aguas residuales basadas en sistemas granulares aeróbicos (Nancharaiah y col, 2018).

El PHB es un plástico biodegradable que se puede producir como gránulos intracelulares en microorganismos. Para disminuir costos de producción, las aguas residuales se han utilizado para desarrollar cultivos granulares aeróbicos mixtos productores de PHB (Wang y col, 2014a, b). Los estudios han demostrado que el contenido de PHB se puede aumentar hasta un 40% en sistemas granulares aeróbicos

Capítulo 1

alimentados con acetato mediante condiciones limitantes de nitrógeno sin comprometer las propiedades de sedimentación (Wang y col, 2014a, b).

El alto contenido de SPE de los sistemas granulares aeróbicos está recibiendo atención para explorar la utilidad potencial en aplicaciones comerciales (Nancharaiah y col, 2018).

1.5.6 Beneficios del sistema SBR granular en efluentes industriales

Debido a que los SBR son reactores compactos y presentan una elevada eficiencia en la remoción conjunta de DQO, DBO y nitrógeno (Wilén y col, 2018), son muy atractivos y cada vez más frecuentes para el tratamiento de aguas residuales de diferentes industrias y más aún de aquellas industrias que no poseen suficiente espacio para tener tanques de tratamientos convencionales (Khursheed y col, 2018). El proceso SBR, como una forma mejorada del sistema de tratamiento convencional, presenta las siguientes ventajas: gran flexibilidad para el tratamiento de diferentes efluentes, precisión y versatilidad en el funcionamiento, una interacción más baja del operador, facilidad para la recolección de datos en línea mediante la utilización de sensores, menores costos de capital en aspectos constructivos, una alternativa para ambientes aeróbicos y anaeróbicos en el mismo tanque, una excelente interacción de oxígeno entre microorganismos y sustratos, una mayor eficiencia de eliminación de contaminantes como nitrógeno y fenol y el requerimiento de menor aporte de energía (Wang y col, 2015).

Estos beneficios aseguran el gran interés en la utilización del proceso SBR para el tratamiento de aguas residuales tanto municipales como industriales (Yang y col, 2018).

Asimismo, la regulación de las fases anóxicas y aeróbicas durante el proceso SBR puede enriquecer la población microbiana y mejorar la eficacia del proceso. Diferentes industrias pueden utilizar esta tecnología ya que la duración de las fases, la concentración de oxígeno disuelto y las condiciones de mezcla pueden modificarse de acuerdo con los requisitos particulares de las plantas de tratamiento y los efluentes a tratar (Chang y col, 2009; Alagha y col, 2020).

La tecnología granular aeróbica presenta varias ventajas en comparación con los procesos de lodos activados. Estas incluyen la utilización de un único reactor donde suceden todos los procesos biológicos, buena retención de biomasa, capacidad de soportar el impacto de cargas tóxicas, y la presencia de zonas aeróbicas y anóxicas dentro de los gránulos que puede permitir simultáneamente la ocurrencia de diferentes procesos

Capítulo 1

biológicos (Gautam y col, 2019). Esta tecnología ofrece una gran versatilidad en términos del control e implementación de diferentes fases de los procesos de nitrificación y desnitrificación biológica. Varios estudios han informado y demostrado la efectividad de la tecnología del SBR y su aplicación como alternativa al sistema convencional de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales, especialmente para el uso de caudales menores (Gautam y col, 2019).

1.6 SECUENCIACIÓN MASIVA

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares para la investigación de la comunidad microbiana en sistemas de aguas residuales, lo que ha permitido la identificación de actores clave en procesos como la nitrificación y desnitrificación. Un avance muy relevante ha sido el uso de la secuenciación masiva de alto rendimiento (en inglés NGS, Next-generation sequencing), utilizando secuenciadores HiSeq, NextSeq, NovaSeq y MiniSeq que ha suplantado al tradicional método de secuenciación Sanger (Vanwonderghem y col, 2014).

Esta nueva tecnología, además de reducir los costos y el tiempo de análisis, genera una gran cantidad de información que está cambiando el modo investigar en microbiología y demanda, en gran medida, la aplicación de la bioinformática en el diagnóstico y el análisis microbiológico (Vanwonderghem y col, 2014). La bioinformática aplica las matemáticas, la estadística y la computación al estudio biológico, por tanto, requiere de conocimientos básicos en lenguajes de programación (Python y R, entre otros) y, preferentemente, también en el uso de sistemas operativos basados en UNIX, como por ejemplo Linux y de ciertas terminales (plataformas) bioinformáticas de tal forma que se concentre todo el potencial de la computadora en la tarea que se quiera realizar. Cabe destacar que la variedad y cantidad de programas informáticos que proporcionan una interfaz gráfica son limitados y le restan poder computacional al desarrollarla, por lo que se vuelve necesario el uso de programas ejecutados desde la terminal elegida (Hernandez y col, 2019).

1.6.1 Secuenciación masiva de la microbiota

La secuenciación masiva aplicada a la microbiología se puede llevar a cabo a partir de la secuenciación de pequeños fragmentos del ácido desoxirribonucleico (ADN) o

Capítulo 1

amplicones previamente amplificados denominados “targeted sequencing”, o bien secuenciando todo el ADN previamente fragmentado de forma aleatoria lo cual es llamado “shot-gun sequencing”. La aproximación de “targeted sequencing” permite obtener la composición microbiana de cada muestra en los genes ARNr 16S y 18S. Mediante “shot-gun sequencing” puede obtenerse mayor información como lo es el genoma completo de una bacteria, lo cual es una tarea sumamente compleja y en algunos casos imposible debido a la corta longitud de las secuencias generadas por algunas plataformas de secuenciación, por lo que las lecturas (secuencias) se ensamblan en un “borrador del genoma” formado por un número de fragmentos más grandes, mediante un proceso de ensamblado de las lecturas secuenciadas (de novo). Así es como el conocimiento del genoma facilita la detección de diferencias entre genomas (Hernandez y col, 2019).

La mayoría de los métodos de ecología bacteriana se basan en la secuenciación, en concreto, del gen que codifica la subunidad menor del ribosoma 16S (16S ARNr). El tamaño de este gen es de aproximadamente 1540 pares de bases, dependiendo de la especie bacteriana, y está formado por 9 regiones hipervariables (V1 a V9) y regiones altamente conservadas. Sobre esta base se han definido numerosas combinaciones de primers o cebadores (Caporaso y col, 2011; Klindworth y col, 2013) que permiten amplificar un fragmento del ADN de forma inespecífica en todas las especies bacterianas, pero a su vez permite la identificación inequívoca de cualquier bacteria, debido a que la secuenciación de la región interna es característica de cada especie (Hernandez y col, 2019). En la secuenciación masiva se logra la mezcla de amplicones (al contrario de la secuenciación Sanger que requería cromatogramas puros), debido a que esta tecnología individualiza la lectura de cada amplicón (Hernandez y col, 2019).

Sintéticamente el estudio microbiológico molecular de la microbiota mediante NGS consiste en la coamplificación de una región del gen 16S ARNr. Estos fragmentos amplificados, una vez secuenciados, permiten caracterizar la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas, con la posibilidad de identificar gran cantidad de especies de una muestra (Callahan y col, 2017). La asignación de filo, clase, orden, familia, género o especie se realiza por comparación con bases de datos como Greengenes entre otras (Page y col, 2015), o bien realizando un alineamiento empleando la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la base de datos del NCBI (Federhen y col, 2012). Mediante este estudio además de obtener la caracterización de la composición taxonómica, se puede estudiar la abundancia relativa de las poblaciones microbianas de una muestra. La

Capítulo 1

secuenciación masiva permite el análisis ecológico de la microbiota mediante secuenciación de amplicones, pero también permite el análisis mediante la secuenciación completa de todos los genomas, es decir, del metagenoma. Esto implica mayor costo y requiere un análisis más complejo y detallado (Hernandez y col, 2019).

1.7 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo de investigación consistió en desarrollar un proceso de tratamiento biológico de efluentes de fácil operación, eficiente y confiable para la remoción conjunta de carbono orgánico y nitrógeno, mediante el uso de un SBR con biomasa granular operado con una única etapa de reacción aeróbica. Se trabajó con tres tipos de efluentes con diferentes niveles de biodegradabilidad y toxicidad: a- un efluente de fácil biodegradación, a base de acetato de sodio y amonio, b- un efluente más complejo, basado en suero de queso suplementado con amonio, conteniendo carbono orgánico y nitrógeno en forma soluble y particulada, c- un efluente tóxico conteniendo básicamente fenol y amonio.

Los objetivos específicos son planteados a continuación:

1. Estudiar y optimizar los parámetros operativos (TRC, caudal volumétrico y superficial de aire, tiempo de sedimentación, pH) del SBR para lograr un adecuado proceso de granulación de la biomasa.
2. Estudiar los procesos de remoción conjunta de carbono orgánico y nitrógeno a partir de los diferentes efluentes previamente mencionados (efluente con acetato de sodio, con fenol y lácteo).
3. Estudiar la remoción simultánea de carbono orgánico y nitrógeno en los sistemas granulares aeróbicos (SBRs) bajo régimen “feast/famine”, considerando diferentes aspectos, entre los que se destacan, estabilidad granular, procesos de remoción biológicos, monitoreo del sistema, relación DQO:NTK.
4. Estudiar la diversidad de la comunidad microbiana mediante secuenciación por ILLUMINA (tecnología NGS) y su posterior análisis mediante la utilización de técnicas bioinformáticas.
5. Relacionar la composición microbiana de los SBRs estudiadas, con los procesos biológicos de cada condición operativa. Asimismo, en base a KO (grupos ortólogos) detectados por estudios bioinformáticos, se propone determinar los géneros más

Capítulo 1

representativos en cada estudio que podrían participar en las rutas metabólicas de los procesos biológicos potenciales.

1.8 CONTENIDOS

A continuación, se presentan los contenidos de los diferentes Capítulos que fueron desarrollados para cumplir con los objetivos propuestos y citados anteriormente.

- En el **capítulo 1** se desarrolló el marco teórico encuadrado como introducción, con las temáticas principales llevadas a cabo al largo de este trabajo de investigación, fundamentada en una profunda búsqueda bibliográfica hasta el momento.

- En el **capítulo 2** se exponen los materiales y métodos generales utilizados en la realización del presente trabajo de Tesis.

- En el **capítulo 3** se exponen los resultados correspondientes al proceso de granulación del lodo activado en el SBR, el estudio de su estabilidad y la remoción conjunta de acetato de sodio y amonio.

- En el **capítulo 4** se informan los resultados obtenidos en relación al estudio de la comunidad microbiana y determinación de vías metabólicas de remoción de nitrógeno, mediante análisis bioinformático, del SBR operado con acetato de sodio y amonio.

- En el **capítulo 5** se exponen los resultados obtenidos del tratamiento de efluentes lácteos y optimización de los procesos de remoción de carbono orgánico y nitrógeno en el SBR granular aeróbico utilizado. Asimismo, se presentan los resultados del estudio de la diversidad microbiana, se caracterizan los procesos biológicos relevantes y se determinan las vías metabólicas de remoción de nitrógeno utilizando herramientas bioinformáticas.

- En el **capítulo 6** se informan los resultados hallados del estudio referente a la aclimatación del consorcio microbiano, obtenido del SBR alimentado con acetato, al efluente con fenol como fuente de carbono y energía. Además, en este capítulo se evaluó la remoción conjunta de nitrógeno y fenol en el SBR.

- En el **capítulo 7** se informan las conclusiones generales del trabajo de tesis realizado.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

2.1 GENERALIDADES DE LOS EFLUENTES Y REACTORES

En el presente trabajo de tesis se utilizaron reactores discontinuos secuenciales (SBRs), escala laboratorio, que fueron operados a temperatura ambiente, con el fin de evaluar tres tipos de efluentes sintéticos conteniendo cada uno de ellos: compuestos carbonáceos y nitrogenados con diferentes propiedades de biodegradabilidad y/o toxicidad.

La elección de los distintos sistemas estuvo basada en un gran problema de preocupación para la humanidad por la gran cantidad de aguas residuales que son vertidas indiscriminadamente a los cuerpos de agua sin ningún tipo de tratamiento. La descarga de efluentes conteniendo altas concentraciones de nitrógeno es indeseable ya que tiene un efecto tóxico sobre peces y otros organismos, causa eutrofización en ríos y lagos e incrementa la formación de nitrosaminas, un compuesto carcinogénico. Por un lado, la industria láctea genera un gran volumen de aguas residuales, siendo el suero de queso uno de los principales componentes de las aguas residuales. Por otro, numerosas industrias generan efluentes con altas concentraciones de amonio y compuestos altamente tóxicos como el fenol, entre ellas se destacan las petroquímicas, refinerías de petróleo, producción de resinas, farmacéuticas, entre otras.

A partir de esto, por un lado, se llevó a cabo el estudio de un efluente fácilmente degradable, utilizando acetato como fuente de carbono y energía (FCE) y amonio como fuente de nitrógeno y por otro la adición de un contaminante prioritario (fenol), que también pueda ser utilizado como FCE, con el fin de estudiar la remoción conjunta de nitrógeno amoniacal y fenol, evaluando la tolerancia de los microorganismos formados en el SBR y su capacidad de remoción.

Además, se estudió la remoción conjunta de carbono y nitrógeno de un efluente a base de suero de queso como FCE. El suero de queso es uno de los principales subproductos en la elaboración de quesos y muy comúnmente hallado en los efluentes que se liberan en esta industria. Este estudio se llevó a cabo con el fin analizar la remoción de formas de nitrógeno más complejas (nitrógeno orgánico, particulado, proveniente de proteínas lácteas), además de las formas inorgánicas solubles como el amonio, mediante la utilización de biomasa granulada.

El SBR alimentado con el efluente fácilmente biodegradable (acetato de sodio) se utilizó como referencia para evaluar comparativamente la capacidad de nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS) del sistema granular para un efluente tóxico. Asimismo,

Capítulo 2

el efluente a base de suero de queso permitió optimizar los procesos de remoción de los contaminantes mediante cambios en las cargas volumétricas de NTK y carbono orgánico y el tiempo de residencia celular del sistema estudiado.

Los ensayos de remoción de acetato se llevaron a cabo en un SBR denominado SBR_{ACET} , los de fenol en el SRB_{FENOL} , mientras que el tratamiento del efluente modelo de la industria láctea, integrado por suero de queso, se realizó en el SBR denominado SBR_{SQ} .

2.2 DESCRIPCIÓN DE LOS EFLUENTES SINTÉTICOS Y REACTORES

Las investigaciones llevadas a cabo a lo largo de este trabajo requirieron de la utilización de dos tipos de SBR con diferentes efluentes industriales, como se explicó previamente. A continuación, se mencionan los principales componentes utilizados en cada uno de ellos

- **SBR_{ACET}** : Este reactor fue alimentado con un efluente fácilmente biodegradable compuesto por: acetato de sodio (CH_3COONa) como fuente de carbono y sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) como fuente de nitrógeno. Además, estuvo suplementado con dos sales fosfato (KH_2PO_4 , K_2HPO_4), sulfato de magnesio hepta-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), cloruro de calcio di-hidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) y dos soluciones de micronutrientes (elementos traza) descriptas al final de la sección.

- **$SBR_{FENOL-AC}$** : Se utilizó un efluente mixto conteniendo CH_3COONa y fenol (C_6H_6O) como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Al igual que el SBR_{ACET} estuvo suplementado con las sales de PO_4^{3-} , Mg^{2+} y Ca^{2+} y las soluciones de micronutrientes. Este reactor se denominó **SBR_{FENOL}** cuando se utilizó solamente fenol como fuente de carbono, siendo iguales los restantes componentes del efluente.

- **SBR_{SQ}** : Se utilizó agua residual sintética modelo de la industria láctea, conteniendo suero de queso (SQ) como fuente de carbono principalmente y nitrógeno orgánico, suplementada con sulfato de amonio, fósforo (K_2HPO_4 , KH_2PO_4), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) y micronutrientes.

Micronutrientes: Se utilizaron dos soluciones de micronutrientes. La solución 1 estuvo compuesta por $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, Ac. Cítrico, mientras que los componentes de la solución 2 fueron $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, BO_3H_3 y IK.

Capítulo 2

2.2.1 SBR_{ACET}

El SBR_{ACET} consistió en una columna de burbujeo construido en acrílico con una altura (A) de 100 cm, un diámetro interno (D) de 10.8 cm y un volumen total de 9.5 L. La relación A/D fue de 9.2. El volumen de trabajo fue de 4.6 L. Se suministró aire mediante tres aireadores con difusores ubicados en el fondo del reactor a fin de favorecer un flujo hidráulico de tipo helicoidal que favorezca el proceso de granulación y un suficiente nivel de oxígeno para una adecuada oxidación (Figura 2.1). El reactor se operó de forma manual tanto para la carga del influente como para la descarga del efluente tratado.

El SBR_{ACET} se operó bajo condiciones que favorezcan la granulación microbiana. Para ello se empleó un caudal de aire de $10.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ que correspondió a un caudal de aire superficial ascendente $1.9 \text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ y un caudal por unidad de volumen del reactor de $2.3 \text{ Laire}\cdot(\text{Lreactor}\cdot\text{min})^{-1}$. La concentración de oxígeno disuelto (OD) resultó mayor a $7.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, lo cual permitió que la actividad nitrificante no se vea limitada por el oxígeno.

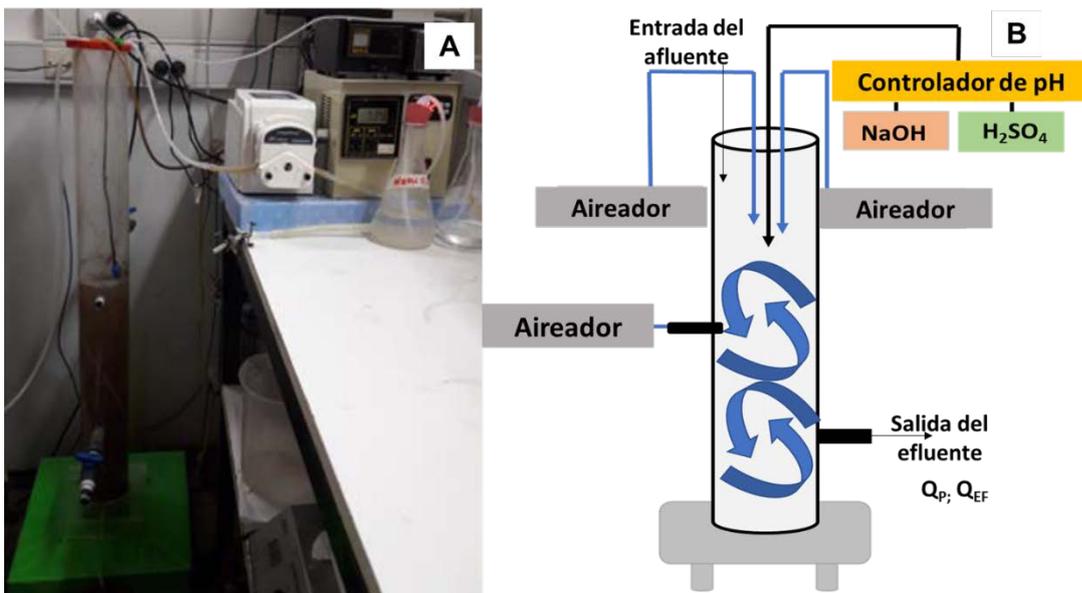


Figura 2.1: SBR_{ACET} a escala de laboratorio. A) Fotografía del reactor con controlador automático de pH, B) Esquema representativo del reactor (Q_P = caudal de salida de la purga diaria, Q_{EF} caudal de salida del efluente)

2.2.2 SBR_{SQ} y SBR_{FENOL-AC}

El SBR_{SQ} y SBR_{FENOL-AC} consistieron, al igual que el SBR_{ACET}, en una columna de burbujeo a escala laboratorio construida en acrílico. Presentaron una altura (A) de 25 cm y un diámetro (D) interno de 9 cm resultando una relación A/D de 2.7. El volumen del

Capítulo 2

biorreactor fue de 1.4 L, mientras que el volumen de trabajo de 1 L. El aire fue suministrado mediante dos aireadores con difusores ubicados en el fondo del SBR, con un caudal de aire de $2.3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, un caudal de aire superficial ascendente de $0.6 \text{ cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ y un caudal por unidad de volumen del reactor de $2.3 \text{ L}\cdot\text{aire}\cdot(\text{L}\cdot\text{reactor}\cdot\text{min})^{-1}$ con el mismo objetivo expuesto anteriormente, favorecer el proceso de granulación y la oxidación biológica. El OD resultó mayor a $6.0 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, evitando limitación por oxígeno de la actividad nitrificante (Figura 2.2).



Figura 2.2: $SBR_{FENOL-AC}$ y SBR_{SQ} a escala de laboratorio

A) Fotografía de los reactores, B) Esquema representativo del reactor. $SBR_{FENOL-AC}$ se operó con controlador automático de pH (Para una mejor representación no fue incluido en el esquema B)

2.3 INOCULACIÓN DE LOS REACTORES

Los reactores discontinuos secuenciales (SBR_{ACET} , SBR_{SQ}) fueron inoculados con un consorcio microbiano aerobio, lodos activados, proveniente de un SBR automatizado a escala de laboratorio del CIDCA utilizado para tratamiento de aguas residuales sintéticas (acetato de sodio, amonio y fosfatos). Por otro lado, el $SBR_{FENOL-AC}$ fue inoculado con la biomasa granulada generada en el SBR_{ACET} .

2.4 OPERACIÓN DE REACTORES Y PROCESO DE GRANULACIÓN

La granulación de la biomasa en los reactores se realizó siguiendo el método de Adav y col, (2008) ligeramente modificado. Este método implicó la operación de los reactores, con elevada relación altura/diámetro, bajo régimen “feast/famine” es decir con intervalos de alimentación e inanición. Se utilizó un cultivo de lodos activados como inóculo para SBR_{ACET} y SBR_{SQ} como se explicó en sección 2.3. Los reactores fueron operados con

Capítulo 2

ciclos de 24 hs que estuvieron determinados por las siguientes fases: adición del agua residual, correspondiente a la fase de alimentación (2 minutos), fase de reacción (1428 min), purga de biomasa (1 minuto), fase de sedimentación (5-20 minutos) y extracción del sobrenadante, es decir del efluente clarificado (2 minutos). El tiempo de sedimentación de los lodos se redujo progresivamente desde 20 hasta 5 minutos favoreciendo la selección de aquellos que sedimentaban rápidamente (gránulos y flóculos de alta densidad).

Un tiempo de sedimentación de 5 minutos ha sido propuesto por Tay y Liu (2004) como el tiempo ideal para el desarrollo de biomasa granular. Cabe destacar que el tiempo de sedimentación debe ser adecuado para la selección de lodos densos y gránulos, es decir no debe ser tan largo, para evitar la sedimentación de la totalidad de la biomasa, ni tampoco demasiado corto lo cual llevaría a un lavado constante de los microorganismos. Una elevada relación A/D y un elevado caudal de aire conducen al establecimiento de una elevada fuerza de corte hidrodinámica favorable para el proceso de granulación (Tay y Liu, 2004).

La purga de biomasa se realizó al final de la etapa de reacción retirando un cierto volumen (VP) del licor de mezcla del reactor en condiciones de mezclado. Cabe destacar que la concentración de biomasa en la purga fue igual a la concentración de la biomasa al final de la etapa de reacción. Una vez realizada la purga, se apagaron los aireadores y se dejó sedimentar la biomasa para separarla del efluente tratado. Finalmente se retiró un cierto volumen del sobrenadante, el cual correspondió al efluente final (EF) del tratamiento. Inmediatamente se inició un nuevo ciclo de operación, en el cual la alimentación del agua residual correspondió al mismo volumen de extracción del sobrenadante sumado al volumen de purga de lodos.

2.5 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE RESIDENCIA CELULAR (TRC) Y TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO (TRH)

El tiempo de residencia celular (TRC, días) fue calculado a partir del cociente entre el producto entre el volumen de trabajo (V_T , L) de cada reactor y la concentración de biomasa del reactor (X_R , mgST.L⁻¹) y el producto entre el caudal de purga (purga de biomasa) del licor de mezcla (Q_P , L.d⁻¹) y la concentración de biomasa de purga (X_P , mgST.L⁻¹), considerando que $X_R=X_P$, como se presenta en la siguiente ecuación:

Capítulo 2

$$TRC = \frac{V_T \cdot X_R}{Q_P \cdot X_P} \quad (2.1)$$

El tiempo de retención hidráulico (TRH, días) fue calculado a partir del cociente entre el volumen de trabajo (V_T , L) de cada reactor y la suma del caudal de purga (Q_P , L.d⁻¹) y el caudal del efluente final (Q_{EF} , L.d⁻¹) como se presenta en la siguiente ecuación:

$$TRH = \frac{V_T}{Q_P + Q_{EF}} \quad (2.2)$$

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

El funcionamiento de los reactores SBR_{ACET}, SBR_{FENOL-AC} y SBR_{SQ} se monitoreó mediante los siguientes parámetros físico-químicos a lo largo de los ciclos: sustrato orgánico como demanda química de oxígeno (DQO) soluble (DQO_S, mg.L⁻¹), ortofosfato (PO₄³⁻-P, mg.L⁻¹), amonio (NH₃-N, mgN.L⁻¹), nitrito (NO₂⁻-N, mgN.L⁻¹), nitrato (NO₃⁻-N, mgN.L⁻¹) y propiedades de sedimentación mediante el índice de sedimentabilidad volumétrica (ISV) (mL.g⁻¹). La concentración de biomasa fue determinada como sólidos totales (ST, mg.L⁻¹) y DQO (DQO_B, mg.L⁻¹). DQO_B correspondió a la diferencia entre DQO total (DQO_T), determinado a partir de muestras del licor de mezcla, y DQO_S.

La concentración de carbohidratos totales (CT) de la biomasa fue determinada por el método de antrona.

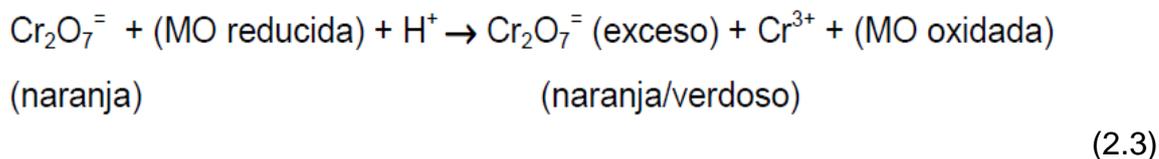
La concentración de polihidroxialcanoato (PHA) se determinó mediante extracción y cuantificación por espectrofotometría UV. También se determinó tamaño de los gránulos que junto con la determinación del ISV constituyeron los principales parámetros para evaluar la estabilidad de los reactores

2.6.1 Determinación de la demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) se define como la cantidad de un oxidante específico que reacciona con la muestra bajo condiciones controladas. La cantidad del oxidante consumido se expresa en términos de su equivalencia de oxígeno. La DQO se utiliza como una medida de la cantidad de materia orgánica (MO) en cursos naturales y efluentes. Asimismo, la DQO puede correlacionarse con la cantidad de DBO (Demanda Biológica de Oxígeno).

Capítulo 2

La demanda química de oxígeno consiste en la cantidad de oxígeno requerido para oxidar la fracción de materia orgánica de una muestra de agua residual susceptible a la oxidación por dicromato de potasio ($\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$) en medio ácido (ácido sulfúrico) (Ecuación 2.3) a una temperatura de 150°C durante un período de dos horas.



El ensayo se realiza en presencia de un catalizador, sulfato de plata (Ag_2SO_4), para facilitar la oxidación de los compuestos orgánicos. De esta forma el carbono presente en la mayoría de los compuestos se oxida completamente a dióxido de carbono (CO_2); sin embargo, es importante mencionar que para algunos hidrocarburos aromáticos y piridinas la oxidación puede resultar parcial. Luego de la reacción, el cambio de color es medido por un método espectrofotométrico simple y es proporcional al avance de la reacción. El método presenta algunas interferencias, siendo una de las más comunes la generada por los iones cloruro, ya que pueden ser oxidados por el $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$. Para minimizar esta interferencia se utiliza el sulfato de mercurio (HgSO_4), el cual está presente en la mezcla de reacción.

Las determinaciones de DQO se realizaron empleando un kit comercial (HACH, método 8000), el cual se encuentra aprobado por la USEPA (United States Environmental Protection Agency) para el análisis de aguas residuales. Este método basado en la digestión orgánica presenta un rango de medida comprendido entre $0\text{-}1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DQO y una desviación estándar (DE) de $2.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. El procedimiento consistió en la adición de 2 mL de una muestra en tubos de vidrio conteniendo la mezcla de reacción comercial (dicromato de potasio, ácido sulfúrico, sulfato de plata y sulfato de mercurio). Se realizó el tratamiento térmico de la muestra en un termoreactor HACH, a 150°C con reflujo cerrado durante dos horas (Figura 2.3).

Capítulo 2



Figura 2.3: Termoreactor HACH

Luego de la reacción, los tubos se dejaron enfriar y posteriormente se determinó la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro HACH (modelo DR 2800) (Figura 2.4). Las lecturas de absorbancia fueron convertidas a valores de DQO mediante una curva de calibración incorporada en el equipo.



Figura 2.4: Espectrofotómetro HACH (modelo DR 2800)

El sustrato orgánico se determinó como DQO soluble (DQO_S). Para ello se tomó un volumen de 10 mL del licor de mezcla de cada SBR y se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415C) a 13000 R.P.M durante 10 minutos. Posteriormente se tomó cuidadosamente el sobrenadante con una micropipeta y se filtró mediante una membrana de celulosa con tamaño de poro de 0.45 μm (GE Osmonics). Luego se adicionó 2 mL del filtrado a la mezcla de reacción HACH y se continuó el procedimiento descrito previamente.

El DQO total (DQO_T) de cada sistema se determinó utilizando directamente un volumen de 2 mL del licor de mezcla (con dilución 1:5 con agua destilada) obtenido de cada reactor biológico. Previamente al proceso de digestión, el licor de mezcla (15 mL de

Capítulo 2

volumen sin diluir) fue sometido a sonicación utilizando un sonicador de punta (Sonic Ruptor 400, OMNI International, USA) (Figura 2.5) con micropunta al 40% de potencia y durante 3 minutos. Este procedimiento fue realizado para homogeneizar la muestra, constituida por gránulos de diferente tamaño, y disminuir el error en la medición de DQO_T provocado por estos aglomerados.

Para todos los efluentes sintéticos (de cada reactor) y condiciones experimentales se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito para DQO soluble y DQO total.



Figura 2.5: Sonicador de punta

En los casos que se requería, ya sea para determinar DQO_S o DQO_T , se procedía a realizar diluciones adecuadas de la muestra, usando agua destilada, para que las lecturas de absorbancia entren en el rango de medición del método descrito.

2.6.2 Determinación de la biomasa

La concentración de biomasa de los reactores fue determinada como DQO, denominada DQO de biomasa (DQO_B), a partir de la siguiente ecuación:

$$DQO_B = DQO_T - DQO_S \quad (2.4)$$

La concentración de biomasa presente en cada SBR se determinó también como sólidos totales (ST). Esta determinación consistió en el siguiente procedimiento: en primer lugar, un volumen determinado del licor de mezcla de cada SBR ($VM = 8 \text{ mL}$) fue colocado en tubos de vidrio de peso conocido (m_0 , mg), para ser centrifugado. Finalizada la

Capítulo 2

centrifugación, se descartó el sobrenadante. Luego el pellet contenido en cada tubo fue lavado con agua destilada, para nuevamente ser centrifugado. Luego se descartó el sobrenadante de cada uno de ellos. Este proceso de lavado fue realizado por duplicado. Posteriormente, los tubos conteniendo el pellet lavado se colocaron en estufa a una temperatura de 105 °C durante un período de 24 horas con el fin de eliminar el agua remanente. Finalmente, los tubos se pesaron, cuyo peso se expresó con la denominación m_1 (mg). La concentración de biomasa (X , g ST.L⁻¹) se determinó mediante la siguiente expresión:

$$X = \frac{m_1 - m_0}{V_M} \quad (2.5)$$

La concentración de biomasa de cada reactor fue a su vez determinada como sólidos suspendidos volátiles (SSV, g SSV.L⁻¹), a partir de muestras de licor de mezcla sometidas a filtración (1 µm de tamaño de poro) y luego a tratamiento térmico (550 °C) durante 10 minutos.

2.6.3 Determinación de nitrógeno amoniacal

El NH₃-N fue determinado mediante el método de Nessler, el cual se caracteriza por ser muy sensible. El fundamento de esta técnica se basa en la reacción colorimétrica que se produce al reaccionar el NH₄⁺-N con el reactivo de Nessler (yodomercuriato potásico), generando un compuesto coloreado susceptible de medición colorimétrica a longitud de onda de 425 nm. En el presente trabajo se utilizó el método HACH N° 8038. La adición de un estabilizador mineral permite acomplejar la dureza de la muestra asegurando una eficiente reacción del NH₄⁺-N con el reactivo de Nessler. Para facilitar la formación de color en la reacción Nessler-amonio se adicionaba el alcohol polivinílico como agente dispersante. De esta forma, la intensidad del color amarillo formado es proporcional al contenido de nitrógeno amoniacal en el agua. El método presenta un rango de medición comprendido entre 0.02 y 2.50 mg NH₃-N.L⁻¹ y desviación estándar de ± 0.015 mg NH₃-N.L⁻¹.

Es importante mencionar que el benceno y los sulfuros pueden causar interferencias con el reactivo de Nessler causando turbiedad. Por otro lado, los iones cloruro también puede causar interferencias pudiendo ser eliminado mediante la adición de

Capítulo 2

2 gotas de tiosulfato de sodio por $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cl^- . Otros compuestos orgánicos pueden interferir también, pero en menor proporción.

Para determinar la concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ se centrifugaba la muestra de los SBRs en tubos eppendorf de 1.5 mL utilizando una microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415 D) durante 5 minutos a 10.000 R.P.M. Luego se filtraba el sobrenadante con membranas de celulosa ($0.45\ \mu\text{m}$) y se realizaba una dilución adecuada de la muestra para que la lectura de la absorbancia se encuentre dentro del rango de medición del método. A un volumen determinado de 25 mL de la muestra previamente filtrada y diluida, se le adicionaba 3 gotas del estabilizador mineral, 3 gotas del alcohol polivinílico y 1 mL del reactivo de Nessler (Reactivos HACH). Se agitaba hasta observar una solución uniforme y se dejaba reaccionar durante 1 minuto. Finalmente, se determinaba la concentración de nitrógeno amoniacal de la muestra como $\text{NH}_3\text{-N}$ utilizando el espectrofotómetro HACH DR 2800. Previamente a la medición de la muestra, se midió un blanco de la muestra (25 mL de agua destilada), que fue tratado de igual forma que la muestra de interés.

2.6.4 Determinación de nitrito

La cuantificación de nitrógeno como nitrito ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) fue determinada por el método de sulfato ferroso. El sulfato ferroso en medio ácido reduce el nitrito a óxido nitroso. Los iones ferrosos se combinan con el óxido nitroso para formar un complejo de color marrón verdoso el cual es proporcional a la concentración de nitrito.

Para determinar la concentración de nitrito ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) se utilizó el Método HACH N° 8153. La longitud de onda de medición fue de 585 nm con un rango de medición de 2 a 150 $\text{mg}\ \text{NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$ con una desviación estándar de 2.2 $\text{mg}\ \text{NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$. Un volumen de muestra determinado (25 mL), previamente centrifugado y filtrado, fue trasvasado a una cubeta. Posteriormente se procedía al agregado de un sobre de reactivo NitriVer 2 Nitrite (sulfato ferroso) e inmediatamente se sometía a agitación durante un 1 minuto. Luego de la agitación se dejaba reaccionar durante 9 minutos. El mismo procedimiento fue realizado para determinar el blanco de la muestra, utilizándose 25 mL de agua destilada. Finalmente, para expresar los valores de nitrógeno como nitrito ($\text{NO}_2^-\text{-N}$) se utilizó el factor de conversión $\text{N}/\text{NO}_2^- = 14\ \text{g}\ \text{N}\cdot(46\ \text{g}\ \text{NO}_2^-)^{-1} = 0.304$.

Capítulo 2

2.6.5 Determinación de nitrato

El nitrógeno como nitrato (NO_3^- -N) fue cuantificado por el método de la reducción por cadmio. Este método se basa en la reducción de nitratos en presencia de cadmio. Los iones nitrito reaccionan con ácido sulfanílico formando sales de diazonio intermedias que se unen al ácido gentísico produciendo como resultado una solución ámbar. El color es proporcional a la cantidad NO_3^- -N presente en la muestra. Para determinar la concentración de nitrato (mg NO_3^- -N. L^{-1}) se utilizó el método HACH N° 8039. El procedimiento llevado a cabo se detalla a continuación: La muestra de volumen determinado (25 mL), previamente centrifugada y filtrada con membrana de celulosa (0.45 μm), fue introducida en una cubeta para proceder al agregado de un sobre del reactivo NitriVer 5 Nitrato (cadmio, ácido gentísico, ácido sulfanílico, sulfato de magnesio). Se agitaba durante un 1 minuto y se dejaba reaccionar 5 minutos para luego proceder a la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro DR 2800 a una longitud de onda de 500 nm. El método comprende un rango de medición de 0.3 a 30 mg.L^{-1} NO_3^- -N y una desviación estándar de 0.8 mg.L^{-1} NO_3^- -N. El mismo procedimiento se realizó para determinar el blanco de la muestra utilizando agua destilada. La concentración del ion nitrato se obtenía sustrayendo la cantidad del ion nitrito, medido por el método descrito en la sección previa, al valor total obtenido por este método.

2.6.6 Determinación del nitrógeno total Kjeldahl (NTK) por microKjeldahl

Las diferentes formas en que se presenta el nitrógeno dependen del origen del efluente (Orhon y Artan, 1994). Las fuentes principales de nitrógeno del agua residual son proteínas, aminoácidos y amonio, sin embargo, la cantidad relativa de cada uno depende del grado de hidrólisis y amonificación que ocurra (Ghaly y col, 2003). De acuerdo a Ghaly y col. (2003), el suero de queso se encuentra compuesto por nitrógeno orgánico (proteínas + aminoácidos), representando aproximadamente 83% del NTK (el cual involucra nitrógeno orgánico y nitrógeno amoniacal) mientras que el 17% restante es nitrógeno amoniacal (Ghaly y col, 2003). Esto indica que el porcentaje de nitrógeno orgánico en el agua residual debe ser igual o menor al valor correspondiente al NTK del suero debido al proceso de hidrólisis y amonificación.

Para corroborar el contenido de nitrógeno del suero de queso utilizado en este trabajo de investigación, el NTK fue determinado por el método de microKjeldahl.

Capítulo 2

El NTK fue determinado en el efluente sintético, en el licor de mezcla y en solución. Esto condujo al análisis de tres muestras diferentes: suero de queso (NTK_{SQ}), licor de mezcla (NTK_{LM}) y muestras filtradas del reactor utilizando una membrana de celulosa de tamaño de poro de 0.45 μm (NTK_S).

El NTK_{SQ} permitió estimar la contribución del nitrógeno orgánico (N_{ORG}) al efluente utilizado en cada condición experimental estudiada en el SBR_{SQ}.

El NTK_{LM} correspondió a la suma del nitrógeno orgánico soluble y particulado aportado por el suero de queso, el nitrógeno amoniacal proveniente del efluente sintético y el N_{ORG} correspondiente a la biomasa como así también a sus productos de lisis. El NTK_S correspondió a las formas solubles, de las muestras filtradas del licor de mezcla, aportadas por el suero de queso, NH₃-N y productos de lisis microbiana. Asimismo, se determinó el NTK particulado (NTK_P) a partir de la diferencia entre NTK_{LM} y NTK_S e incluyó el nitrógeno orgánico aportado por el suero de queso y la biomasa.

Las diferentes determinaciones de NTK se llevaron a cabo siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Consistió inicialmente en llevar a cabo una digestión de las muestras. Para tal proceso se colocó 1 mL de las muestras en un tubo digestor y se les agregó 1 gr de mezcla catalizadora preparada con sulfato de sodio (Na₂SO₄) y sulfato de cobre II (CuSO₄) en una relación 10:1 y se les adicionó un volumen de 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado (98%, pureza). Posteriormente los tubos, conteniendo las muestras, el catalizador y el ácido, fueron colocados en un digestor (Foss, Tecator 2040, España) y se procedió a calentarlos de la siguiente forma: 90°C, 10 minutos; 150°C, 30 minutos; 200°C, 30 minutos; 250°C, 30 minutos, 300°C, 30 minutos; 350°C, 30 minutos, 400°C, 30 minutos y 425°C hasta observar coloración verde esmeralda en los tubos (lo que indicó la finalización de la digestión). Posteriormente a ser detectado dicho color se los dejó calentar durante 15 minutos más. Finalizado el proceso de digestión, se los dejó enfriar. Luego el contenido de cada uno de los tubos se trasvasó a matraces de 50 mL de volumen, completándose el volumen con agua destilada.

Por último, el amonio formado se cuantificó por el método colorimétrico descrito por Nkonge y Balance (1982) basado en la reacción de Berthelot con modificaciones, que consistió en el siguiente protocolo. Inicialmente se prepararon cinco soluciones de reactivos que fueron añadidas a 250 μL de muestra diluida (80 μL de muestra + 170 μL de agua destilada) en el siguiente orden: 750 μL de solución C, seguido de 200 μL de solución D, y finalmente 100 μL de la solución E (Tabla 2.1)

Capítulo 2

El fundamento de la colorimetría se basa en la reacción de los iones amonio con salicilato e hipoclorito (NaClO), en presencia del catalizador nitroprusiato, para formar el compuesto indofenol (verde):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de nitrógeno en la muestra estudiada.

Tabla 2.1: Soluciones de los reactivos utilizados para el proceso de colorimetría en el método de microKjeldahl

Reactivos	Composición
Solución A	Na ₂ HPO ₄ 0.2 M, NaOH 0.2 M y tartrato de sodio (Na) y potasio (K) (KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O) (10% P.V ⁻¹).
Solución B	NaOH 2.5 M
Solución C	Solución A + solución B en una relación 50:50
Solución D	20 % P.V ⁻¹ de salicilato de sodio (C ₇ H ₅ NaO ₃) + 0.03 % P.V ⁻¹ de nitroprusiato de sodio (C ₅ N ₆ OFe)
Solución E	lavandina que asegure 5% de cloro activo

Las muestras (junto a los reactivos) fueron llevadas a agitación durante 20 minutos, y concluido este proceso fueron colocadas en una placa de Elisa (65 µL) con la adición de 65 µL de agua destilada. En la misma placa de Elisa se colocaron las soluciones

Capítulo 2

correspondientes a la curva de calibración utilizada para determinar el contenido de nitrógeno de cada muestra.

Para la construcción de la misma se digirió seroalbúmina bovina (Sigma Aldrich, 16%N, 96% pureza), en las siguientes cantidades 0, 4.6, 4.8, 8, 10 y 20 mg por duplicado con mismo protocolo utilizado para las muestras detallado anteriormente. Durante la digestión se incluyeron además dos tubos con controles (estándares de nitrógeno). Uno de los tubos contenía $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mientras que el otro contenía urea, ambos de grado analítico. Las dos sustancias utilizadas como control fueron secadas durante varias horas en estufa a una temperatura de 105°C y cuidadosamente pesadas una vez frías, a fin de conocer exactamente si se estaba midiendo todo el contenido de nitrógeno que aportaban las muestras.

La lectura de la absorbancia se llevó a cabo en un lector de placas (Synergy HT, BioTek, Estados Unidos) a una longitud de onda de 660 nm que permitió calcular la concentración de nitrógeno en las muestras

2.6.7 Propiedades de sedimentación: índice volumétrico de lodos (ISV)

El ISV (mL.g ST^{-1}) se determinó para todos los sistemas, SBR_{ACET} , $\text{SBR}_{\text{FENOL-AC}}$ y SBR_{SQ} . Se tomaba una muestra del licor de mezcla de cada SBR (100 mL), para las diferentes condiciones experimentales estudiadas, y se la colocaba en una probeta de 100 mL. Posteriormente se dejaba sedimentar durante 30 minutos y se observaba el volumen de la biomasa sedimentada en la probeta (VB_{30}). Luego se determinaba el ISV_{30} (mL.g ST^{-1}) mediante la siguiente expresión (Mullins y col, 2018):

$$\text{ISV}_{30} = \frac{\text{VB}_{30} (\text{mL}/100\text{mL})}{\text{ST} (\text{g}/100\text{mL})} \quad (2.7)$$

donde ST es la concentración de sólidos totales expresado como $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$.

Se ha propuesto que el ISV debe ser menor a 90 mL.g ST^{-1} para considerar una excelente sedimentabilidad de los gránulos (Liu y Tay, 2006).

Capítulo 2

2.6.8 Determinación del tamaño granular

La distribución de tamaño de partícula de la biomasa se determinó utilizando la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés Dynamic Light Scattering) también conocida como espectroscopía de correlación fotónica (PCS, del inglés Photon Correlation Spectroscopy) o dispersión cuasi-elástica de la luz (QELS, del inglés Quasi Elastic Light Scattering) utilizando un equipo Mastersizer E 2000 (Figura 2.6). Estas determinaciones fueron realizadas utilizando 50 mL de licor de mezcla. La técnica DLS mide la velocidad del movimiento browniano, movimiento al azar de las partículas debido al “golpeteo” de las moléculas del solvente alrededor de ellas, permitiendo relacionar estos movimientos con el tamaño de la partícula.



Figura 2.6: Mastersizer E 2000

Esta técnica mide las fluctuaciones temporales de la luz dispersada, a partir de lo que se determina el coeficiente de difusión traslacional (D) que se relaciona con el tamaño de la partícula por medio de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 2.7), que relaciona el diámetro hidrodinámico (d), la viscosidad del medio aparente (ρ), la temperatura absoluta (T) y la constante de Boltzman (K) ($1.38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) (Bhattacharjee, 2019; Malvern Instruments Ltd, 2014 a y b):

$$D = \frac{K.T}{3.\pi.\rho.d} \quad (2.8)$$

2.7 EFICIENCIAS DE REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y DETERMINACIÓN DE FA Y FNA

2.7.1 Cuantificación de la eficiencia de eliminación de nitrógeno amoniacal y nitrógeno inorgánico

El nitrógeno amoniacal removido (NH_3-N_R) se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\% NH_3 - N_R = \left(\frac{(NH_3-N)_0 - (NH_3-N)_F}{(NH_3-N)_0} \right) \cdot 100 \quad (2.9)$$

donde $(NH_3-N)_0$ y $(NH_3-N)_F$ corresponden a las concentraciones de nitrógeno amoniacal ($mg NH_3-N.L^{-1}$) al comienzo y al final del ciclo operativo, respectivamente.

El nitrógeno inorgánico removido (Ni_R) se determinó a partir de la siguiente expresión:

$$\% Ni_R = \left(\frac{Ni_O - Ni_F}{Ni_O} \right) \cdot 100 \quad (2.10)$$

donde Ni_O es la concentración de nitrógeno inorgánico al comienzo del ciclo operativo ($mg.L^{-1}$) y Ni_F es la concentración de Ni ($mg.L^{-1}$) al final del ciclo (efluente de SBR). Ni_O corresponde a NH_3-N del agua residual sintética. Ni_F es la suma de NH_3-N , $NO_2^- - N$ y $NO_3^- - N$. Las concentraciones de nitrato y nitrito al comienzo del ciclo (del sobrenadante restante del ciclo anterior) no se consideraron en la determinación de la concentración de Ni_O .

2.7.2 Concentraciones de FA y FNA en el SBR

Las concentraciones de FA y FNA en el SBR se estimaron mediante las siguientes expresiones propuestas por Chen y col, 2015:

$$FA (mg.L^{-1}) = \frac{17}{14} \frac{[NH_4^+ - N] \times 10^{pH}}{\text{Exp} [6334/(273 + T)] \times 10^{pH}} \quad (2.11)$$

Capítulo 2

$$FNA (mg.L^{-1}) = \frac{46}{14} \frac{[NO_2^- - N]}{\text{Exp} [-2300/(273 + T)]} \times 10^{pH} \quad (2.12)$$

2.8 PARÁMETROS CINÉTICOS

Se determinaron las velocidades volumétricas (r) de consumo de DQO_5 y NH_3-N a partir de la pendiente de las curvas de decaimiento de cada compuesto en un intervalo de tiempo determinado. También se determinaron las velocidades volumétricas de producción de $NO_3^- - N$ y $NO_2^- - N$ a partir de la pendiente de las curvas de acumulación de los mismos. Además se determinaron las velocidades específicas (q) de consumo o producción, correspondientes a cada compuesto químico, a partir del cociente entre las velocidades volumétricas obtenidas y la concentración de biomasa (ST , $g.L^{-1}$).

Los parámetros cinéticos fueron determinados para los SBRs bajo las diferentes condiciones experimentales estudiadas.

2.9 RESPIROMETRÍA

La velocidad de consumo de oxígeno de los microorganismos (OUR, oxygen uptake rate) se determinó mediante un respirómetro que consistió en un reactor de 250 mL conteniendo un electrodo de oxígeno (YSI Modelo 58), calibrado previamente con aire saturado en vapor de agua (Figura 2.7). Se utilizó un aireador y agitación magnética constante. Las medidas de oxígeno disuelto (OD) fueron registradas por el electrodo y almacenadas a razón de 1 dato.(10 segundos)⁻¹. Para este estudio se tomaban muestras de cada reactor y se colocaban en el respirómetro para proceder a su aireación durante aproximadamente 2 minutos. Posteriormente se detenía la aireación y se registraba el descenso de la concentración de OD en función del tiempo. La pendiente de la recta obtenida correspondió a la velocidad de respiración total (OUR_T, $mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$). OUR fue determinado para todas las condiciones experimentales ensayadas.

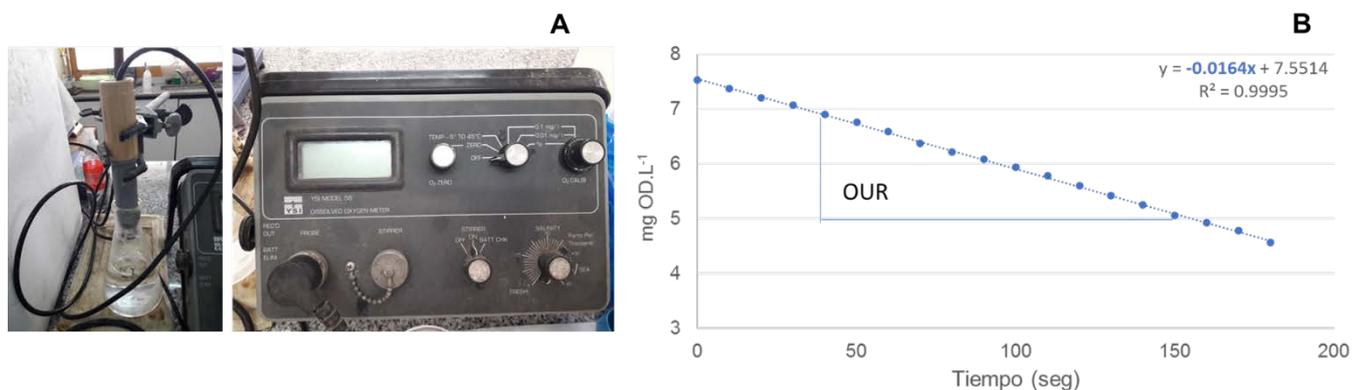


Figura 2.7: Electrodo de oxígeno (YSI Modelo 58) y determinación de OUR. A) Electrodo de OD, B) Determinación de la velocidad de respiración total (OUR_T , $mgO_2.L^{-1}.h^{-1}$).

2.10 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES (CT)

La concentración de carbohidratos totales (CT) de la biomasa se determinó mediante el método Antrona siguiendo una modificación de la técnica propuesta por Osborne y Voogt (1996). En procesos biológicos con régimen “feast/famine” se cicla comúnmente glucógeno y se asume que los cambios en la concentración de carbohidratos totales ocurren sobre el componente glucógeno (Liu y col, 2007; Zheng y col, 2005). En los SBRs utilizados en el presente trabajo de tesis, alimentados con diferentes fuentes de carbono, también fue asumido que los cambios en la concentración de CT estuvieron asociados con la síntesis de glucógeno, como sustancia de reserva intracelular, y su posterior degradación. Para la determinación de CT se tomaba de cada SBR muestras de 1 mL de licor de mezcla, previa homogeneización mediante sonicación (sección 2.6.1), se colocaban en tubos eppendorf de 1.5 mL. Luego los tubos se centrifugaban en una microcentrífuga (Eppendorf 5415 D) durante 10 minutos a 13.000 R.P.M. El sobrenadante se descartaba y el pellet se resuspendía en 1 mL de agua destilada. Posteriormente se centrifugaban los tubos bajo las mismas condiciones descriptas. La biomasa resuspendida y lavada en los tubos era trasvasada a tubos de ensayo de mayor volumen y se les adicionaba 5 mL del reactivo antrona (0.2 g de antrona en H₂SO₄ al 95% v/v). Los tubos fueron colocados en un baño a 100°C durante 10 min. Inmediatamente los tubos se incubaron en un baño con hielo durante 10 minutos. Culminado este período, se determinaba la concentración de glucosa por espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm usando ácido sulfúrico (H₂SO₄) como blanco. Se preparó una curva estándar

Capítulo 2

usando diluciones seriadas de una solución stock de glucosa ($100 \mu\text{g}$ de glucosa. mL^{-1}). Los resultados fueron expresados en mg de glucosa. L^{-1} . La concentración de glucógeno fue estimada para los reactores operados bajo las diferentes condiciones experimentales.

2.11 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATO (PHA)

La producción de PHA en el SBR_{ACET} , en todas las condiciones estudiadas, se determinó mediante la extracción del polímero y su cuantificación espectrofotométrica siguiendo el método, ligeramente modificado, propuesto por Venkateswar Reddy y col. (2012). Inicialmente se tomó un volumen de 1 L del SBR y fue dividido en cuatro botellas de centrifugación de 250 mL de volumen. La centrifugación se realizó a una fuerza centrífuga relativa de 10.000 g durante 10 minutos en una centrífuga Beckman Avanti J (Beckman Coulter Inc., Brea, California, USA). Finalizada la misma, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con agua destilada en las mismas condiciones. El pellet resultante fue secado en estufa de vacío a 60°C y 0.6 atm hasta peso constante (g ST.L^{-1}). Posteriormente se redujo el tamaño de la biomasa seca por medio de un mortero, con el fin de favorecer el proceso de extracción de PHA con solvente que se detalla a continuación. La biomasa triturada de cada condición experimental se pesó (1.5–2.0 g) y se colocó a un balón donde se realizó la extracción del polímero con cloroformo (50 mL) en reflujo a una temperatura de 60°C durante 3 hs con suave agitación (200 R.P.M). Una vez terminada la etapa de extracción se procedió a la separación de los restos celulares mediante el método de filtración al vacío utilizando una membrana de fibra de vidrio con tamaño de poro de $1 \mu\text{m}$. El filtrado obtenido (20 mL) se concentró en placa de calentamiento bajo campana con el fin de evaporar casi completamente el solvente y obtener una fina película del polímero. Luego, la película obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente y se la colocó en un tubo Hach de 10 mL. Al tubo que contenía la película se le adicionó 8 mL de etanol al 96% a 4°C para precipitar el polímero.

Posteriormente se procedió a centrifugar, usando una centrífuga ROLCO (CM 2036, Rolco S.L.R. Argentina), durante 10 minutos a 2.000 R.P.M con el fin de separar el PHA.

Luego, la purificación del polímero se realizó mediante dos lavados con una solución hidroalcohólica (etanol/agua destilada) al 50%. Al polímero purificado se lo colocó en un tubo de ensayo pesado previamente en balanza analítica ($\text{PESO}_{\text{TUBO}}$) y se lo secó en estufa de vacío hasta peso constante ($\text{PESO}_{\text{TUBO+PHA}}$). Finalmente, por diferencia de peso

Capítulo 2

$(\text{PESO}_{\text{TUBO+PHA}} - \text{Peso}_{\text{tubo}})$ se obtuvo una concentración inicial de PHA en base seca (Figura 2.8).

Para calcular la concentración final de PHA fue necesario conocer su pureza. Se realizaron dos curvas de calibración, una para determinar PHB (polihidroxi butirato) y otra para conocer si la muestra contenía polihidroxi valerato (PHV).

Inicialmente se pesaron 25 mg de patrón de PHA, copolímero poli (3 hidroxibutirato-co-3-hidroxi valerato) P(3HB-co-3HV) con contenido de PHV 12% en moles (Sigma Aldrich), y se resuspendió en 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. Luego se sometió tanto al patrón (PHA en ácido sulfúrico) como a las muestras, resuspendidas también en ácido sulfúrico, a tratamiento térmico en baño a 100°C durante 10 minutos. Concluido este tiempo, la solución se retiró del baño y fue colocado en hielo molido para detener la reacción. Los patrones fueron diluidos para obtener las curvas de calibración en las mismas proporciones que se diluyeron las muestras (diluciones desde 1/50 hasta 1/1000 para medir PHB y diluciones 1/2 hasta 1/10 para medir PHV) en un volumen final de 10 mL en tubos de ensayo. Se midió absorbancia a cada una de las diluciones a 235 nm para medir PHB y 285 nm para PHV, para obtener la regresión lineal que permitió poder determinar las concentraciones de PHA y PHV en las muestras en estudio.

Cabe destacar que se determinó PHA en tres etapas del proceso: al comienzo del ciclo (0 hs), al final de la etapa “feast” y al final del ciclo (24 hs).



Figura 2.8: Esquema de la metodología para extracción y purificación de PHA

Capítulo 2

2.12 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La morfología de la biomasa se observó con SEM (Wu y col, 2010) de alta resolución utilizando un microscopio FEI La B6 (Eindhoven, Países Bajos) a un voltaje de aceleración de 5 kV con un detector de electrones para condiciones de bajo vacío (Figura 2.9). Se tomaban muestras del licor de mezcla de los reactores (SBRs) y se centrifugaban a 10.000 R.P.M durante 10 minutos. Posteriormente la biomasa granular resultante (pellet) se lavaba con buffer fosfato (50 mM, pH 7), se centrifugaba nuevamente y se descartaba el sobrenadante. Finalmente, los gránulos microbianos se trataban con paraformaldehído al 4% y se deshidrataban a partir de una serie graduada de soluciones de etanol (50%, 70%, 80%, 90% y 100%). Finalmente, las muestras fueron secadas a temperatura ambiente para su observación mediante SEM.



Figura 2.9 Microscopio electrónico de barrido de alta resolución

2.13 ENSAYOS BIOQUÍMICOS: ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES NITRIFICADORAS, DESNITRIFICADORAS Y FIJADORES DE NITRÓGENO PRESENTES EN LOS REACTORES

Se detectó la presencia de los diferentes grupos microbianos presentes en los biorreactores, involucrados en el ciclo del nitrógeno (nitrificantes, desnitrificantes y bacterias fijadoras de N_2), mediante los ensayos bioquímicos que se detallan a continuación:

Capítulo 2

Se utilizaron diferentes medios de cultivos para confirmar la existencia de bacterias fijadoras de nitrógeno gaseoso (N_2), bacterias nitrificantes oxidantes de amonio (BOA) y nitrito (BON) y bacterias desnitrificantes (BD).

A- Bacterias fijadoras de N_2 : El medio de cultivo presentó la siguiente composición: manitol (15 g.L^{-1}), K_2HPO_4 (0.5 g.L^{-1}), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g.L^{-1}), NaCl (0.1 g.L^{-1}), agar (15 g.L^{-1}), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.001 g.L^{-1}) y $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.010 g.L^{-1}). Este medio fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Luego el medio se extendía, bajo condiciones de esterilidad (bajo mechero), en placas de Petri estériles. Una vez sólido, se sembraba un volumen de $100 \mu\text{L}$ de tres diluciones seriadas del licor de mezcla de cada reactor y se extendía con espátula de Drigalsky. Las placas de Petri inoculadas se incubaban a 30°C durante siete días. Concluido este periodo, se contaban las colonias desarrolladas (Hugh y Leifson, 1953.) A continuación, se esquematiza de forma sintética el proceso llevado a cabo (Figura 2.10).

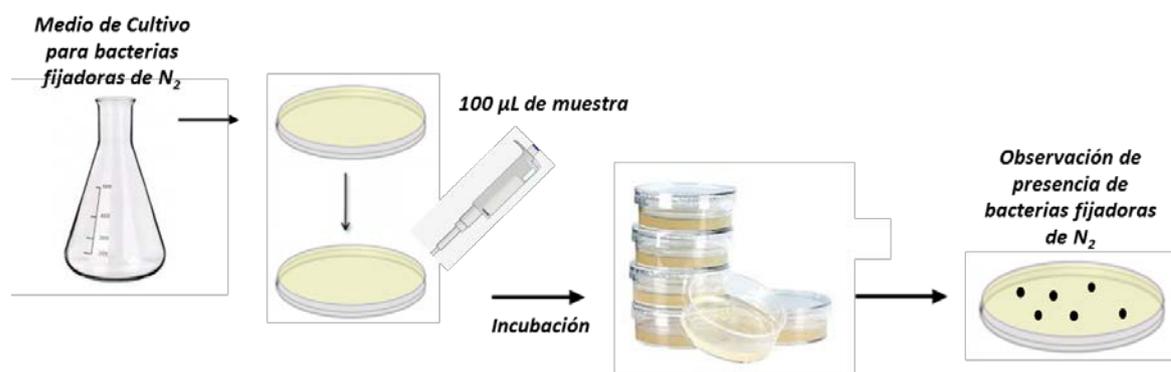


Figura 2.10: Detección de bacterias fijadoras de nitrógeno

B- Bacterias nitrificantes oxidantes de amonio y de nitrito: Se utilizó una solución estándar compuesta por: K_2HPO_4 (5 g.L^{-1}), $MgSO_4$ (2.5 g.L^{-1}), NaCl (2.5 g.L^{-1}), $Fe_2(SO_4)_3$ (0.05 g.L^{-1}) y $MnSO_4$ (0.05 g.L^{-1}). Para los microorganismos oxidantes de amonio se utilizó 50 mL de la solución estándar descrita y se le adicionó $(NH_4)_2SO_4$ (0.5 g.L^{-1}), $CaCO_3$ (1 g.L^{-1}) y agua destilada (950 mL). Para los microorganismos oxidantes de nitrito se utilizó 50 mL de la solución estándar y se le adicionó $NaNO_2$ (1 g.L^{-1}), $CaCO_3$ (1 g.L^{-1}) y agua destilada (950 mL). Estos medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Capítulo 2

Los medios de cultivo esterilizados (5 mL) se colocaron en diferentes tubos de ensayo. Se hicieron tres diluciones seriadas del licor de mezcla y se colocó en cada tubo un volumen de 100 μ L de cada una de ellas. Finalmente, las mismas se incubaron en estufa a 30°C durante 21 días. Concluido el tiempo de incubación, se procedió al revelado de las muestras.

Para evidenciar la oxidación de nitrito a nitrato (Figura 2.11) se agregó en un portaobjetos una gota de la dilución correspondiente junto con una gota del reactivo A (solución de α -naftilamina), y otra del reactivo B (solución de ácido sulfanílico 0.8%). Luego de 30 segundos se leyó el resultado de la siguiente forma: positivo era indicado cuando no había desarrollo de color (+ incoloro) y negativo mediante la observación de color rojo/rojo-amarillo (-color). Asimismo, este estudio se utilizó para observar la presencia de bacterias desnitrificantes, a partir de la adición de polvo de cinc (Zn) a los tubos positivos (incoloros). Donde nuevamente el revelado indicaba positivo cuando no había desarrollo de color (+ incoloro) y negativo la formación de color rosado a rojo (- color) (Fadin y col, 1980).

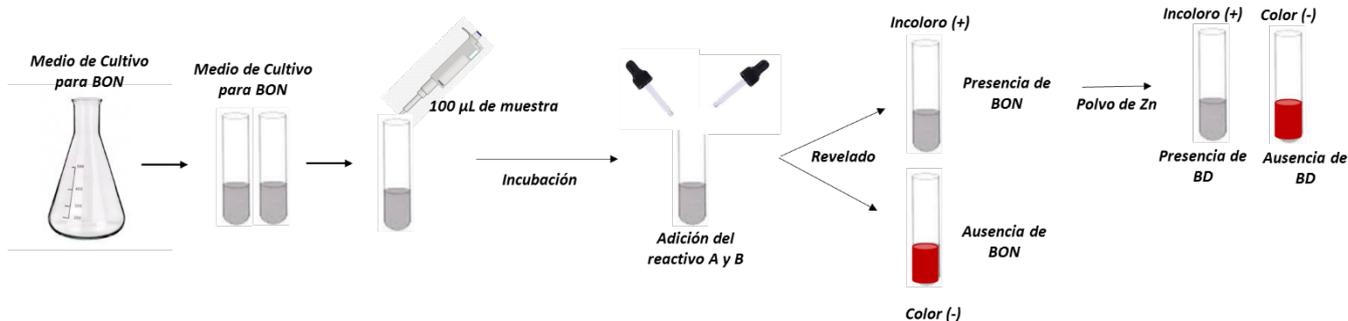


Figura 2.11: Detección de la presencia de bacterias oxidantes de nitrito y bacterias desnitrificantes

Para evidenciar la oxidación del amonio a nitrito (Figura 2.12) se repitió el mismo protocolo que para los oxidantes de nitrito, con la siguiente lectura del revelado el cual indicaba positivo si había formación de color (+ color) y negativo cuando no se observaba coloración (- incoloro) (Hugh y Leifson, 1953.)

Capítulo 2

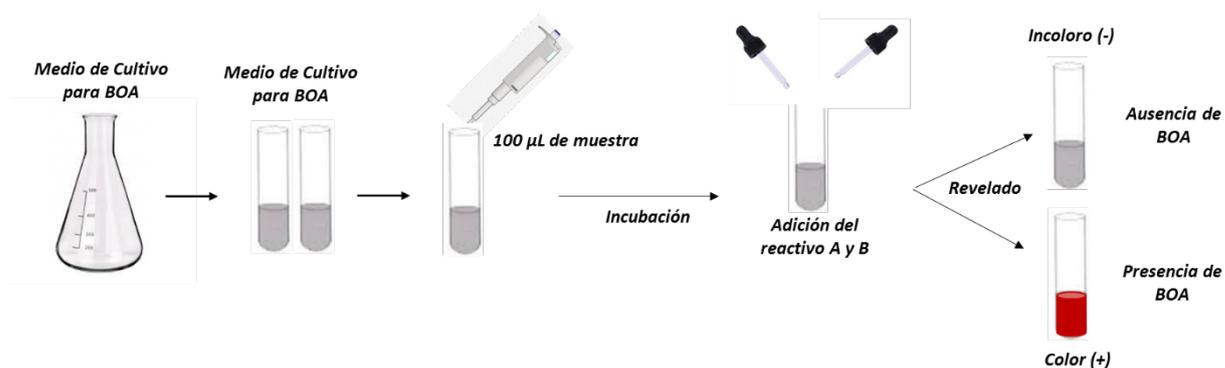


Figura 2.12: Detección de presencia de bacterias oxidantes de amonio

C- Bacterias desnitrificantes: Para determinar este grupo de microorganismos (Figura 2.13) se utilizó un medio de cultivo rico en peptona (5 g.L^{-1}), extracto de carne (3 g.L^{-1}) y KNO_3 (1 g.L^{-1}). Para este ensayo el medio de cultivo fue fraccionado en 5 mL en tubos de ensayo con campana durham y luego esterilizado entre 15 y 20 minutos en autoclave a 121°C .

Se realizaban tres diluciones seriadas del licor de mezcla de cada reactor bajo mechero para conservar las condiciones de esterilidad. Luego se sembraban las diluciones ($100 \mu\text{L}$) en los tubos esterilizados con campana de Durham. Se registró la presencia (tubos positivos) o ausencia (tubos negativos) de burbujas de gases de nitrógeno (Tiedje JM, 1994).

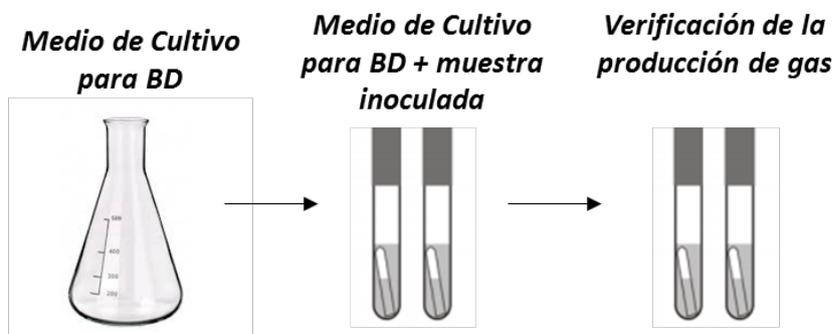


Figura 2.13: Detección de la presencia de bacterias desnitrificantes

2.14 EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO MICROBIANO

Se extrajo el ADN genómico microbiano por duplicado de muestras de los biorreactores para diferentes condiciones experimentales, utilizando un kit de ADN marca E.Z.N.A (OMEGA, EE. UU.)

Capítulo 2

Para la extracción se siguió el protocolo del fabricante según se detalla a continuación:

a- En primer lugar, se centrifugaron 50 mL del licor de mezcla de cada reactor a 10.000 rpm durante 10 minutos.

b- 1 mL del pellet resultante (gránulos) fue lavado dos veces con agua destilada.

c- El pellet lavado fue resuspendido en 480 μL de EDTA 50 mM con 120 μL de lisozima ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y mezclado lentamente. Luego la mezcla fue incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 minutos.

d- Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 16.000 g durante 2 minutos y el sobrenadante fue eliminado.

El propósito de este tratamiento previo consistió en debilitar la pared celular para producir una lisis eficiente.

e- El pellet resultante fue resuspendido suavemente en un volumen de 600 μL de solución de lisis (solución de proteasas) y fue incubado a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos.

f- Finalmente la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 3 μL de la solución RNAasa, invirtiendo los tubos 2 a 5 veces para mezclar. Seguido a esto, los tubos con las muestras se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

g- Se les agregó 200 μL de la solución de precipitación de proteínas a los lisados celulares obtenidos y se mezcló en vórtex durante 20 segundos.

h- Las muestras fueron luego incubadas en frío (hielo) durante 5 minutos, para luego ser centrifugadas a 16.000 g durante 3 minutos.

Los sobrenadantes que contenían el ADN se transfirieron a un tubo microcentrífuga de 1.5 mL de volumen y se agregaron 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente con el objetivo de precipitar el ADN. Posteriormente se mezclaron lentamente invirtiendo los tubos hasta observar filamentos de ADN y se centrifugaron a 16.000 g durante 2 minutos. Los sobrenadantes obtenidos de esta última centrifugación se extrajeron cuidadosamente y los tubos con los pellets resultantes fueron invertidos y secados en papel absorbente limpio.

Una vez secos los pellets de ADN, fueron lavados con un volumen de 600 μL de etanol al 70% a temperatura ambiente, invirtiendo los tubos suavemente. Posteriormente se centrifugaron a 16.000 g durante 2 minutos y se descartaron los sobrenadantes.

Capítulo 2

Los pellets resultantes de ADN se dejaron secar al aire durante 15 minutos. Una vez seco el ADN de cada tubo fue rehidratado agregando un volumen de 100 μ L de la solución de rehidratación y los tubos fueron incubados overnight a 4°C. Cumplido el tiempo de incubación, los tubos con las muestras fueron almacenados a -80 °C hasta su posterior análisis.

Las muestras purificadas fueron amplificadas en termociclador mediante la técnica de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica consistió en 30 ciclos (5 ciclos en productos de PCR) utilizando un kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, EE. UU.) bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 3 minutos, seguido de 28 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 40 segundos y por último 72 °C durante 1 minuto, después de lo cual se realizó un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Después de la amplificación, los productos de PCR se verificaron en gel de agarosa al 2% para determinar el éxito de la amplificación y la intensidad relativa de las bandas. A continuación, en la Figura 2.14 se detalla un esquema que resume el proceso llevado a cabo en los laboratorios del Instituto CINDEFI.

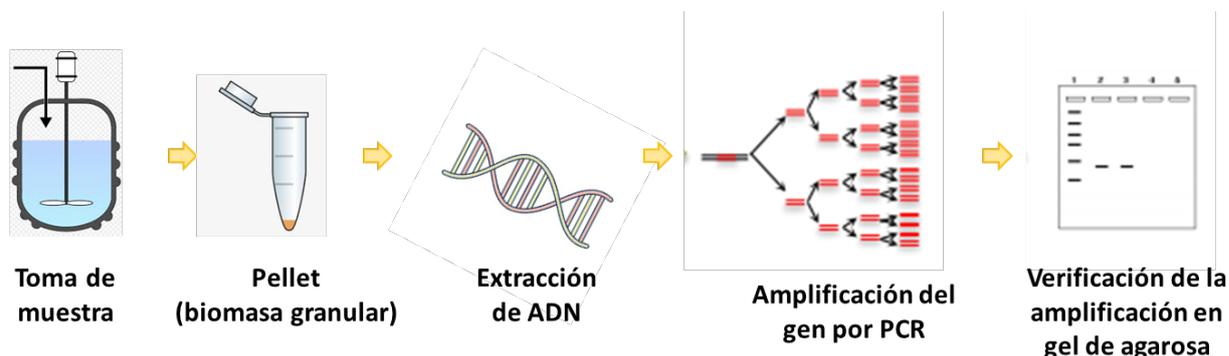


Figura 2.14. Procedimiento para el análisis de las comunidades bacterianas con un enfoque basado en PCR

La secuenciación para el posterior análisis de la diversidad bacteriana de cada muestra se realizó en el Molecular Research Laboratory (MR DNA; Shallowater, TX) utilizando la técnica de next-generation sequencing (NGS) por Illumina a partir de un equipo HiSeq siguiendo las pautas del fabricante. La región hipervariable V3 del gen 16S rARN se amplificó en termociclador marca Eppendorf, usando la combinación de cebadores 341F / 518R 5'CCTACGGGAGGCAGCAG3 'y 5'ATTACCGCGGCTGCTGG 3' (Li y col, 2009).

Capítulo 2

2.15 ESTUDIO DEL CONSORCIO MICROBIANO GRANULAR

2.15.1 Aplicación del software para el filtrado y análisis bioinformático de las lecturas obtenidas en el equipo HiSeq.

Luego de obtener los datos enviados por MR DNA se llevó a cabo un análisis mediante técnicas bioinformáticas a partir del conjunto de datos del gen ARNr 16S con el objetivo de determinar la diversidad y funciones metabólicas potenciales de la comunidad microbiana de cada sistema estudiado. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron bases de datos y se realizaron los análisis que se presentan a continuación.

El KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) es una colección de bases de datos en línea de genomas, rutas enzimáticas, y químicos biológicos (grupos ortólogos), llamados KO, que corresponden a los nodos de los mapas de ruta KEGG. La base de datos PATHWAY registra las redes de interacciones moleculares dentro de las células, y variantes de ellas específicas a organismos particulares. Las secuencias o genes ortólogos son aquellas secuencias homólogas que se han separado por un evento de especiación. Es decir, cuando una especie diverge en dos especies separadas, se dice que las copias divergentes de un mismo gen en las especies resultantes son ortólogos. En otras palabras, las secuencias ortólogas son las secuencias que se encuentran en diferentes especies y que son altamente similares debido a que se han originado en un antepasado común.

La evidencia más concluyente de que dos genes similares son ortólogos es el resultado del análisis filogenético sobre el linaje de ese gen. Los genes ortólogos descienden del mismo ancestro y usualmente, pero no siempre, tienen la misma función.

Las secuencias ortólogas proveen información útil en taxonomía y en estudios filogenéticos. Puede utilizarse el patrón de divergencia genética para inferir las relaciones existentes entre especies. Dos especies que se hallan estrechamente relacionadas tendrán secuencias de ortólogos altamente similares. Por el contrario, dos especies filogenéticamente alejadas presentarán una gran divergencia en la secuencia de los genes o secuencias ortólogas bajo estudio.

Cada entrada KO se identifica por el identificador único llamado número K ('K' seguido de un número de cinco dígitos). A los genes en genomas completos se les asignan los números K tanto computacionalmente como manualmente. El sistema KO es la base para vincular información genómica con información funcional sistémica de nivel superior a través de los procesos de mapeo KEGG. A partir de esto y con el fin de estimar la

Capítulo 2

abundancia de taxones bacterianos y los roles funcionales en términos de KO para diferentes condiciones experimentales de los bioreactores, se analizó por duplicado el conjunto de datos de los fragmentos de genes de ARNr 16S amplificados, del ADN microbiano extraído utilizando el flujo de trabajo Microbiome Helper (Comeau y col, 2017): esto incluye el uso de QIIME (Caporaso y col, 2010) (una fuente online abierta de bioinformática para realizar análisis de microbiomas), FastQC (v0.11.5) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y PEAR (v0.9.10) (Zhang y col, 2014) en los primeros pasos para evaluar marcos de lectura sin procesar, identificar marcos de lecturas ambiguos y unirlos. Luego se procedió a la detección y eliminación de secuencias quiméricas utilizando la herramienta de código abierto VSEARCH (v1.11.1) (Rognes y col, 2016) y el algoritmo UCHIME (Edgar y col, 2011) respectivamente.

Las secuencias quiméricas pueden formarse durante los diferentes ciclos del proceso de amplificación del ADN si dos o más moléculas diferentes de ADN se unen dando lugar a una secuencia híbrida que, en caso de no ser eliminada, generaría falsa diversidad en el análisis (Edgar y col, 2011).

Luego se determinó para cada muestra analizada (y su duplicado) las unidades taxonómicas operativas de referencia (OTU, operational taxonomic unit) al 97% de identidad utilizando SortMeRNA (herramienta de alineación de secuencia local para el filtrado, mapeo y selección de OTU) (Kopylova y col, 2012) y SUMACLUSt (aplicación de agrupación de secuencias) (Mercier y col, 2013) agrupando los marcos de lectura en la base de datos Greengenes. Un paso muy importante es la normalización de la Tabla de OTUs. La variabilidad por muestra es muy grande por lo tanto para hacer comparable el número de secuencias que pertenecen a cada OTU entre las distintas muestras es preciso llevar a cabo una normalización de la Tabla de OTUs, eliminando las OTUs de baja confianza; es decir que el número total de secuencias para todas las muestras sea constante. La Tabla de OTUs normalizada se empleó en pasos posteriores para determinar la composición relativa a nivel taxonómico de clase, orden, filo, y género de cada muestra.

2.15.2 Análisis de la diversidad microbiana

Entre los estudios llevados a cabo mediante estas técnicas bioinformáticas se evaluó la diversidad de cada muestra ensayada, lográndose obtener las curvas de rarefacción (técnica de evaluación de la riqueza de especies de una muestra) y el índice de

Capítulo 2

diversidad (índice de Shannon) utilizando el software Qiime1 a partir del script `alpha_rarefaction.py` (Kim y col, 2017).

Los análisis de rarefacción permiten la comparación de la diversidad entre diferentes muestras que difieren en número de secuencias y la extrapolación de la diversidad calculando el número hipotético de especies en una muestra a través de diferentes índices estimadores de riqueza (como por ejemplo el índice de Shannon). Las curvas de rarefacción presentan, para distintos números de secuencias, la cantidad y composición de especies diferentes que se pueden encontrar en las distintas muestras o en agrupaciones de las mismas.

El índice de Shannon representa una medida cuantitativa que refleja la estructura de la comunidad microbiana dada por la abundancia, la riqueza de unidades taxonómicas (como las especies) y la relación de dominancia. Matemáticamente, el índice de Shannon se calcula por medio de la siguiente expresión:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \times \log_2 p_i) \quad (2.13)$$

En la ecuación 2.13, la variable i representa la especie, la variable S representa la riqueza de especies (número de especies), p_i representa la abundancia relativa de la especie i , calculada como el número de secuencias de cada especie dividido por el número total de secuencias en la muestra. De esta manera, el índice cuantifica la incertidumbre en la predicción de la identidad de la especie de un individuo que es tomado al azar de una muestra (Pla y col, 2006).

2.15.3 Predicción funcional en PICRUSt

Se llevó a cabo una investigación filogenética de las comunidades correspondientes a las diferentes condiciones experimentales de los reactores, cuyo ADN fue extraído, mediante la reconstrucción de estados no observados a partir de PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States). Este constituye un paquete de software de bioinformática diseñado para predecir el contenido funcional del metagenoma o bien de las bacterias identificadas mediante la secuenciación del gen rARN 16S (Langille y col, 2013).

Capítulo 2

Durante el flujo de trabajo de Qiime se formó un archivo de extensión .BIOM, el cual es requisito para usarse como entrada en PICRUSt (Langille y col, 2013). PICRUSt (v1.1.0) permite inferir el potencial funcional de las comunidades procariotas en términos de ortología y vías KEGG y permite la predicción filogenética de los organismos (Langille y col, 2013). La Tabla OTUs generada con Qiime1 (explicado en la sección anterior) se utilizó como archivo de entrada para la predicción filogenética de los organismos hallados en el sistema, obteniéndose como archivo de salida la abundancia de los KO (asociados a cada muestra) y su asociación a cada ruta metabólica.

Los pasos principales para el protocolo del análisis bioinformático por PICRUSt para cada muestra analizada y su duplicado incluyen los siguientes pasos:

1. Reducir la Tabla de OTU a solo las OTU de referencia (eliminando las de novo, originadas en regiones genómicas que no contienen previamente ningún gen de referencia).
2. Normalizar la Tabla de OTUs en función del número de copias del gen de ARNr 16S que predice el algoritmo de PICRUSt para cada OTU. Predecir abundancias de ortología KEGG (KO) en cada muestra.
3. Agrupar los KOs en función de la ruta metabólica en que están implicados (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa y Goto, 2000)
4. Relacionar los OTU que contribuyen a cada KO de interés.

Asimismo, se utilizó el programa STAMP (v2.1.3) y PINCH2 (v2.0.1) para la visualización de datos y los posteriores análisis estadísticos (Parks y col, 2014). Se obtuvo el Nearest Sequenced Taxon Index (NSTI) score para cada muestra, que correspondió al índice de taxón obtenido para cuantificar la disponibilidad de representantes genómicos cercanos para cada muestra de microbioma. En síntesis, NSTI corresponde al promedio de las distancias filogenéticas para cada organismo con sus parientes (organismos vecinos) obtenidos de un genoma de referencia secuenciado, medido en términos de sustituciones por sitio en el gen rARN 16S y ponderado por la frecuencia de ese organismo en la Tabla de OTUs. Este índice fue utilizado como indicador de la precisión de PICRUSt (Langille y col, 2013).

Generalmente la precisión de PICRUSt disminuye al aumentar el NSTI en las muestras. Cabe destacar que la capacidad de calcular valores NSTI dentro de PICRUSt a partir de datos obtenidos por el análisis del gen 16S permite a los usuarios determinar si

Capítulo 2

sus muestras se pueden analizar mediante predicción por PICRUSt para predecir roles funcionales potenciales de la comunidad microbiana analizada (Langille y col, 2013).

En la Figura 2.15 se detalla un esquema sintético del flujo de trabajo realizado para la determinación de los consorcios microbianos de los SBRs.

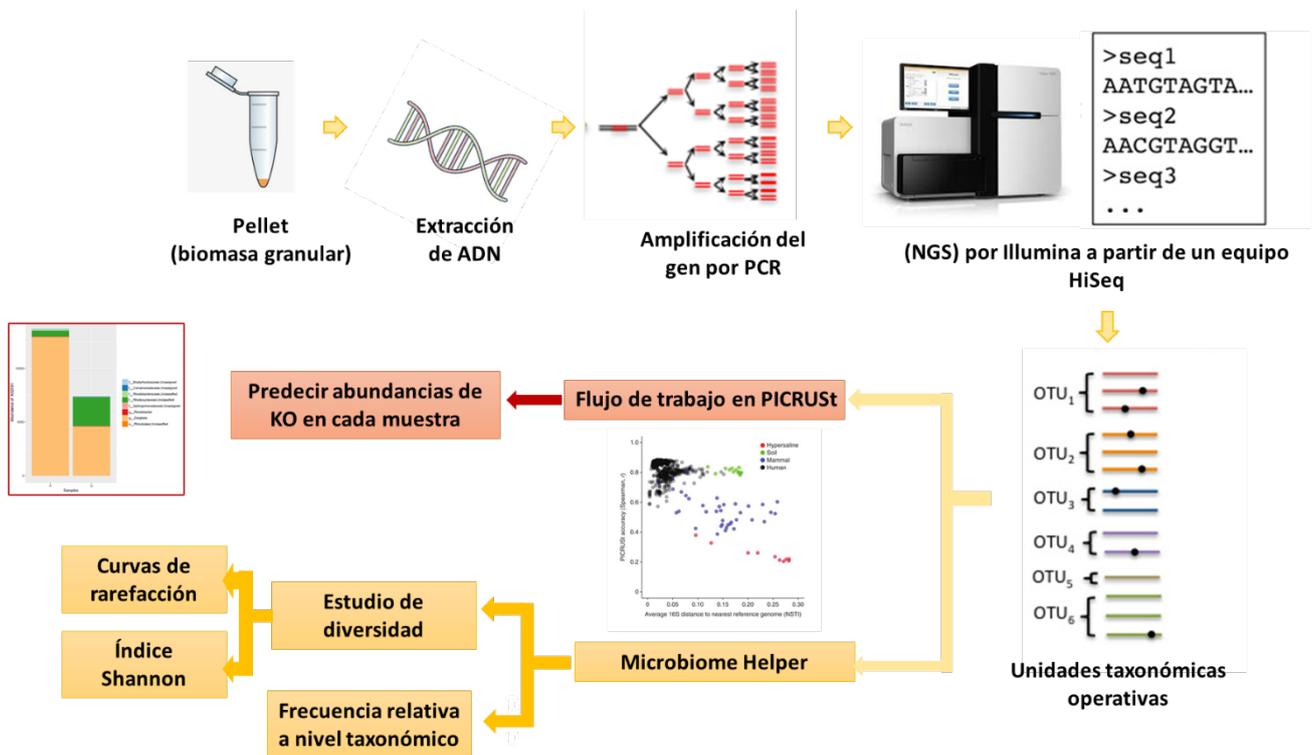


Figura 2.15: Flujo de trabajo realizado para la determinación de los consorcios microbianos de los SBRs

CAPÍTULO 3

BIOGRANULACIÓN, ESTABILIDAD Y MONITOREO DEL
SBR AERÓBICO EN EL TRATAMIENTO DE UN EFLUENTE
FÁCILMENTE BIODEGRADABLE BASADO EN ACETATO DE
SODIO Y NITRÓGENO AMONIACAL

Capítulo 3

CAPÍTULO 3: BIOGRANULACIÓN, ESTABILIDAD Y MONITOREO DEL SBR AERÓBICO EN EL TRATAMIENTO DE UN EFLUENTE FÁCILMENTE BIODEGRADABLE BASADO EN ACETATO DE SODIO Y NITRÓGENO AMONICAL

3.1 OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar la remoción simultánea de carbono orgánico y nitrógeno en sistemas granulares aeróbicos considerando los siguientes aspectos: estabilidad granular y funcional, procesos biológicos y monitoreo. Para ello se utilizó un SBR alimentado, bajo régimen “feast/famine”, con un efluente sintético fácilmente biodegradable basado en acetato de sodio y sulfato de amonio. Se espera que bajo régimen “feast/famine” y condiciones completamente aeróbicas resulte favorecido el proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS) aeróbica.

Objetivos específicos:

- Evaluación de la remoción simultánea de carbono orgánico y nitrógeno en el SBR granular aeróbico.
- Evaluar la estabilidad del SBR considerando el tamaño granular y la cinética de remoción de carbono orgánico y nitrógeno.
- Proponer un balance de masa de carbono orgánico y nitrógeno para cuantificar los procesos de crecimiento heterótrofo, nitrificación y NDS.
- Proponer un método simple de control de los procesos de remoción de carbono orgánico y nitrógeno en el SBR basado en la técnica de titulación y balance de protones.

3.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA NITRIFICACIÓN

Los principales factores que afectan la nitrificación son temperatura, pH, alcalinidad (concentración de carbonato y bicarbonato), concentración de oxígeno disuelto (OD) y nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$), relación de materia orgánica/nitrógeno amoniacal y la presencia de sustancias inhibitoras como amoníaco libre (FA, free ammonia), ácido nitroso libre (FNA, free nitrous acid), hidroxilamina libre y sulfuro, entre otras, que pueden afectar la actividad BOA (bacterias oxidantes de amonio) y BON (bacterias oxidantes de nitrito) de diferente manera (Rodríguez-Gomez y col, 2019; Correa y col, 2018).

Capítulo 3

3.2.1 Temperatura

La temperatura influye en la velocidad específica de crecimiento tanto de BOA como de BON. A temperaturas comprendidas entre 10 y 20 °C, la velocidad específica de crecimiento de BON es mayor a las de BOA, provocando una baja acumulación de nitrito (Peng y Zhu, 2006). A 20–25 °C se observa una disminución de la actividad de nitratación (BON) junto con un aumento de la actividad de nitrificación (BOA). A temperaturas superiores a 25 °C, es posible que la actividad BOA supere a BON, siendo 25-35 °C el rango de temperatura óptimo para la acumulación de nitrito (Peng y Zhu, 2006; Rodriguez-Gomez y col, 2019).

3.2.2 pH

La nitrificación se ve fuertemente afectada por el pH del sistema. El pH óptimo para la nitrificación se encuentra entre 7.5 y 9.0 (Cheng y col, 2016; Rodriguez-Gomez y col, 2019), alcanzándose una actividad máxima de las bacterias oxidantes de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ a pH= 8.0 (Rodriguez-Gomez y col, 2019).

3.2.3 Alcalinidad

Se ha propuesto una relación estequiométrica de $7.1 \text{ g CaCO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \text{ NH}_4^+\text{-N}$ oxidado y, en consecuencia, se ha informado que la falta de carbonato detendría la nitrificación (Rodriguez-Gomez y col, 2019).

3.2.4 Oxígeno Disuelto (OD)

Las bacterias nitrificantes presentan un alto consumo de oxígeno para la conversión de amonio en nitrato ($4.57 \text{ g O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ NH}_4^+\text{-N}$ oxidado) (Rodriguez-Gomez y col, 2019). La concentración de OD constituye un factor limitante clave para el crecimiento de BOA y BON. Una concentración de OD de $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ limita la actividad tanto de BOA como de BON, lo que llevaría a una acumulación de amonio y nitrito (Ruiz y col, 2003; Guo y col, 2008). Se informó que el nivel de oxígeno para la acumulación de nitrito estaría en el rango de $0.5\text{--}1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ OD y que por encima de un OD de $1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ se lograría la nitrificación completa hasta nitrato (Rodriguez-Gomez y col, 2019).

Capítulo 3

3.2.5 Relación DQO:N

En la nitrificación, la relación materia orgánica/nitrógeno amoniacal, expresada comúnmente como relación DQO:N, es un factor crítico para la inhibición de las bacterias nitrificantes. Los compuestos orgánicos tienden a inhibir el proceso de nitrificación a través de la competencia por oxígeno entre organismos nitrificantes y microorganismos que degradan materia orgánica, ya que estos últimos tienen una mayor afinidad por el oxígeno, por lo tanto, a menor relación materia orgánica/NH₃-N, mayor será el crecimiento de bacterias nitrificantes (Yadu y col, 2018; Rodriguez-Gomez y col, 2019).

3.2.6 Amonio libre (FA) y Ácido nitroso libre (FNA)

El amoníaco libre (FA) y el ácido nitroso libre (FNA, HNO₂) exhiben efectos inhibitorios sobre los metabolismos de las bacterias oxidantes de amoníaco y nitrito (Vadivelu y col, 2006). Las concentraciones de estos compuestos se ven afectadas por la temperatura y el pH en el sistema en estudio (Anthonisen y col, 1976).

Se ha informado que las susceptibilidades de las especies BOA y BON a FA y FNA difieren entre sí (Blackburne y col, 2006), lo que significa que existen rangos de concentración de FA y FNA que solo inhibirían la oxidación de NO₂.

Por un lado, FA es inhibidor de los procesos de oxidación de amonio y nitrito durante la nitrificación (Anthonisen y col, 1976). Se han encontrado niveles de inhibición variables en la nitrificación. FA ha presentado una inhibición más fuerte en la oxidación de nitrito que en la oxidación de amonio (Liu y col, 2019).

Por otro lado, se ha demostrado que FNA presenta una elevada eficiencia para eliminar BON, indicando que podría presentar mayor actividad inhibitoria para BON que para BOA (Wang y col, 2014 a,b). Sin embargo, aún la bibliografía que respalda la susceptibilidad de la mayoría de las especies BOA a FA y FNA es sumamente limitada (Kinh y col, 2016).

Por último, se ha informado que existe una correlación entre la presencia de hidroxilamina libre, un intermediario en la nitrificación por BOA, y la baja actividad nitrificante (Peng y col, 2006; Rodriguez-Gomez y col, 2019). Este compuesto podría inhibir tanto el proceso de oxidación de amoníaco como de nitrito (Wan y col, 2016).

Capítulo 3

3.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA DESNITRIFICACIÓN

Existen una variedad de factores que pueden influir en el proceso de desnitrificación, entre ellos se encuentran: temperatura, pH, oxígeno disuelto, relación DQO:N, FA y FNA, la concentración de nitrato en el agua a tratar, la cantidad y calidad de carbono orgánico. (Sirivedhin and Gray, 2006). Todos estos factores están estrechamente unidos, de tal forma que el cambio en un factor daría como resultado un cambio en los restantes (Sirivedhin and Gray, 2006).

La diversidad, estructura y actividad metabólica de una comunidad bacteriana desnitrificante se ve muy afectada por las diferencias en distintos factores como la fuente de carbono, el oxígeno y la salinidad (Rajta y col, 2019).

3.3.1 Temperatura

La temperatura es uno de los principales parámetros en el control del proceso de desnitrificación. Se ha informado que la desnitrificación no es posible por debajo de una temperatura de 5°C, observándose la mejor actividad desnitrificante en estaciones de verano (Stanford y col, 1975; Sirivedhin and Gray, 2006); sin embargo, otros trabajos han medido cierta actividad desnitrificante a 4 °C, aunque a tasas mucho más lentas (Richardson y col, 2004).

La temperatura adecuada para la desnitrificación aeróbica se encuentra en el rango mesofílico de 25-37 °C (Li y col, 2018). Sin embargo, los microorganismos psicrófilos y termófilos también se han explorado por su potencial en la eliminación de nitrógeno (He y col, 2018). Las bajas temperaturas pueden reducir la eficiencia de desnitrificación de diferentes organismos (Lakha y col, 2009). Por último, también se ha informado que bacterias termófilas utilizan amoníaco y nitrato a temperaturas muy altas de 50 °C (Takenaka y col, 2007). Esto indica que existen varios microorganismos que pueden llevar a cabo la desnitrificación aeróbica a diferentes temperaturas (Rajta y col, 2019).

3.3.2 pH

El pH es otro de los factores críticos en el proceso de desnitrificación. A medida que el nitrato se agota durante este proceso, aumenta el pH (Ji y col, 2015). El pH neutro a alcalino (7-8) se considera óptimo para la desnitrificación (Li y col, 2018).

Capítulo 3

3.3.3 Oxígeno disuelto (OD)

El oxígeno disuelto (OD) es otro de los factores que afecta al proceso de desnitrificación. Inicialmente se creía que la desnitrificación era un proceso estrictamente anóxico y que la actividad de las enzimas involucradas en el proceso se inhibía en presencia de oxígeno. Además, en presencia de nitrato y oxígeno, los microorganismos seleccionan el oxígeno como su receptor terminal de electrones debido a que la respiración aeróbica produce un mayor rendimiento energético que la desnitrificación. Sin embargo, desde hace algunos años se ha informado que especies como *Paracoccus pantotrophus* (anteriormente denominada *Paracoccus denitrificans* y *Thiosphaera pantotropha*) posee enzimas desnitrificantes activas incluso a concentraciones de oxígeno disuelto de 80-90% (Robertson y col, 1988). Desde entonces, se han realizado muchos estudios para comprender el efecto del oxígeno sobre el crecimiento y la eficiencia de desnitrificación de varias bacterias desnitrificantes y se ha observado que algunas de ellas pueden tolerar altas concentraciones de oxígeno (Rajta y col, 2019). Esto induce a pensar que el efecto de la concentración de oxígeno disuelto en la desnitrificación depende de los microorganismos. Incluso las mismas especies de desnitrificantes aeróbicos pueden diferir en su capacidad de desnitrificación bajo diferentes niveles de oxígeno disuelto (Rajta y col, 2019).

3.3.4 Fuentes de carbono adecuadas y relación DQO: N

Respecto a la fuente de carbono, cabe destacar que los desnitrificantes heterotróficos requieren carbono orgánico para dos fines fundamentales, uno de ellos es utilizarlo para crecimiento celular y el otro como donador de electrones en el proceso de desnitrificación. Diversas fuentes de carbono, como glicerol, glucosa, succinato, etanol, sacarosa, metanol, formiato, acetato y piruvato de sodio, pueden ser utilizadas en este proceso. La elección correcta de una fuente de carbono que sea barata y adecuada es requisito para una desnitrificación eficiente (Rajta y col, 2019).

Los polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poli-3-hidroxi-butírico (PHB) y la policaprolactona también se usan como fuentes de carbono, y tienen una alta eficiencia de desnitrificación con una liberación mucho menor de carbonos orgánicos disueltos que las fuentes de carbono natural. Sin embargo, su uso es bastante caro (Hiraishi y Khan, 2003). Muchas especies heterótrofas tienen la capacidad de

Capítulo 3

almacenar reservas de energía en forma de PHB, con el fin de ser utilizado para el crecimiento y mantenimiento de la biomasa (Oehmen y col, 2007). Estos microorganismos tienen la capacidad de utilizar el PHB intracelular como fuente de carbono para desnitrificar (Zeng y col, 2004).

Otro de los factores que influye en el proceso de desnitrificación es la relación carbono/nitrógeno (DQO:N o C:N), la cual es una medida de la relación donante de electrones a receptor. Para que tenga lugar una desnitrificación efectiva se requiere el uso de una dosis apropiada de fuente de carbono (Obaja y col, 2005). Si el carbono está presente en una cantidad menor, el flujo de electrones no puede cumplir con los requisitos de energía para el crecimiento celular y, como resultado, la desnitrificación se ve afectada. Sin embargo, si la cantidad de carbono está por encima de la concentración óptima, entonces el aumento en la tasa de desnitrificación es muy limitado (Huang y col, 2001) y el carbono orgánico excedente puede ser descargado al ambiente con el efluente final. Se ha indicado que una baja relación de DQO:N (menor a 6-8), requiere la adición una fuente de carbono externa para lograr una completa desnitrificación de NO_x (NO_2^- , NO_3^-) producido en el proceso de nitrificación (Jin y col, 2012).

La relación C:N óptima para lograr una desnitrificación adecuada es específica para cada organismo heterotrófico (Kim y col, 2008). En general, la mayoría de las bacterias heterotróficas requieren una relación DQO:N que se encuentre en el rango de 8-16 (Kim y col, 2008; Zhang y col, 2019b).

3.3.5 Impacto de FA y FNA en la desnitrificación

En general, FA podría tener un efecto inhibitorio sobre los desnitrificantes comparable a BOA y BON (Liu y col, 2019). Si bien existen pocos estudios sobre el impacto de FA sobre el proceso de desnitrificación, Yang y col, (2018) informaron que la exposición de lodo activado a FA de 16 mg de $\text{NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ durante 1 día disminuyó la actividad desnitrificante en un 36%.

Al igual que en el caso de los nitrificantes, es probable que el umbral de inhibición de FNA sea una función de las características de la comunidad microbiana, así como de otros factores operativos. Se ha sugerido que la actividad de reducción de nitrato es inhibida 40% a concentraciones iniciales de FNA entre 0.01 y 0.025 mg $\text{HNO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ y 100% a 0.2 mg $\text{HNO}_2\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ma y col, 2010).

Capítulo 3

3.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA NDS

La NDS permite reducir el tamaño del reactor y prescindir de la utilización de tanques separados ya que, como se ha observado en muchos estudios, las velocidades de nitrificación y desnitrificación son similares a las de los sistemas convencionales (tanques separados). Esta ventaja permitiría simplificar drásticamente el diseño general del proceso.

Los factores principales que influyen en el proceso de NDS son: la fuente de carbono (acetato, glucosa y metanol son las utilizadas mayoritariamente y con las cuales se han observado resultados exitosos), la relación DQO:NTK (en una relación de 7) la concentración de oxígeno y el tamaño de los flóculos y/o gránulos. Third (2003) ha informado que el tamaño del flóculo o gránulo influye sobre el OD requerido, observando que cuanto más pequeño son los flóculos menores porcentajes de NDS se obtienen, debido a que este proceso depende de las zonas aeróbicas y anóxicas que se generen dentro del gránulo.

Los sistemas NDS con desnitrificación aeróbica no requieren el control estricto de la concentración de oxígeno y el tamaño de los agregados microbianos no afectaría de forma significativa la eficiencia del proceso. Estas constituyen ventajas que permiten simplificar la operación y control del proceso NDS (Dutta and Sarkar, 2015).

3.5 MONITOREO DE SISTEMAS PARA REMOCIÓN DE CARBONO Y NITRÓGENO

Actualmente se ha informado que muchos consorcios microbianos heterótrofos presentan elevadas capacidades de remoción de nitrógeno mediante el proceso de NDS (Guisasola y col, 2007). Los sistemas biológicos enriquecidos en nitrificantes heterotróficos podrían ofrecer muchas ventajas, como una excelente nitrificación y capacidad de NDS. Sin embargo, la estabilidad de estos sistemas puede verse alterada por deficiencias en la aireación, cambios de pH y entrada de tóxicos, lo que podría causar un efecto irreversible. La detección temprana de fallas es particularmente importante para aquellos procesos biológicos más susceptibles como la nitrificación. La aplicación de estrategias de control para algunos procesos biológicos clave permitiría el funcionamiento óptimo del reactor. La titulación es un método sencillo y económico que se ha propuesto para el seguimiento de procesos biológicos (Guisasola y col, 2007). Este método consiste en la medición indirecta de la tasa de consumo o producción de protones mediante la cuantificación de los volúmenes de ácido o base respectivamente, que se dosifican al reactor para mantener un

Capítulo 3

pH constante. Esto es posible porque los procesos biológicos influyen fuertemente en el pH del medio ambiente.

3.6 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD METABÓLICA DE BOA Y BON MEDIANTE RESPIROMETRÍA

La respirometría es la medida de la tasa de consumo biológico de oxígeno y se ha utilizado ampliamente para el seguimiento de procesos biológicos aeróbicos. Guisasola y col. (2004) mostró el vínculo existente entre las mediciones de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y los procesos biológicos en un SBR aeróbico. Los ensayos respirométricos permiten estimar los parámetros cinéticos de la nitrificación mediante la obtención de medidas respirométricas, basadas en el agotamiento de oxígeno por consumo de sustrato, para lodos activados (Surmacz-Gorska, y col, 1995) o biopelículas. Para cultivos mixtos que contienen microorganismos oxidantes de amoníaco y nitrito, se necesitan inhibidores selectivos que permitan la separación de las diferentes actividades (Bédard y Knowles, 1989). La inhibición debe ser instantánea y completa para la población objetivo sin afectar a otras poblaciones. La alitiourea inhibe selectivamente la oxidación del amoníaco en concentraciones entre 8 y 80 mM (Hofman y Lees, 1953), probablemente por quelación del cobre del sitio activo de la monooxigenasa amoniacal (Bédard y Knowles, 1989), mientras que el clorato se utiliza para detener la oxidación de nitrito en sistemas de lodos activados (Belser y Mays, 1980). Sin embargo, es preciso destacar que las enzimas AMO (enzimas amoníaco monooxigenasas) y HAO (enzimas hidroxilamina oxidorreductasas), responsables del proceso de nitrificación en microorganismos autótrofos (BOA), también se han encontrado en microorganismos heterótrofos (Bothe y col, 2000) y por lo tanto podrían ser sensibles a los inhibidores recientemente mencionados. Las enzimas responsables de la oxidación de nitrito presentes en nitrificantes heterótrofos podrían ser también afectadas por alitiourea y clorato.

3.7 MATERIALES Y MÉTODOS

3.7.1 Efluente sintético fácilmente biodegradable y condiciones de operación

En el SBR_{ACET} se estudiaron dos condiciones experimentales definidas por la carga volumétrica de nitrógeno inorgánico. La Condición NB (nitrógeno bajo) presentó una carga volumétrica de nitrógeno de 60 mg N.(L.día)⁻¹, resultando una relación DQO:N:P de

Capítulo 3

100:10:2. La condición NA (nitrógeno alto) presentó una carga volumétrica de 90 mg N.(L.día)⁻¹, resultando una relación DQO:N:P de 100:15:2 (Tabla 3.1). Cabe destacar que ambas condiciones son favorables para el proceso de nitrificación (Rodríguez-Gomez y col, 2019).

Tabla 3.1: Cargas volumétricas de nitrógeno, fósforo y DQO (acetato) en el SBR_{ACET}

Efluente sintético	Condición	Condición
	NB	NA
Carga volumétrica de nitrógeno inorgánico (mg NH ₃ -N.(L.día) ⁻¹)	60	90
Carga volumétrica de fósforo inorgánico (mg PO ₄ ³⁻ -P.(L.día) ⁻¹)	12	12
Carga volumétrica de DQO (mg DQO.(L.día) ⁻¹)	600	600
DQO:N:P	100:10:2	100:15:2

Para ambas condiciones se utilizó un efluente sintético conteniendo sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) como fuente de nitrógeno, fosfato de potasio (K₂HPO₄ y KH₂PO₄) y una fuente de carbono orgánica fácilmente biodegradable: acetato de sodio (CH₃COONa) (Tabla 3.2), enriquecido con dos soluciones de elementos traza: M₁ y M₂ (Sección 2.2).

Capítulo 3

Tabla 3.2: Composición de los efluentes sintéticos utilizados en las Condiciones NB y NA del SBR_{ACET}

Efluente sintético	Condición NB (gr.L⁻¹)	Condición NA (gr.L⁻¹)
CH ₃ COONa	1.5660	1.5660
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5640	0.8145
KH ₂ PO ₄	0.0651	0.0651
K ₂ HPO ₄	0.0514	0.0514
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2700	0.2700
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0427	0.0427
Solución M ₁	1 mL	1 mL
Solución M ₂	1 mL	1 mL

3.7.2 Control de pH

Inicialmente se intentó controlar el pH del SBR en un rango entre 6.8 y 8.0 mediante la adición de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al efluente sintético, debido a que estos valores son los adecuados para lograr el crecimiento de microorganismos nitrificantes. Sin embargo, este método no permitió estabilizar el pH en el rango deseado. Por este motivo, se implementó el uso de un controlador automático de pH, el cual se conectó a dos bombas peristálticas para la dosificación de una solución básica de NaOH (0.5 M) y una solución ácida de H₂SO₄ (0.91 M) (Figura 2.1). Este sistema de control permitió mantener el pH en un valor constante de 7.5± 0.2 durante todo el estudio.

3.7.3 Proceso de granulación, aclimatación y estabilidad

El reactor se operó inicialmente bajo la condición experimental NB. Se utilizó un inóculo de 700 mL de lodos activados que provino de un SBR automatizado, tal como se indicó en la sección 2.3, y se adicionó un volumen de 3.9 L del efluente utilizado en esta condición (Tabla 3.2). Para favorecer la auto-inmovilización microbiana (granulación) se utilizó el procedimiento ya detallado en la sección 2.4. La biomasa fue aclimatada al efluente sintético y a las condiciones operativas del SBR (condición NB).

Capítulo 3

En la condición NA, inicialmente el SBR se inoculó con 700 mL de la biomasa granular proveniente de la condición NB y se utilizó 3.9 L del efluente sintético correspondiente (Tabla 3.2).

El SBR_{ACET}, para condiciones NB y NA, fue operado a temperatura ambiente, bajo régimen “feast/famine” y ciclos repetitivos de 24 hs compuestos por las siguientes fases: adición del medio de cultivo (2 minutos), fase de reacción aeróbica (1428 min), purga de lodos (1 minuto), fase de sedimentación (5 minutos) y extracción del sobrenadante (2 minutos). El tiempo de retención celular (TRC) fue de 20 días y el tiempo de retención hidráulico (TRH) de 2.79 días para ambas condiciones experimentales.

El período de aclimatación de los microorganismos a las condiciones operativas se extendió desde el inicio de la operación del reactor hasta alcanzar una completa remoción de carbono orgánico (100%) y buenas propiedades de sedimentación de la biomasa ($ISV < 90 \text{ mL.g}^{-1}$). La estabilidad del sistema, para cada condición experimental, fue alcanzada una vez que se lograron velocidades constantes de consumo de carbono orgánico y amonio y propiedades físicas constantes de la biomasa definidas en términos de su índice de sedimentabilidad y tamaño granular durante al menos 3 TRC.

3.7.4 Ensayos de respirometría

Se realizaron ensayos respirométricos en reactores batch, utilizando el respirómetro descrito en la sección 2.9, con el fin de evaluar la concentración umbral de toxicidad del nitrógeno (nitrógeno amoniacal y nitrito) y la actividad metabólica de los diferentes grupos de microorganismos que coexisten en el sistema (BOA, BON y bacterias heterótrofas). Estos ensayos se basaron en la determinación de la actividad respiratoria de cada grupo microbiano frente a diferentes concentraciones de la fuente de energía, nitrógeno amoniacal y nitrito para BOA y BON respectivamente, y la fuente de carbono y energía, acetato de sodio, utilizada por heterótrofos.

Se realizaron tres tipos de ensayos, uno de ellos para analizar el grupo de microorganismos oxidantes de amonio, otro para analizar el grupo de microorganismos oxidantes de nitrito y por último el grupo de microorganismos oxidantes de la fuente de carbono orgánico. Para analizar cada grupo por separado se utilizaron inhibidores con el fin de suprimir las vías de oxidación no evaluadas en cada ensayo.

Capítulo 3

Cabe destacar que para todos los ensayos que se describirán a continuación, se tomaron muestras del SBR_{ACET} bajo condiciones de estabilidad (a las 24 hs, final del período “famine”). Estos ensayos se hicieron en ambas condiciones (NB y NA) con el fin de comparar los sistemas y evaluar si se produjeron cambios en la actividad de los diferentes grupos microbianos.

A- Determinación de la actividad de las bacterias oxidantes de amonio (BOA)

Para la determinación de la actividad de las BOA mediante respirometría se llevaron a cabo diferentes ensayos batch.

Inicialmente, se tomó un volumen de 320 mL del SBR y se dejó sedimentar la biomasa granular en una probeta de 500 mL, descartándose el sobrenadante. Posteriormente, la biomasa sedimentada se centrifugó a 3000 R.P.M durante 10 min a fin de eliminar el remanente del efluente tratado. Luego se resuspendió el pellet (biomasa) en agua corriente y se centrifugó (3000 R.P.M, 10 minutos). Este lavado se realizó dos veces.

La biomasa lavada se colocó en un vaso de precipitado de 500 mL y se llevó a un volumen final de 60 mL con agua corriente. Posteriormente se le adicionó 260 mL de medio de cultivo, M.C. (Tabla 3.3). El volumen final resultante (320 ml) fue dividido en partes iguales en diferentes vasos de precipitado de 50 mL de volumen para aplicarles posteriormente a cada uno de ellos diferentes pulsos de soluciones stock de sulfato de amonio (0.35 y 4.28 M) con el fin de evaluar diferentes concentraciones de nitrógeno amoniacal (10.7-50-100-150-250-500-1000-2500 mg N.L⁻¹) en cada ensayo batch (Figura 3.1). Luego de colocar el pulso de nitrógeno a cada batch, conteniendo el M.C y la biomasa, se agregó de forma inmediata el inhibidor de oxidantes de nitrito (Clorato de sodio, ClNaO₃, Sigma 106.44 g.mol⁻¹, 99%), mediante un pulso de una solución stock (3.2 M ClNaO₃), para obtener una concentración de 10 mmol.L⁻¹ (Cai y col, 2018) con el fin de evaluar únicamente la oxidación de amonio.

Capítulo 3

Tabla 3.3 Composición del medio de cultivo (M.C.) utilizado en los batch para determinar la actividad de las BOA

Composición	g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.0973
K ₂ HPO ₄	0.0766
NaHCO ₃	0.2625
M ₁ (mL)	1
M ₂ (mL)	1



**Concentraciones iniciales
de nitrógeno amoniacal utilizadas para
cada ensayo BATCH**

- 1: NH₃-N = 10.7 mg.L⁻¹
- 2: NH₃-N = 50 mg.L⁻¹
- 3: NH₃-N = 100 mg.L⁻¹
- 4: NH₃-N = 150 mg.L⁻¹
- 5: NH₃-N = 250 mg.L⁻¹
- 6: NH₃-N = 500 mg.L⁻¹
- 7: NH₃-N = 1000 mg.L⁻¹
- 8: NH₃-N = 2500 mg.L⁻¹

Figura 3.1 Fotografía del reactor BATCH con el inóculo de microorganismos (izquierda) y concentración inicial de nitrógeno amoniacal utilizada en cada ensayo batch (derecha)

En cada batch la mezcla (biomasa + medio de cultivo + NH₃ + ClNaO₃) se aireó y se agitó continuamente a 200 R.P.M utilizando un agitador magnético marca IKA. Los batch se operaron a 22°C, pH de 7.5 y 7 mg OD.L⁻¹. Luego se detuvo la aireación y se registró el valor de OD cada 10 segundos durante 2 minutos. Este procedimiento fue realizado en cada batch a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 5, 6, 8 hs). Cabe destacar que cada ensayo batch fue realizado por duplicado. La pendiente obtenida de la disminución lineal de la concentración de oxígeno disuelto correspondió a la velocidad de consumo de oxígeno volumétrica total (OUR_{TOT}, mg O₂.(L.h)⁻¹). La velocidad de consumo de oxígeno

Capítulo 3

fue expresada como velocidad específica ($SOUR_{TOT}$, $\text{mg O}_2 \cdot (\text{gST} \cdot \text{h})^{-1}$). La concentración de biomasa para determinar las medidas de SOUR se determinó a partir del método de sólidos totales (sección 2.6.2).

Se realizaron dos ensayos control, en las mismas condiciones anteriormente descritas (medio de cultivo, agitación, aireación y concentración de biomasa), que se explican a continuación.

✓ Control 1: Para determinar la velocidad de consumo de oxígeno endógeno ($SOUR_{END}$) se realizó un control con la adición del inhibidor al batch conteniendo el medio de cultivo y la biomasa pero sin la incorporación del pulso de nitrógeno.

✓ Control 2: Para evaluar la velocidad de consumo de oxígeno del sistema en condiciones de operación rutinaria se utilizó otro control al cual no se le adicionó el inhibidor, pero sí un pulso de nitrógeno intermedio entre los ensayados ($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (Figura 3.1).

En cada uno de los ensayos batch se midió nitrógeno amoniacal, nitrógeno como nitrito y nitrógeno como nitrato mediante las determinaciones explicadas en las secciones 2.6.3, 2.6.4 y 2.6.5, tanto al inicio como al final del ensayo con el objetivo de evaluar la eficiencia del inhibidor utilizado sobre las BON (autótrofos y heterótrofos).

Se determinó la velocidad de consumo de oxígeno de los microorganismos oxidantes de amonio ($SOUR_{BOA}$) para cada condición estudiada (Figura 3.1) a partir de la siguiente expresión:

$$SOUR_{BOA} = SOUR_{TOT} - SOUR_{END} \quad (3.1)$$

Los resultados fueron presentados mediante gráficos $SOUR_{BOA}$ vs concentración de nitrógeno amoniacal. Se aplicó el modelo de Aiba (ecuación 3.2), el cual fue ajustado a los datos experimentales mediante el software Sigma Plot 10.0, a fin de determinar los parámetros cinéticos de la oxidación de amonio y de inhibición de este sustrato (Carrera y col, 2004):

$$q = \frac{Q_{max} \cdot [S]}{K_S + [S]} \exp\left(\frac{-S}{K_{IA}}\right) \quad (3.2)$$

donde q es la velocidad específica de consumo de oxígeno asociado a la oxidación de amonio en las diferentes condiciones estudiadas ($\text{mg O}_2 \cdot (\text{g ST} \cdot \text{h})^{-1}$), K_S es la constante

Capítulo 3

de afinidad del amonio ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Q_{max} es la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno asociado a la oxidación de amonio ($\text{SOUR}_{\text{BOAm}}$; $\text{mg O}_2\cdot(\text{g ST}\cdot\text{h})^{-1}$), $[\text{S}]$ es la concentración de nitrógeno amoniacal ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y K_{IA} ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) es la constante de inhibición.

El modelo aplicado permitió estimar la velocidad específica máxima de consumo de O_2 de BOA ($\text{SOUR}_{\text{BOAm}}$), la cual constituye una medida de la actividad metabólica de BOA de cada condición experimental (NB y NA).

B- Determinación de la actividad de las bacterias oxidantes de nitrito (BON)

Para la determinación de la actividad de las BON se realizaron ensayos batch bajo las mismas condiciones operativas (temperatura, pH, agitación y OD) así como el mismo procedimiento descrito para determinar actividad BOA (Sección 3.7.4 A). En este estudio se utilizó alitiourea (Sigma, $116.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 98%) como inhibidor del proceso de oxidación de amonio a nitrito, debido a que el objetivo consistió en evaluar únicamente la actividad de las BON. El medio de cultivo utilizado se presenta en la Tabla 3.4. El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es requerido como fuente de nitrógeno y el NaHCO_3 como fuente de carbono inorgánico para el metabolismo anabólico de BON. A los reactores batch, conteniendo la biomasa y medio de cultivo (320 mL), se adicionaron diferentes pulsos de soluciones stock de una sal de nitrito (NaNO_2 , 0.35 y 4.28 M) con el fin de evaluar diferentes concentraciones de nitrito (Figura 3.2). En cada ensayo, la concentración de alitiourea fue $86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ginestet y col, 1998).

Capítulo 3

Tabla 3.4: Composición del M.C utilizado en los ensayos batch para determinar la actividad de las BON

Composición	g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0650
KH ₂ PO ₄	0.0076
K ₂ HPO ₄	0.0060
NaHCO ₃	0.0506
M ₁ (ML)	1
M ₂ (ML)	1



Concentraciones iniciales de nitrógeno como nitrito utilizados para cada ensayo

- 1: NO₂⁻-N = 10.7 mg.L⁻¹
- 2: NO₂⁻-N = 50 mg.L⁻¹
- 3: NO₂⁻-N = 100 mg.L⁻¹
- 4: NO₂⁻-N = 150 mg.L⁻¹
- 5: NO₂⁻-N = 250 mg.L⁻¹
- 6: NO₂⁻-N = 500 mg.L⁻¹
- 7: NO₂⁻-N = 1000 mg.L⁻¹
- 8: NO₂⁻-N = 2500 mg.L⁻¹

Figura 3.2: Fotografía del reactor BATCH con el inóculo de microorganismos (izquierda) y concentraciones iniciales de nitrógeno como nitrito utilizadas en cada ensayo batch (derecha)

La SOUR_{TOT} fue determinada por respirometría como se describió en la Sección 3.7.4 A.

Al igual que en la sección A, se midió la biomasa por el método de sólidos totales y se llevaron a cabo mediciones de las especies de nitrógeno (amoniacal, nitrito y nitrato) tanto al inicio como al final de los ensayos.

Capítulo 3

Se utilizaron tres controles llevados a cabo en reactores batch empleando el medio de cultivo descrito en la Tabla 3.4, bajo las mismas condiciones operativas descritas en Sección 3.7.4 A (temperatura, pH, agitación y OD).

✓ Control 1: Al reactor batch se adicionó el inhibidor de BOA pero sin el pulso de la sal de nitrito. Este ensayo permitió determinar la velocidad de consumo de oxígeno endógena ($SOUR_{END}$).

✓ Control 2: Se utilizó una condición intermedia de las estudiadas ($250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$), sin la incorporación del inhibidor alitiourea. Este control se utilizó para determinar la actividad metabólica del consorcio microbiano total (actividad BOA y BON, autótrofa y heterótrofa).

✓ Control 3: Nuevamente se utilizó una condición intermedia de las estudiadas ($250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$) y el inhibidor alitiourea. En este caso el medio de cultivo, descrito en Tabla 3.4, no contenía sulfato de amonio. Este último control se llevó a cabo con el fin de evaluar que el inhibidor se encuentre inhibiendo la actividad de todas las especies oxidantes de amonio (autótrofas y heterótrofas). También permitiría detectar si la ausencia de amonio limita la actividad de las BON.

A partir de este ensayo, se determinó la velocidad de consumo de oxígeno de los microorganismos oxidantes de nitrito ($SOUR_{BON}$) a partir de la siguiente expresión:

$$SOUR_{BON} = SOUR_{TOT} - SOUR_{END} \quad (3.3)$$

Los resultados fueron presentados mediante gráficos $SOUR_{BON}$ vs concentración de nitrito. Se aplicó el modelo de Aiba (Ec. 3.2) a fin de determinar los parámetros cinéticos de la oxidación de nitrito y de inhibición de este sustrato (Carrera y col, 2004). En este caso, K_S es la constante de afinidad del nitrito, Q_{max} es la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno asociado a la oxidación de nitrito ($SOUR_{BONm}$; $\text{mg O}_2 \cdot (\text{g ST} \cdot \text{h})^{-1}$), $[S]$ es la concentración de la sal de nitrito (mg.L^{-1}) y K_{IA} es la constante de inhibición (mg.L^{-1}).

C- Determinación de la actividad de los microorganismos heterótrofos

La actividad de los microorganismos heterótrofos (consumidores de la fuente de carbono, acetato de sodio) se determinó bajo las mismas condiciones operativas (temperatura, pH, agitación y OD) y el mismo procedimiento descrito para evaluar la actividad BOA (Sección 3.7.4 A). En este estudio se utilizó el medio de cultivo detallado en

Capítulo 3

Tabla 3.5 y cinco reactores batch, donde los pulsos correspondieron a la sal acetato de sodio. Las concentraciones estudiadas fueron las siguientes: 26, 52, 105, 508, 1872 mg DQO.L⁻¹.

El inhibidor elegido fue el mismo que se utilizó para bloquear la oxidación de amonio (aliltiourea). La elección de la aliltiourea para este ensayo se basó en considerar que suprimiendo la acción de las BOA, y por ende la oxidación de amonio, y sin tener en el medio de cultivo otra fuente de nitrógeno, sólo estaríamos evaluando la oxidación de la fuente de carbono orgánico por medio de los microorganismos responsables de este proceso.

La SOUR_{TOT} fue determinada por respirometría como se describió en la Sección 3.7.4 A. La biomasa fue determinada a partir del método de sólidos totales. Además, se midió amonio, nitrito y nitrato. Cabe destacar que la medición de nitrito y nitrato permite determinar la ausencia de nitrificación.

Se utilizaron dos controles bajo las mismas condiciones operativas de todos los ensayos batch realizados.

✓ Control 1: El primer control contenía el medio de cultivo (Tabla 3.5), el inhibidor aliltiourea, sin la adición del pulso de DQO (acetato de sodio) y fue utilizado para determinar la velocidad de consumo de oxígeno endógeno (SOUR_{END}).

✓ Control 2: El segundo control consistió en el medio de cultivo de la Tabla 3.5, con un pulso de DQO de 105 mg.L⁻¹ sin la adición del inhibidor, con el fin de determinar de forma simultánea al ensayo, eficiencias de remoción de los compuestos nitrogenados presentes.

Capítulo 3

Tabla 3.5: Composición del M.C utilizado para los batch para determinar la actividad de las bacterias heterótrofas oxidantes de carbono orgánico

Composición	g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3370
KH ₂ PO ₄	0.0973
K ₂ HPO ₄	0.0766
NaHCO ₃	0.2625
M ₁ (mL)	1
M ₂ (mL)	1

A partir de este ensayo se calculó la velocidad de consumo de oxígeno de bacterias heterótrofas (SOUR_{HET}) mediante la siguiente expresión:

$$SOUR_{HET} = SOUR_{TOT} - SOUR_{END} \quad (3.4)$$

Con los valores obtenidos en este apartado se aplicó la ecuación de Monod (Tanyolaç y col, 2001) (Ecuación 3.5), con el fin de calcular la constante de afinidad del acetato (K_S) y la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno de heterótrofos (Q_{max} , SOUR_{HETm}).

$$q = \frac{Q_{max} \cdot [S]}{K_S + [S]} \quad (3.5)$$

A partir de las velocidades máximas de consumo de oxígeno (SOUR_m), determinadas mediante los ensayos respirométricos para cada grupo microbiano (BOA, BON y bacterias heterótrofas), se estimó la velocidad máxima de consumo de oxígeno de la comunidad nitrificante (SOUR_{NITm}) y la actividad nitrificante relativa (ANR) mediante las siguientes expresiones:

$$SOUR_{NITm} = SOUR_{BOAm} + SOUR_{BONm} \quad (3.6)$$

Capítulo 3

$$SOUR_{TOTm} = SOUR_{NITm} + SOUR_{HETm} \quad (3.7)$$

$$ANR = 100 \frac{SOUR_{NITm}}{SOUR_{TOTm}} \quad (3.8)$$

La actividad nitrificante relativa puede ser considerada una medida del enriquecimiento de la comunidad microbiana con bacterias nitrificantes.

Es preciso mencionar que en todos los ensayos recientemente descritos se utilizó la técnica de respirometría detallada en el capítulo 2 sección 2.9.

3.8 CONSUMO Y PRODUCCIÓN DE PROTONES (H⁺)

Para poder evaluar los procesos que estaban ocurriendo en el SBR_{ACET}, de forma rápida, sencilla y económica, se utilizó la técnica de titulación, la cual se encuentra basada en el consumo y producción de protones (H⁺). Esta técnica se implementó para evaluar principalmente el proceso de remoción de nitrógeno amoniacal por actividad nitrificante. Para ello se monitoreó de forma precisa la dosificación de ácido, particularmente ácido sulfúrico H₂SO₄ (0.91 M) y la base hidróxido de sodio NaOH (0.5 M) al reactor para controlar el pH en un valor constante de 7.5. La producción/consumo de protones (HP, mmol H⁺), para un determinado período, fue calculada mediante la siguiente expresión (Guisasola y col, 2007):

$$HP = V_{base} C_{base} - V_{ácido} C_{ácido} \quad (3.9)$$

donde V_{base} y $V_{ácido}$ representan los volúmenes consumidos de las soluciones de base y ácido utilizadas (mL) y C_{base} y $C_{ácido}$ representan sus concentraciones respectivamente (M).

HP fue determinada cada 15 minutos a lo largo de cada ciclo operativo. Las velocidades de producción/consumo de protones (rHP , mmol H⁺·(L·h)⁻¹) fueron determinadas a partir de la pendiente de las curvas de HP en función del tiempo.

3.9 RESULTADOS DE LA OPERACIÓN DEL SBR_{ACET} ALIMENTADO CON UN EFLUENTE SINTÉTICO FÁCILMENTE BIODEGRADABLE

El SBR_{ACET} fue alimentado con un efluente sintético conteniendo acetato de sodio como fuente de carbono y energía y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Se evaluaron dos condiciones experimentales denominadas NB (nitrógeno bajo) y NA (nitrógeno alto) con relación DQO:N de 100:10 y 100:15 respectivamente.

3.9.1 Estabilidad de los sistemas: tamaño de gránulos, ISV y morfología granular

El SBR_{ACET} se operó inicialmente con una carga volumétrica de nitrógeno de 60 mg N. (L.día)⁻¹ (Condición NB). La estabilidad del sistema en términos del tamaño granular y las propiedades de sedimentación (ISV) se lograron después de aproximadamente 80 días de operación que correspondieron a 4 TRC. En condiciones de estabilidad, el tamaño promedio de los gránulos fue de 0.4 mm y el ISV de 20 mL.g ST⁻¹. La concentración de biomasa en esta condición fue de 1.9 g ST.L⁻¹ (D.S= 0.3).

En la Condición NA, con una carga de nitrógeno de 90 mg N. (L.día)⁻¹, la estabilidad del sistema se alcanzó también después de aproximadamente 80 días de operación. En este caso, el tamaño promedio de los gránulos fue de 1.2 mm y el ISV de 5 mL.g ST⁻¹. La concentración de biomasa alcanzada fue de 2.3 g ST.L⁻¹ (D.S= 0.7).

En la Figura 3.3 A se puede observar la distribución de tamaño promedio granular a lo largo de los diferentes TRC estudiados para la condición NB mientras que en la Figura 3.3 B se puede observar el perfil correspondiente para la condición NA. En estas Figuras se puede verificar el pico en la condición NB (Figura 3.3 A) en 0.4 mm aproximadamente, mientras que en la condición NA (Figura 3.3 B) se puede verificar el máximo valor en el eje cartesiano de la gráfica en 1.2 mm. Cabe destacar que el equipo utilizado (Mastersizer E 2000) no detecta tamaños mayores a 1.7 mm, es por eso que las gráficas presentan un límite de tamaño representado. Por otro lado es importante mencionar que el tamaño promedio es brindado por el software de detección del equipo, el cual como se mencionó anteriormente brinda los valores d y D promedio en cada ensayo (Cap. 2, sección 2.6.8).

Capítulo 3

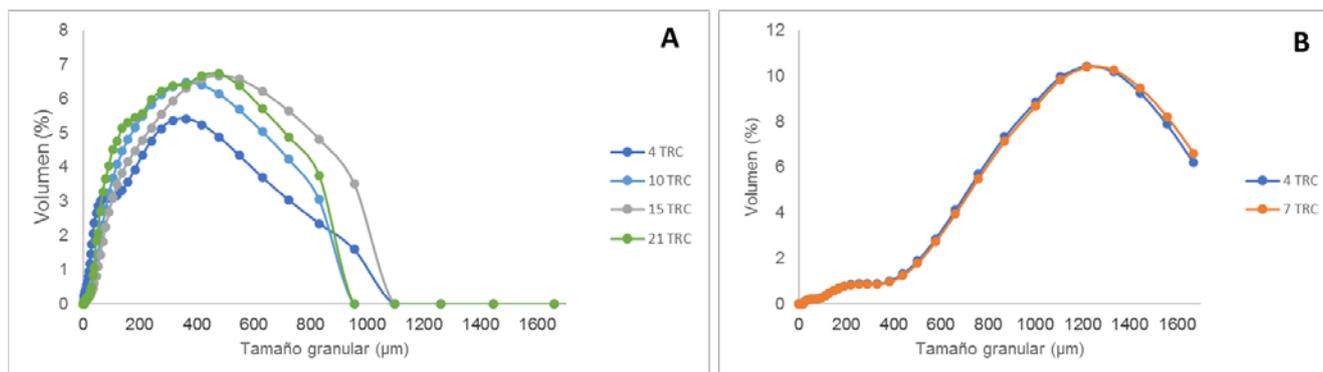


Figura 3.3: Distribución del tamaño granular promedio a lo largo de los TRC de la condición NB (A) y NA (B) correspondiente a los valores d promedio.

En la Figura 3.4 se puede apreciar la biomasa granular del SBR en condiciones de estabilidad (4 TRC transcurridos) para la condición NB. La observación microscópica mediante SEM (aumento 2000 X) reveló una morfología similar en los TRC estudiados, con forma esférica/ovalada y estructura compacta. También fue observada la presencia de lodo activado, lo cual es muy frecuente en sistemas granulares aeróbicos (Wilén y col, 2018).

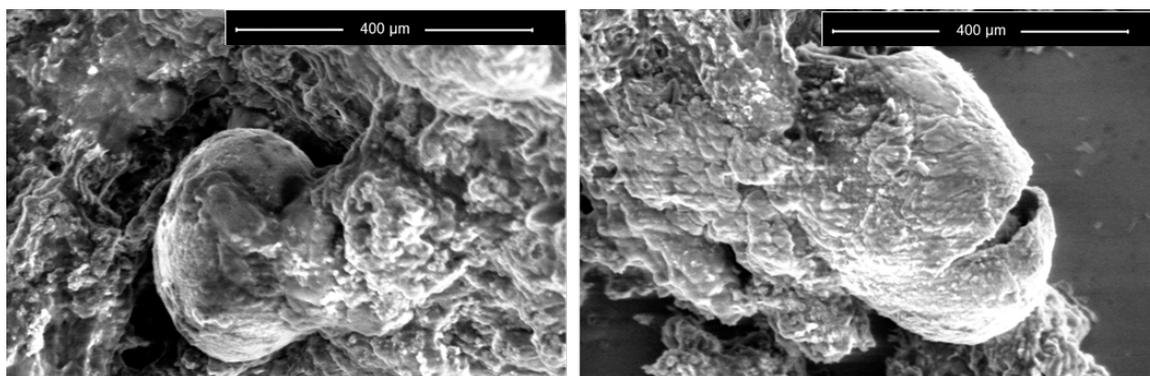


Figura 3.4: Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de lodo granular aeróbico en la condición NB

3.9.2 Consumo de carbono orgánico y nitrógeno

El sustrato orgánico, medido como DQO soluble, se eliminó casi por completo (80-90%) en las primeras horas de los ciclos operativos en ambas condiciones. Este período de disponibilidad de fuente de carbono y energía externa correspondió al período “feast”. En la Condición NB, la fase “feast” correspondió a las primeras dos horas del ciclo mientras que para la condición NA se extendió hasta las 4 hs. La etapa restante correspondió al

Capítulo 3

periodo “famine”, caracterizado por la ausencia de fuente de carbono orgánico externo (Figura 3.5 A y C).

En ambas condiciones (NA y NB), la acumulación de glucógeno y PHA, como reservas de carbono intracelular, se produjo a partir del consumo de acetato durante el período “feast”. Después de que la fuente de carbono externa estuvo casi agotada, el glucógeno y PHA se degradaron durante el período “famine” (inanición) (Figura 3.5 A y C). Por tanto, en el período “famine”, las reservas de carbono intracelular se utilizan para todos los procesos metabólicos relacionados con el mantenimiento y el crecimiento celular.

El nitrógeno amoniacal se eliminó de forma completa en ambas condiciones (Figura 3.5 B y D). En la condición NB, las formas oxidadas de N (nitrito y nitrato) no aumentaron significativamente durante el período “feast”. A priori se podría suponer que no hubo actividad nitrificante en ese período, sin embargo la nitrificación fue evidente en el período “famine” donde un aumento progresivo de la concentración de NO_3^- -N tuvo lugar hasta el final del ciclo operativo. Por otro lado, NO_2^- -N se generó ligeramente y fue rápidamente removido (Figura 3.5 B). En la condición NA, la actividad nitrificante tuvo lugar durante todo el ciclo operativo. La acumulación de nitrito fue observado entre 0 y 2 h del ciclo; posteriormente el mismo disminuyó a niveles muy bajos que no pudieron ser detectados por el método espectrofotométrico utilizado. Respecto al nitrato, se puede observar que aumentó progresivamente a lo largo todo el ciclo de funcionamiento (Figura 3.5 D). Debe tenerse en cuenta que en ambas condiciones NB y NA, las concentraciones iniciales de nitrito y nitrato (es decir a las 0 h del ciclo operativo) correspondían aproximadamente a la mitad de las concentraciones detectadas al final del ciclo (24 h), esto es debido a que la relación de intercambio volumétrico en el reactor fue del 50% (Figura 3.5).

Capítulo 3

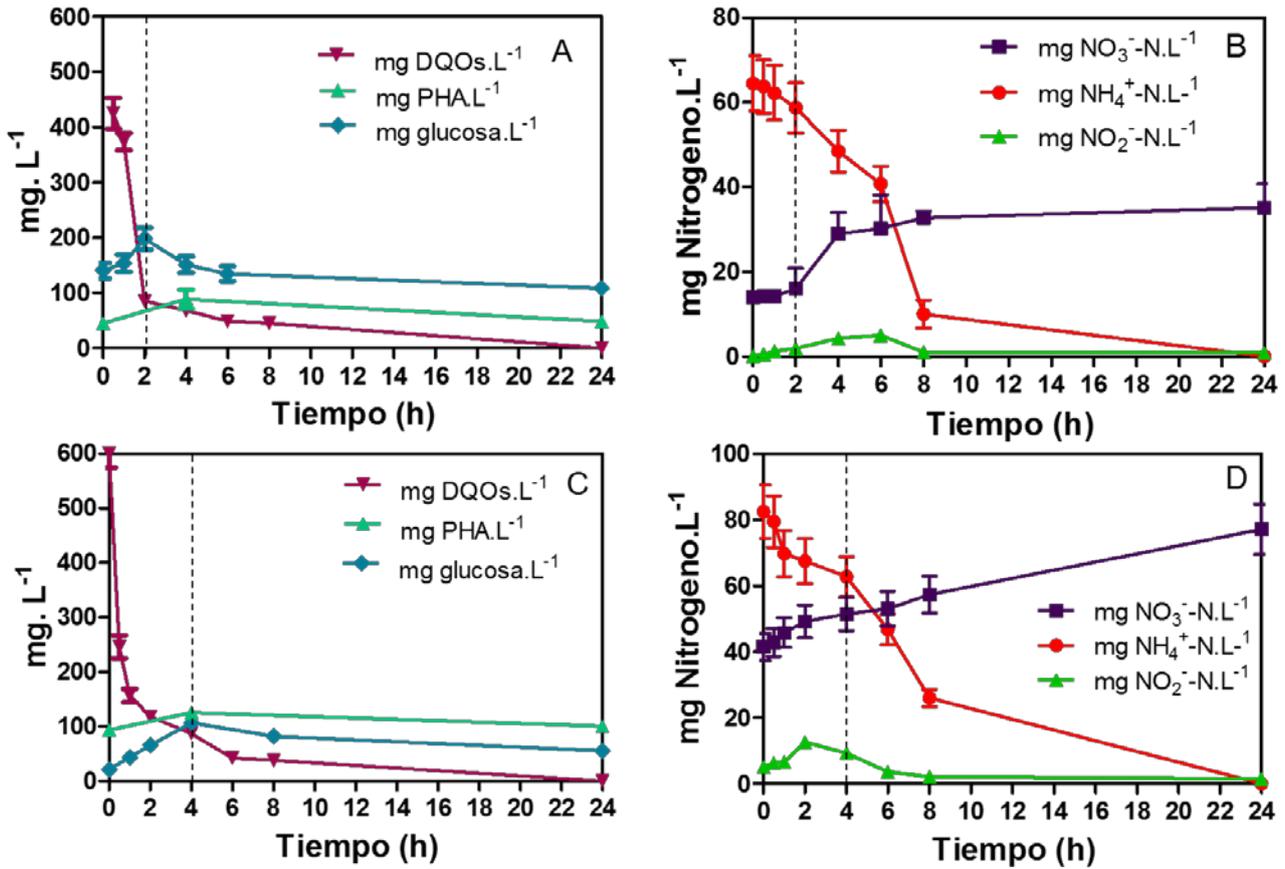


Figura. 3.5: Cambios en las concentraciones de acetato (medido como DQOs), glucógeno, PHA y diferentes formas de nitrógeno inorgánico a lo largo de un ciclo operativo del SBR bajo condiciones de estabilidad. Condición NB (A y B) y Condición NA (C y D). DQO (▼), glucosa (◆), PHA (▲), NH₃-N (●), NO₃⁻-N (■), NO₂⁻-N (▲)

Cabe destacar que, en ambas condiciones, se logró la remoción completa de NH₃-N y una eliminación de N inorgánico de aproximadamente 50% (Tabla 3.6). En la sección 3.10 se presentan los balances de masa propuestos para cuantificar la contribución de cada proceso, nitrificación y asimilación de nitrógeno, a la remoción de amoníaco para las fases “feast” y “famine” y para el ciclo total.

El nitrógeno gaseoso generado por desnitrificación puede ser determinado a partir de la diferencia entre el amonio removido y la suma de las concentraciones de las formas de nitrógeno oxidado (NO₂⁻-N y NO₃⁻-N) y nitrógeno intracelular (Silva y col, 2019). En la presente sección, considerando los balances de todas las formas de nitrógeno solubles, en influente y efluente, como así también el N_{ORG} que es retirado con la purga de biomasa (considerando la formula elemental de la misma) se pudo estimar la magnitud del proceso

Capítulo 3

de desnitrificación en ambas condiciones en estado estable. Estos balances consistieron en considerar la siguiente ecuación: $NH_3-N_0 = (N_X + \Delta(NO_X-N) + N_G)$, donde:

NH_3-N_0 (mg N.L⁻¹) corresponde a la concentración de N amoniacal en el reactor a tiempo inicial proveniente del efluente sintético obtenido mediante la determinación de Nessler (sección 2.6.3, capítulo 2) que corresponde a un valor de 60 mg N.L⁻¹ para la condición NB y 90 mg N.L⁻¹ para NA. N_X corresponde al N en mg N.L⁻¹ destinado a biomasa por crecimiento. Cabe destacar que $N_X = NP/V_T$ donde NP (mg N) corresponde al nitrógeno de la purga de biomasa, obtenido a partir del producto entre la concentración de biomasa del SBR determinada como SSV (g SSV.L⁻¹) y la purga diaria del SBR (0.32 L.(día)⁻¹), considerando la fórmula elemental de biomasa, y V_T es el volumen de trabajo del reactor (4.6 L). NP correspondió a 66 mg N para la condición NB y 80 mg N para la condición NA, resultando valores de N_X de 14.3 mg N.L⁻¹ y 17.4 mg N.L⁻¹ respectivamente.

ΔNO_X-N (mg N.L⁻¹) corresponde a la concentración de N como formas oxidadas (N-nitrito+N-nitrato) generadas en cada ciclo operativo, siendo $\Delta NO_X-N = \Delta NO_X-N_F - \Delta NO_X-N_0$ (es decir la diferencia entre concentraciones de NO_X-N entre el final e inicio de cada ciclo.

N_G (mg N.L⁻¹) corresponde al nitrógeno gaseoso generado por desnitrificación en el SBR en cada ciclo operativo.

Como resultado de este balance, estimamos N gaseoso, correspondiente a la suma de NO, N₂O y N₂, removido por desnitrificación: 25.6 mg N.L⁻¹ para NB (correspondiente al ≈ 42% del NH₃-N removido) y 39.5 mg N.L⁻¹ para la condición de NA (correspondiente al ≈ 44 % del NH₃-N removido).

La velocidad específica de consumo de acetato fue similar para ambas condiciones. Sin embargo, hubo diferencias significativas respecto a la velocidad de consumo inicial de NH₄⁺-N durante el período “famine”, siendo para la condición NA aproximadamente 2 veces mayor que la correspondiente a la condición NB (Tabla 3.6). Esto pudo deberse a que en la condición NA, una mayor concentración de NH₃-N inicial probablemente favoreció la actividad nitrificante, sin afectar el consumo heterotrófico de acetato. La velocidad de degradación de glucógeno en fase “famine” fue similar en ambas condiciones (Tabla 3.6).

Capítulo 3

Tabla 3.6 Eficiencia de remoción de Nitrógeno y parámetros cinéticos

Estudio estadístico * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$ (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$)

Ciclo operativo	Parámetros DQO:N:P	Condición NB 100:10:2	Condición NA 100:15:2
Ciclo total	% Remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$	100	100
	% Remoción de N inorgánico	51.61 (4.84)	48.50 (0.88)**
Fase "feast"	rDQOs ($\text{mg DQO}_s \cdot (\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$)	302.10 (15.60)	422.33 (24.09)*
	qDQOs ($\text{mg DQO}_s \cdot (\text{g ST}\cdot\text{h})^{-1}$)	159.00 (16.80)	154.50 (16.30)**
Fase "famine"	$r(\text{NH}_3\text{-N})_T$ ($\text{mg NH}_3\text{-N}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$)	4.10 (0.57)	9.00 (0.98)*
	$q(\text{NH}_3\text{-N})_T$ ($\text{mg NH}_3\text{-N}\cdot(\text{g ST}\cdot\text{h})^{-1}$)	2.15 (0.35)	3.90 (0.42)*
	rGlu _C ($\text{mg GLU} \cdot (\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$)	1.86 (0.99)	2.28 (0.16)
	qGlu _C ($\text{mg GLU} \cdot (\text{g ST}\cdot\text{h})^{-1}$)	0.97 (0.09)	0.99 (0.08)

Es importante destacar que es esperable que en estos sistemas predomine tanto la presencia de microorganismos nitrificantes autótrofos como de nitrificantes heterótrofos, debido a que si bien en los sistemas de tratamiento de aguas residuales el crecimiento de nitrificantes heterótrofos se favorece con elevadas cargas de nitrógeno y carbono orgánico (Zhao y col, 2013), estas bacterias presentan también la capacidad de crecer con baja DQO y baja relación DQO:N (Chai y col, 2019). Asimismo, se ha informado que la disminución en la relación "feast/famine" favorece el enriquecimiento de los microorganismos nitrificantes heterótrofos, mientras que los microorganismos autótrofos se reducen (Zhang y col, 2019b). En el capítulo 4 se expone la relevancia de los microorganismos nitrificantes heterótrofos en este estudio.

Capítulo 3

3.9.3 Amonio libre y ácido nitroso libre

En la Tabla 3.7 se pueden observar los valores de amoníaco libre (FA, free ammonia, ecuación 2.11) y ácido nitroso libre (FNA, HNO_2 , ecuación 2.12), siendo éste último muy bajo en ambas condiciones ($<0.004 \text{ mg.L}^{-1}$).

Tabla: 3.7: Valores obtenidos de FA y FNA para las condiciones NB y NA
Análisis estadístico: * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$ (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$).

SBR_{ACET}	Condición NB	Condición NA
FA (mg.L⁻¹)	1.23 (0.15)	1.85 (0.12)*
FNA (mg.L⁻¹)	0.0012 (0.0006)	0.0035 (0.0004)*

Es ampliamente aceptado que las bacterias autotróficas son más sensibles a los agentes tóxicos que los heterótrofos (Zhou y col, 2011). Asimismo, se ha informado que dentro del grupo de nitrificantes autotróficos, tal como se ha mencionado previamente las bacterias oxidantes de nitrito (BON) son más sensibles a FA y FNA que las BOA.

En el presente estudio, los niveles de FNA fueron más bajos que el umbral de inhibición informado en la literatura tanto para BOA como para BON autotróficos; sin embargo, los niveles de FA podrían estar dentro del rango de inhibición de algunas BON autótrofas. Las concentraciones de FA se encontraron por debajo de los niveles típicos de inhibición de BOA.

FA es inhibidor de los procesos de oxidación de amonio y nitrito durante la nitrificación (Anthonisen y col, 1976). Se han encontrado niveles de inhibición variables en la nitrificación (Liu y col, 2019). FA ha demostrado una inhibición más fuerte en la oxidación de nitrito que en la oxidación de amonio (Liu y col, 2019). Algunos autores afirman que la inhibición de la oxidación de nitrito en BON por FA comienza a una concentración de 0.1–1.0 mg de $\text{NH}_3.\text{L}^{-1}$, mientras que la oxidación de amonio en BOA se inhibe a 10–150 mg de $\text{NH}_3.\text{L}^{-1}$ (Kim y col, 2006; Rodriguez-Gomez y col, 2019). Esto podría causar la inhibición selectiva de las BON en un rango de concentración de FA de 1.0–10 mg de $\text{NH}_3.\text{L}^{-1}$ y en consecuencia una acumulación de nitrito en el sistema. Los diferentes niveles de tolerancia informados podrían atribuirse a diferentes condiciones de operación, es decir OD y tipo o forma de crecimiento microbiano suspendido o agrupado (Xia y col, 2018). En la condición

Capítulo 3

NA del presente estudio, los niveles iniciales aún más elevados de FA podrían afectar negativamente a los BON, lo que podría explicar la acumulación de nitritos al comienzo del ciclo (Figura 3.5 D). Este fenómeno fue menos relevante en la condición NB (Figura 3.5 B).

Por otro lado, los altos niveles de FA (por ejemplo, hasta 210 mg de $\text{NH}_3\text{-N.L}^{-1}$) podrían causar efectos biocidas sobre la nitrificación. En la Tabla 3.7 se puede observar que el amoníaco libre (FA, NH_3), alcanzó concentraciones máximas de 1.23 mg .L^{-1} y 1.85 mg .L^{-1} para las condiciones NB y NA respectivamente.

FNA afecta múltiples vías metabólicas en las BOA. La inhibición de la nitrificación se iniciaría a una concentración de FNA de 0.22-2.8 mg $\text{HNO}_2\text{-N.L}^{-1}$ (Tan y col, 2008; Tora y col, 2010). Una combinación de distintos factores de proceso y diferentes especies microbianas dentro del lodo son responsables de la existencia de un amplio rango de niveles de umbral inhibitorios. En estudios realizados por Tora y col. (2010) se han encontrado que posibles escenarios de limitaciones de carbono inorgánico aumentan el efecto inhibitorio de FNA en cultivos enriquecidos con BOA. Sin embargo, otros estudios contrastan esta información (Vadivelu y col, 2006). Esta diferencia en los efectos contrastantes de inhibición de FNA podría explicarse por diferencias en la comunidad microbiana. Además, cabe destacar que diferentes especies y cepas dentro de un género podrían poseer tolerancias distintas hacia FNA (Zhou y col, 2011).

Otros autores han demostrado que FNA tiene diferentes efectos inhibitorios sobre las actividades anabólicas y catabólicas de *Nitrosomonas*, siendo el proceso de biosíntesis el más sensible (Vadivelu y col, 2006a). Se ha encontrado que las concentraciones de FNA que afectan la actividad de las BOA comienzan desde 0.011-0.07 mg de $\text{HNO}_2\text{-N.L}^{-1}$, las cuales son más bajas que las indicadas previamente, observándose una inhibición completa a 0.026-0.22 mg de $\text{HNO}_2\text{-N.L}^{-1}$ (Zhang y col, 2010). Cabe señalar además, que la inhibición de FNA en la nitrificación puede ser reversible (Yang y col, 2003).

Por último se ha informado mediante algunos estudios que *Nitrospira*, una de las especies dominantes de las BON, es más sensible al FNA que *Nitrobacter*, otro BON típico (Blackburne y col, 2007), observándose una inhibición completa de la actividad de consumo de oxígeno a una concentración de FNA menor a 0.03 mg de $\text{HNO}_2\text{-N.L}^{-1}$.

Debe destacarse que hay pocos estudios que evalúen el efecto de FA y FNA sobre las bacterias nitrificantes heterotróficas.

Capítulo 3

3.10 Balance de nitrógeno en el SBR_{ACET}

El nitrógeno amoniacal se puede oxidar por actividad nitrificante o ser utilizado para el crecimiento heterotrófico. La identificación de cada proceso es muy difícil por dos razones:

a) La biomasa activa aumenta ligeramente durante el período “feast” de cada ciclo operativo, sin embargo, ese pequeño incremento no puede ser detectado satisfactoriamente por métodos gravimétricos.

b) El nitrito y/o nitrato generado por la actividad nitrificante puede ser desnitrificado simultáneamente, y en consecuencia, el proceso de nitrificación podría ser subestimado.

Debido a estos motivos se propone un balance de masa de las diferentes formas de nitrógeno inorgánico con el fin de cuantificar la contribución de cada proceso biológico a la eliminación global de nitrógeno. Además, el balance de masa permite estimar tanto la actividad desnitrificante como el proceso NDS.

3.10.1 Período “feast”: balance de masa para acetato de sodio, nitrógeno y oxígeno

Third (2003) trabajando con un SBR aeróbico/anóxico, ha propuesto que el acetato consumido por las bacterias es utilizado para la oxidación, producción de PHB y asimilación para la síntesis de biomasa durante la fase aeróbica. A partir de esto, en el presente capítulo se propuso que el acetato puede ser utilizado por los microorganismos heterótrofos para la producción de glucógeno y PHA, fosforilación oxidativa (generación de ATP), asimilación para la síntesis de biomasa y desnitrificación. Cabe destacar que para simplificar el estudio se ha considerado un proceso de desnitrificación completo, es decir, la reducción de nitrato hasta gas nitrógeno. Para el período “feast”, se ha introducido una modificación del balance de electrones propuesto por Third (2003) donde se incluyó además la producción de glucógeno y la desnitrificación. De esta manera el balance se expresó para este período en unidades DQO de la siguiente manera:

$$rDQOs = rGlu_F + 1.125 rPHA_F + 1.05 rX + rO_{2H} + 1.25 r(NO_3^- - N)_D \quad (3.10)$$

donde rDQOs correspondió a la velocidad de consumo del sustrato orgánico ($\text{mmol O}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$), $rGlu_F$ es la velocidad de producción de glucógeno a partir de acetato ($\text{mmol Glu} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$), $rPHA_F$ es la velocidad de producción de PHA a partir de acetato ($\text{mmol PHA} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$), rO_{2H} es la velocidad de consumo de oxígeno correspondiente al metabolismo

Capítulo 3

heterotrófico ($\text{mmol O}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$), r_X es la velocidad de crecimiento heterotrófico a partir del consumo de acetato ($\text{mmol X} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) y $r(\text{NO}_3^- - \text{N})_D$ es la velocidad de desnitrificación ($\text{mmol NO}_3^- - \text{N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$).

Todos los parámetros fueron expresados en unidades de DQO como $\text{mmol O}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$. Para esto se consideraron algunos supuestos y factores de conversión que se presentan a continuación: para el acetato (AC), 1 mmol de O_2 correspondió a 1 C-mmol de AC; el glucógeno, medido como $\text{mg glucosa} \cdot \text{L}^{-1}$, fue convertido en unidades C-mol utilizando el factor de conversión $27 \text{ g} \cdot \text{C} \cdot \text{mol Glu}^{-1}$, y luego fue expresado como $\text{mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ utilizando el factor $1 \text{ mol O}_2 \cdot \text{C} \cdot \text{mol Glu}^{-1}$; el PHA medido como $\text{mg PHA} \cdot \text{L}^{-1}$ fue convertido en unidades C-mol utilizando el factor de conversión $21.5 \text{ g} \cdot \text{C} \cdot \text{mol PHB}^{-1}$ y fue expresado como $\text{mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ utilizando el factor $1.125 \text{ mol O}_2 \cdot \text{C} \cdot \text{mol PHB}^{-1}$. La biomasa activa ($\text{mg X} \cdot \text{L}^{-1}$) se determinó a partir de la diferencia entre la concentración de sólidos suspendidos volátiles ($\text{mg SSV} \cdot \text{L}^{-1}$) y la cantidad total de reservas de carbono orgánico, es decir, glucógeno ($\text{mg glucosa} \cdot \text{L}^{-1}$) y PHA ($\text{mg PHA} \cdot \text{L}^{-1}$). La biomasa activa fue expresada como $\text{mmol O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ asumiendo la fórmula elemental ($\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$, $24.6 \text{ g} \cdot \text{C} \cdot \text{mol}^{-1}$) y aplicando el factor de conversión $1.05 \text{ mol O}_2 \cdot \text{C} \cdot \text{mol X}^{-1}$. Se supuso que la desnitrificación podría tener lugar a partir de electrones aportados por el acetato y además se consideró una reducción de nitrato a N_2 . El sustrato orgánico oxidado a través de la desnitrificación se cuantificó mediante la estimación de la cantidad equivalente de O_2 que sería necesario si el O_2 fuese el aceptor de electrones en lugar del nitrato. Para ello se utilizó el factor de conversión teórico de $1.25 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{mmol NO}_3^- - \text{N}^{-1}$.

Debe tenerse en cuenta que el balance de masa con respecto al requerimiento de oxígeno para la oxidación de acetato solo implicó la velocidad de consumo de oxígeno (r_{O_2}) correspondiente al crecimiento heterotrófico ($r_{\text{O}_{2\text{H}}}$). Sin embargo, el r_{O_2} determinado por respirometría cerrada incluye el consumo de oxígeno para ambos procesos: nitrificación ($r_{\text{O}_{2\text{N}}}$) y oxidación de acetato. Por lo tanto, $r_{\text{O}_{2\text{T}}}$ (r_{O_2} total) = $r_{\text{O}_{2\text{N}}} + r_{\text{O}_{2\text{H}}}$; $r_{\text{O}_{2\text{N}}}$ fue estimado mediante la siguiente expresión:

$$r_{\text{O}_{2\text{N}}} = y_{\text{O}/\text{N1}} r\left(\text{NH}_3 - \text{N}\right)_{\text{ox}} + y_{\text{O}/\text{N2}} r\left(\text{NO}_2^- - \text{N}\right)_{\text{ox}} \quad (3.11)$$

Capítulo 3

donde $y_{O/N1}$ es el coeficiente estequiométrico para la oxidación de amoníaco (1.5 mol O_2 .mol NH_3-N^{-1}), $r(NH_3-N)_{ox}$ es la velocidad de oxidación de amoníaco (mol NH_3-N .(L.h) $^{-1}$), $y_{O/N2}$ es el coeficiente estequiométrico para la oxidación de nitrito (0.5 mol O_2 .mol $NO_2^- - N^{-1}$) y $r(NO_2^- - N)_{ox}$ es la velocidad de oxidación de nitrito (mol $NO_2^- - N$.(L.h) $^{-1}$).

Posteriormente se estimó rO_2 correspondiente al metabolismo heterotrófico mediante la siguiente expresión:

$$rO_{2H} = rO_{2T} - y_{O/N1} r\left(NH_3 - N\right)_{ox} - y_{O/N2} r\left(NO_2^- - N\right)_{ox} \quad (3.12)$$

Para simplificar los balances se propusieron los siguientes supuestos: se consideró que tuvo lugar una nitrificación completa desde amoníaco hasta nitrato (sin desnitrificación vía nitrito) y una desnitrificación completa desde nitrato hasta N_2 (sin acumulación de nitrito). Cabe destacar que la nitrificación parcial, desde amoníaco hasta nitrito, seguida de desnitrificación suele favorecerse a concentraciones de oxígeno menores a 1 mg O_2 .L $^{-1}$. En el presente estudio, el elevado caudal de aire aplicado al reactor condujo a una concentración de oxígeno de aproximadamente 7.5 mg O_2 .L $^{-1}$. Además, la concentración de nitrato aumentó progresivamente desde el comienzo de la nitrificación. Estas observaciones permitieron asumir que la nitrificación completa fue el proceso principal. Respecto a la desnitrificación parcial, desde nitrato hasta nitrito, la misma se favorece comúnmente bajo condiciones limitantes de la fuente de DQO externa o bien cuando se utiliza PHA como fuente de carbono. En este estudio, una baja acumulación de nitrito se observó principalmente en el período “feast” de la condición NA cuando el acetato todavía se encontraba presente (Figura 3.8 D). La acumulación de nitrito observada podría explicarse por un fenómeno de inhibición transitoria de la oxidación de nitrito por FA, como se explicó en la sección 3.9.3, más que por la ocurrencia de un proceso de desnitrificación parcial. Conforme a estos análisis, se propusieron las siguientes expresiones:

$$r\left(NO_2^- - N\right)_{ox} = r\left(NH_3 - N\right)_{ox} - r\left(NO_2^- - N\right)_{AC} \quad (3.13)$$

Capítulo 3

$$r\left(\text{NO}_3^- - \text{N}\right)_D = r\left(\text{NO}_2^- - \text{N}\right)_{OX} - r\left(\text{NO}_3^- - \text{N}\right)_{AC} \quad (3.14)$$

donde $r(\text{NO}_2^- - \text{N})_{AC}$ corresponde a la velocidad de acumulación de nitrito ($\text{mol NO}_2^- - \text{N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$), $r(\text{NO}_3^- - \text{N})_D$ es la velocidad de desnitrificación ($\text{mol NO}_3^- - \text{N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) y $r(\text{NO}_3^- - \text{N})_{AC}$ es la velocidad de acumulación de nitrato ($\text{mol NO}_3^- - \text{N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$).

Combinando las ecuaciones anteriores (3.13 y 3.14) se obtiene la siguiente expresión

$$r\left(\text{NO}_3^- - \text{N}\right)_D = r\left(\text{NH}_3 - \text{N}\right)_{OX} - r\left(\text{NO}_2^- - \text{N}\right)_{AC} - r\left(\text{NO}_3^- - \text{N}\right)_{AC} \quad (3.15)$$

Para la velocidad de consumo de amonio total se propuso el siguiente balance:

$$r\left(\text{NH}_3 - \text{N}\right)_T = r\left(\text{NH}_3 - \text{N}\right)_X + r\left(\text{NH}_3 - \text{N}\right)_{OX} \quad (3.16)$$

donde $r(\text{NH}_3 - \text{N})_T$ corresponde a la velocidad de consumo de amoníaco total expresada como $\text{mol NH}_3 - \text{N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, $r(\text{NH}_3 - \text{N})_X$ corresponde a la velocidad de consumo de amoníaco para el crecimiento heterotrófico expresada como $\text{mol NH}_3 - \text{N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, siendo $r(\text{NH}_3 - \text{N})_X = rX \cdot y_{N/X}$. $y_{N/X}$ corresponde al coeficiente estequiométrico que relaciona los contenidos de nitrógeno y carbono de la biomasa ($0.2 \text{ mol N} \cdot \text{C}^{-1}$, para $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$).

Finalmente, la velocidad de crecimiento heterotrófico rX se estimó a partir del balance propuesto (ecuación 3.10) debido a que no se puede detectar el aumento de biomasa por métodos gravimétricos como se explicó anteriormente. Combinando las ecuaciones 3.10, 3.12, 3.13, 3.15 y 3.16 de esta sección, reemplazando $r(\text{NH}_3 - \text{N})_X$ por $rX \cdot y_{N/X}$ y reordenando, se pudo estimar la velocidad de crecimiento heterotrófico a partir de acetato y amoníaco para la fase "feast" por medio de lo siguiente expresión:

$$r_x = \frac{rDQO_S + r(\text{NH}_3 - \text{N})_T (y_{O/N_1} + y_{O/N_2} - 1.25) + 1.25 r(\text{NO}_3^- - \text{N})_{AC} + r(\text{NO}_2^- - \text{N})_{AC} (1.25 - y_{O/N_2}) - (rO_{2T} + rGlu_F + 1.125 rPHA_F)}{y_{N/X} (y_{O/N_1} + y_{O/N_2}) + (1.05 - 1.25 y_{N/X})} \quad (3.17)$$

Capítulo 3

3.10.2 Período “famine”: balance de masa para el carbono orgánico endógeno, nitrógeno y oxígeno

Las reservas de carbono intracelular (glucógeno y PHA), acumuladas en el período “feast”, fueron utilizadas en el período “famine” como fuentes de carbono y energía para el crecimiento microbiano, la generación de ATP por oxidación y el proceso de desnitrificación. En relación a estos procesos se propuso el siguiente balance:

$$rGlu_D + 1.125 rPHA_D = 1.05 rX + rO_{2H} + 1.25 r(NO_3^- - N)_D \quad (3.18)$$

donde $rGlu_D$ corresponde a la velocidad de degradación de glucógeno ($\text{mmol Glu} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) y $rPHA_D$ es la velocidad de degradación de PHA ($\text{mmol PHA} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$).

Para el balance de masa de amoníaco y oxígeno son válidas las ecuaciones 3.11-3.16. Combinando las ecuaciones 3.12, 3.13, 3.15, 3.16 y 3.18 y reordenando se puede estimar la velocidad de crecimiento heterótrofo a partir de las reservas de carbono intracelulares mediante la siguiente expresión:

$$rX = \frac{rGlu_D + 1.125 rPHA_D + r(NH_3 - N)_T (y_{O/N1} + y_{O/N2} - 1.25) - rO_{2T} + 1.25 r(NO_3^- - N)_{AC} + r(NO_2^- - N)_{AC} (1.25 - y_{O/N2})}{y_{N/X} (y_{O/N1} + y_{O/N2} - 1.25) + 1.05} \quad (3.19)$$

Para ambos períodos “feast” y “famine”, una vez que se estimó rX , la velocidad de consumo de amoníaco para el crecimiento heterótrofo $r(NH_3 - N)_X$ fue calculada como $rX \cdot y_{N/X}$. Finalmente, se estimó la velocidad de oxidación de amoníaco $r(NH_3 - N)_{ox}$ utilizando la ecuación 3.16.

Cabe destacar que todos los parámetros cinéticos se determinaron para la fase inicial de cada período, “feast” y “famine”, siendo analizados todos los ciclos operativos de ambas condiciones experimentales (NB y NA).

La eliminación de amoníaco por NDS se estimó para las dos condiciones estudiadas mediante la siguiente expresión

Capítulo 3

$$\% NDS = \left(\frac{r(NH_3 - N)_{OX} - r(NO_X - N)}{r(NH_3 - N)_{OX}} \right) \cdot 100 \quad (3.20)$$

donde $r(NO_X-N)$ corresponde a la suma de $r(NO_2^- - N)_{AC}$ y $r(NO_3^- - N)_{AC}$.

A partir de las estimaciones de $r(NH_3-N)_X$ y $r(NH_3-N)_{OX}$, mediante las ecuaciones 3.16, 3.17 y 3.19, se determinó como contribuían los procesos de nitrificación y asimilación a la remoción total de nitrógeno. En la Condición NB no se observó remoción significativa de amoníaco mediante el proceso de nitrificación en período “feast”, sin embargo, este proceso fue observado en el período “famine” en una elevada proporción (Tabla 3.8). En la Condición NA se observó nitrificación en ambos períodos (“feast” y “famine”), representando el último de ellos un porcentaje mayor del proceso de eliminación de amoníaco total. En ambas condiciones, el resto del amoníaco fue eliminado por asimilación (Tabla 3.8).

Respecto a los resultados obtenidos para NDS, cabe destacar que el mismo fue observado sólo en el período “famine” para la condición de NB mientras que en la condición con mayor carga de nitrógeno (NA) este proceso se llevó a cabo en ambos períodos (Tabla 3.8). Es importante destacar la importancia del balance de masa propuesto, el cual permitió determinar la relevancia de los procesos de nitrificación y el proceso de NDS.

Capítulo 3

Tabla 3.8: Remoción de nitrógeno por nitrificación, asimilación y NDS en el período “feast”, “famine” y ciclo total de las condiciones NB y NA.

Análisis estadístico * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$. (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$)

SBR _{ACET}		CONDICIÓN NB	CONDICIÓN NA
PERÍODO “FEAST”	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N por nitrificación	0.0 % (± 0.0)	28.0% (2.9)*
	% NDS	0.0 % (± 0.0)	24.0 % (±2.8) *
PERÍODO “FAMINE”	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N por nitrificación	72.0 % (±7.5)	76.2 % (±11.9)**
	%NDS	54.0 % (±4.8)	52.0 % (±5.7)**
CICLO TOTAL (PERÍODO “FEAST” + “FAMINE”)	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N por nitrificación	72.0 % (±8.3)	73.7 % (±12.1)**
	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N por asimilación	28.0 % (±2.7)	26.3 (±3.9)**
	%NDS	54.0 % (±4.8)	54.0% (±4.7)**

De acuerdo al balance de masa propuesto, en la condición NB no hubo actividad nitrificante durante la fase “feast”, lo que concuerda con los resultados presentados en la Figura 3.5 B. En dicha condición, los procesos de nitrificación y NDS fueron relevantes en el período “famine”.

En la condición NA, a una mayor carga de nitrógeno, los procesos de nitrificación y NDS tuvieron lugar desde el comienzo del ciclo operativo. Los niveles mayores de amonio favorecieron la actividad nitrificante. En el período “feast” se estimó baja actividad de NDS, siendo el proceso de desnitrificación impulsado por el acetato. En dicho período se estimó que el acetato se usó principalmente para el crecimiento microbiano y el almacenamiento de glucógeno y PHA y, en menor medida en el proceso de desnitrificación. En el período “famine”, se estimó que una elevada fracción del nitrato generado se desnitrificaba simultáneamente utilizando reservas intracelulares como fuente de carbono. Esto condujo a un % NDS de 54% el cual fue 2.2 veces mayor que el correspondiente al período “feast” conforme al balance de masa propuesto (Condición NA). En el período “famine” se

Capítulo 3

propone que la degradación de las reservas intracelulares podría acoplarse a la oxidación de amonio, lo que llevaría a un proceso NDS más eficiente que el correspondiente al período “feast” (Tabla 3.8).

3.11 ENSAYOS DE RESPIROMETRÍA Y MODELADO

Los datos experimentales de velocidad de consumo de oxígeno, determinados mediante los ensayos respirométricos descritos en la Sección 3.7.4, de los diferentes grupos microbianos (BOA, BON y heterótrofos) se modelaron utilizando el programa SIGMA PLOT para ambas condiciones experimentales (NB y NA). Para el caso de BOA y BON se utilizó el modelo de Aiba y para microorganismos heterótrofos, oxidantes de carbono orgánico, se aplicó el modelo de Monod.

A- Determinación de la actividad de bacterias oxidantes de amonio (BOA)

En primer lugar, para ambas condiciones el foco del estudio estuvo centrado en determinar qué grupos de microorganismos eran inhibidos por el clorato de sodio. Según bibliografía (Féray y Montuelle, 2003) el clorato de sodio es un inhibidor de la enzima oxido-reductasa presente en BON autótrofos, por ende, el uso de este reactivo permite bloquear la vía de oxidación de nitrito hasta nitrato. Por otro lado, las BON heterótrofas tienen enzimas catalasas (Stein, 2011) las cuales son una categoría de oxido-reductasas. Sin embargo, no existe actualmente bibliografía que indique que el clorato de sodio pueda actuar como inhibidor de dichas enzimas en estos microorganismos, aunque cabe destacar que tampoco existe información contraria. En nuestros ensayos se supuso que este inhibidor bloquea la vía de oxidación de nitrito a nitrato tanto para microorganismos autótrofos como heterótrofos. La ausencia de formación de nitrato en los ensayos realizados con clorato de sodio permitió comprobar dicha hipótesis. Respecto a las BOA autótrofas, se ha informado que no son inhibidas por el clorato de sodio (Féray y Montuelle, 2003), sin embargo, para las BOA heterótrofas no está completamente dilucidado cómo repercute el uso de este inhibidor para este grupo de microorganismos.

Se comparó el ensayo batch con pulso de amonio de 150 mg.L^{-1} e inhibidor clorato de sodio (Batch 4, Figura 3.1) con el ensayo control 2, con igual pulso de amonio pero sin la adición de clorato de sodio, a fin de determinar la acción del mismo. En el control 2 se evidenció la acumulación de nitrito y nitrato mientras que en el ensayo Batch 4 no se

Capítulo 3

observó acumulación de nitrato demostrando que el clorato de sodio inhibe tanto la oxidación de nitrito por BON autótrofos como BON heterótrofos.

Asimismo, se evaluó la inhibición del clorato de sodio sobre las BOA, mediante la comparación de las medidas de OUR obtenidas en el batch N°4 con las del control 2 al inicio del estudio (donde aún no había oxidación de nitrito). Como resultado se obtuvo que las mismas no fueron significativamente diferentes, por lo que consideramos que el clorato de sodio, no es un inhibidor de estas bacterias.

Por lo tanto, este estudio comparativo nos permite demostrar que los ensayos respirométricos realizados son válidos para analizar la actividad de BOA autótrofas y heterótrofas tanto en la condición NB como en la condición NA.

Inicialmente se analizó la condición NB donde se pudo observar, a partir de la Figura 3.6, que concentraciones mayores a 900 mg N.L⁻¹ comenzaban a ser inhibitorias para las BOA (autótrofas y heterótrofas), con valores de FA que ya se consideran inhibitorios por algunos autores para estos grupos metabólicos (FA 18.58 mg.L⁻¹). Respecto a la condición NA, se puede observar en la Figura 3.6 como los microorganismos oxidantes de amonio (autótrofos y heterótrofos) eran inhibidos a partir de concentraciones de nitrógeno mucho menores (500 mg N.L⁻¹), cuyos valores de FA obtenidos también comienzan a ser inhibitorios para el sistema (FA 10.32 mg.L⁻¹).

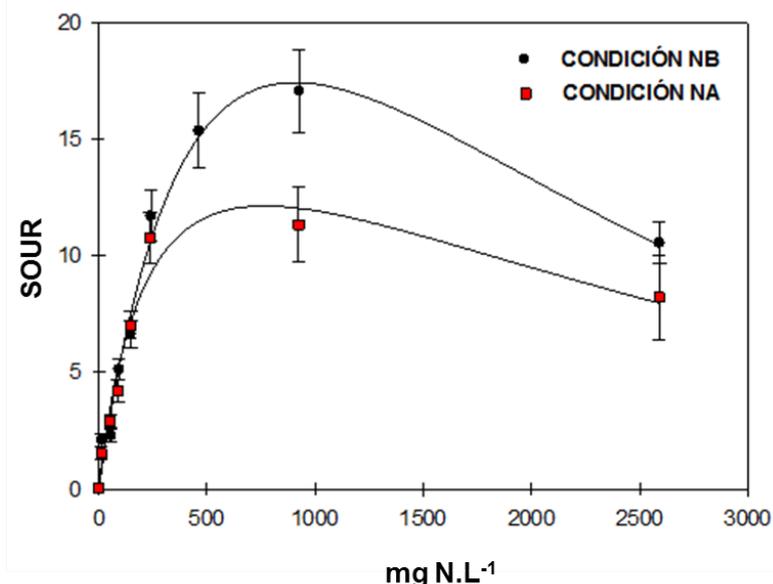


Figura 3.6 Actividad de las BOA en la condición NB y NA

Capítulo 3

En la Tabla 3.9 se pueden observar los valores de Q_{max} , ($SOUR_{BOAm}$) K_S y K_{IA} obtenidos para ambas condiciones experimentales.

Tabla 3.9 Determinación de la actividad de bacterias oxidantes de amonio (BOA).
Análisis estadístico * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$ (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$)

	BOA	
	Condición NB	Condición NA
Q_{max} (mg O_2 ·(g ST·h) ⁻¹)	19.52 (3.4)	13.55(5.9)**
K_S (mg·L ⁻¹)	421.07 (49.9)	275.75 (36)*
K_{IA} (mg·L ⁻¹)	906.67 (102)	618.31 (75.1)*
R^2_{adj}	0.9923	0.9848
F	98	123
P	0.0002	0.0005

También se consideraron los criterios estadísticos R^2 ajustado (R^2_{adj}) y F para comprobar el modelo cinético utilizado. R^2_{adj} es una medida que se encuentra relacionada con la certeza entre los datos experimentales y el modelo propuesto (considerando el número de variables independientes que refleja los grados de libertad). Valores cercanos a 1 de este parámetro indican que la ecuación es una buena descripción de la relación entre las variables independientes y dependientes.

Por otro lado, el valor estadístico F se utiliza para medir la contribución de las variables independientes en la predicción de las variables dependientes.

B- Determinación de la actividad de bacterias oxidantes de nitrito (BON)

Se ha demostrado que la aliltiurea inhibe los organismos oxidantes de amonio (BOA) autótrofos (Liu y col, 2018). Sin embargo, no hay suficientes estudios que indiquen que puede inhibir también la oxidación de amonio a nitrito por parte de las bacterias heterótrofas, pero tampoco hay bibliografía que indique el efecto contrario. Los ensayos respirométricos además de analizar la actividad de las BON permitieron comprobar la eficiencia del inhibidor en BOA heterótrofas. En el control 1 (amonio, aliltiurea, sin nitrito) no se detectó la acumulación de nitrito, permitiendo corroborar que aliltiurea bloquea la

Capítulo 3

vía de generación de nitrito a partir de amonio. Además, se compararon los valores OUR obtenidos en el ensayo batch 5 (amonio, $250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ + aliltiourea) y en el control 3 ($250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$ + aliltiourea, sin amonio). No se encontraron diferencias significativas entre las medidas de OUR. Estos análisis permitieron confirmar la hipótesis acerca que la aliltiourea inhibe, además de las BOA autótrofas, a las BOA heterótrofas. También se corroboró que la ausencia de amonio no afectó la actividad de las BON autótrofas y heterótrofas.

En la Figura 3.7 se puede observar que la inhibición para estos microorganismos comenzó a partir de concentraciones de nitrógeno mayores a 1000 mgN.L^{-1} (Condición NB), con valores de FNA inhibitorios de 3.36 mg.L^{-1} . Para la condición NA se observó el mismo perfil respecto a la inhibición observada en el ensayo A (determinación de la actividad de BOA), donde la concentración de nitrógeno inhibitoria correspondió a valores más bajos, mayor a 300 mg N. L^{-1} (Figura 3.7), con producción de FNA de 1.1 mg.L^{-1} , considerada uno de los valores umbrales iniciales responsables de toxicidad para los microorganismos.

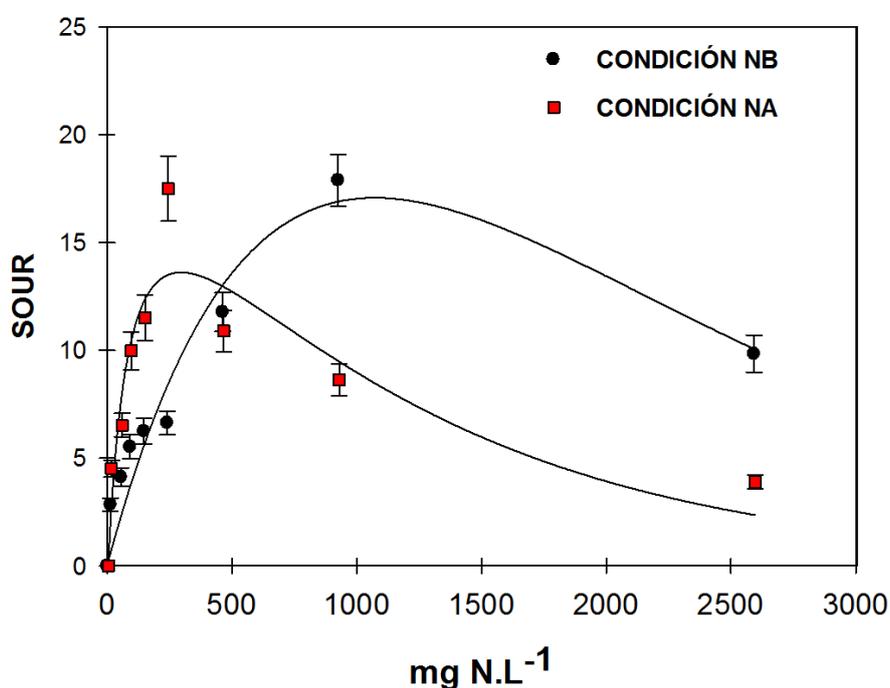


Figura 3.7: Actividad de las BON en la condición NB y NA

Capítulo 3

En la Tabla 3.10 se pueden observar los valores de Q_{max} , K_S y K_{IA} obtenidos para ambas condiciones.

Tabla 3.10: Determinación de la actividad de bacterias oxidantes de nitrito (BON)
Análisis estadístico * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$ (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$).

	BON	
	Condición NB	Condición NA
Q_{max} (mg O ₂ ·(gST.h) ⁻¹)	19.91 (2.5)	14.71 (3.7)*
K_S (mg.L ⁻¹)	511.32 (6.3)	106.02 (1.8)*
K_{IA} (mg.L ⁻¹)	1010.89 (112)	470.09 (59.3)*
R^2_{adj}	0.9600	0.9216
F	65	120
P	0.0002	0.0001

C- Determinación de la actividad de los microorganismos heterótrofos

A partir del ensayo B se pudo observar que el inhibidor alitiourea bloquea el metabolismo tanto de los microorganismos heterótrofos y autótrofos, en la vía de oxidación de amonio.

En la Figura 3.8 (condición NB y NA) se puede observar como la ecuación de Monod se ajustó a los datos respirométricos experimentales. En este estudio el perfil observado fue completamente distinto a lo arrojado por los ensayos A y B. Las gráficas obtenidas no muestran inhibición en el rango de concentraciones de sustrato (acetato de sodio) estudiadas. Los microorganismos presentaron una velocidad máxima de consumo de sustrato (SOUR, mg O₂·(g ST.h)⁻¹) a partir de una concentración de aproximadamente 400 mg DQO.L⁻¹ para ambas condiciones.

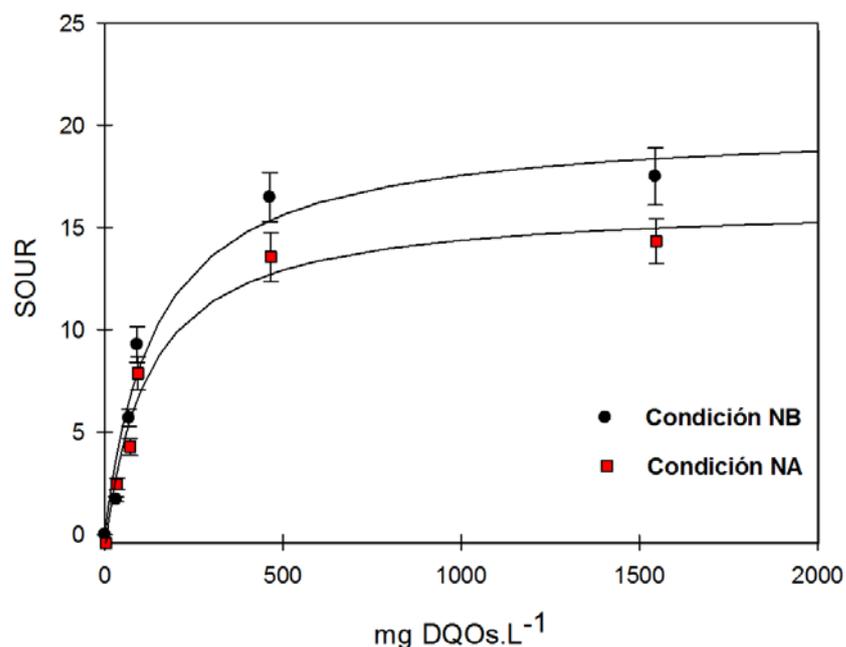


Figura 3.8 Actividad de las bacterias heterótrofas en la condición NB y NA

En la Tabla 3.11 se pueden observar los valores de Q_{max} y K_S obtenidos para ambas condiciones.

Tabla 3.11 Determinación de la actividad de los microorganismos heterótrofos. Análisis estadístico * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$ (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$)

Heterótrofos		
	Condición NB	Condición NA
Q_{max} (mg O ₂ ·(g ST.h) ⁻¹)	20.05 (1.7)	16.60 (1.14)*
K_S (mg.L ⁻¹)	141.6 (38)	121.5 (27.4)**
R^2_{adj}	0.8988	0.9604
F	73	91
P	0.0005	0.0001

A partir de estos estudios se logró determinar el enriquecimiento de microorganismos nitrificantes mediante determinación de la actividad nitrificante relativa (ANR) (Tabla 3.12).

Capítulo 3

Tabla 3.12: Enriquecimiento de microorganismos nitrificantes.

Análisis estadístico * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$ (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$)

ENRIQUECIMIENTO DE MICROORGANISMOS NITRIFICANTES		
	Condición NB	Condición NA
$SOUR_{NITm}(\text{mg O}_2 \cdot (\text{g ST} \cdot \text{h})^{-1})$	39.43	28.26
$SOUR_{TOTm}(\text{mg O}_2 \cdot (\text{g ST} \cdot \text{h})^{-1})$	59.93	44.68
ANR	0.657	0.632**

Tal como se puede observar en la Tabla 3.12 no se encontraron diferencias significativas entre los valores de ANR de la condición NB y la condición NA, sin embargo, se ha podido observar que existe una mayor velocidad de remoción de nitrógeno amoniacal en la condición NA en comparación con la condición NB. No obstante, debe destacarse que dicha velocidad fue determinada en el reactor bajo condiciones de competencia entre los diferentes grupos metabólicos e incluye la remoción de amonio por actividad oxidante y aquella asociada a crecimiento heterótrofo a partir de fuentes de carbono intracelular en fase "famine", mientras que la ANR puede considerarse una medida de la capacidad nitrificante potencial del sistema estimada a partir de las medidas de OUR de cada grupo metabólico, las cuales fueron determinadas de forma independiente en ausencia de competencia.

3.11.1 Evaluación de los parámetros estadísticos de los ensayos respirométricos

En los estudios de respirometría y modelado recientemente desarrollados en la sección 3.11 (A, B y C) se ajustó la ecuación propuesta en cada caso a los datos experimentales obteniéndose los parámetros cinéticos, informados en las Tablas 3.9-3.11, que caracterizan la actividad de los distintos grupos de microorganismos frente a la oxidación de distintos sustratos (amonio, nitrito y acetato de sodio).

Las Tablas 3.9 y 3.10 muestran que basado en el criterio de P, AIBA es un buen modelo para describir la inhibición de oxidación de sustrato representado tanto por el amonio como por el nitrito, el cual indica la probabilidad de equivocarse cuando se concluye que el coeficiente no es cero, es decir cuanto menor sea el valor P, mayor la

Capítulo 3

probabilidad que el coeficiente sea distinto de cero. Asimismo, como se analiza tradicionalmente, $p < 0.05$ indica que la variable independiente se puede utilizar para predecir la variable dependiente, es decir siendo p menor a 0.05 el modelo se considera aplicable (Carrera y col, 2004).

Tal como se indica en las Tablas 3.9 y 3.10 se puede observar que los valores obtenidos de R^2_{adj} fueron para ambas condiciones (NB y NA), en los ensayos de determinación de actividad de microorganismos oxidantes de amonio (ensayo A) y oxidantes de nitrito (ensayo B), cercanos a la unidad (1).

Como se ha mencionado previamente, el valor estadístico F se utiliza para medir la contribución de las variables independientes en la predicción de las variables dependientes. Aquí el análisis es contrario al utilizado para R^2_{adj} , valores de F cercanos a 1, indican que no existe asociación entre las variables (Carrera y col, 2004). En las Tablas 3.9 y 3.10 se puede observar que los valores obtenidos son elevados para este parámetro, confirmando la buena elección del modelo de inhibición.

Respecto al ensayo C, que corresponde a la actividad de los microorganismos heterótrofos (oxidación de carbono orgánico), se consideraron los mismos parámetros estadísticos (Tabla 3.11) que para el modelo de AIBA para evaluar si el modelo de MONOD presentaba un buen ajuste para ambas condiciones (NB y NA). Utilizando el mismo criterio expuesto recientemente acerca de los parámetros P , R^2_{adj} y F se puede observar que este modelo es adecuado para el estudio de este grupo de microorganismos donde P para ambas condiciones es menor a 0.05, los valores de R^2_{adj} son cercanos a 1 y F arrojó valores elevados.

3.11.2 Comparación entre los parámetros cinéticos de la condición NB y la condición NA

Con el fin de evaluar la distribución de los grupos metabólicos en los agregados microbianos y siguiendo el modelo de estudio de Carrera y col, (2004) se estudiaron las relaciones entre los coeficientes K_S para las condiciones NB y NA correspondientes a la actividad de los grupos microbianos (BOA, BON). De igual forma se determinaron las relaciones entre los parámetros K_{IA} , para ambas condiciones, para los ensayos de oxidación de amonio y nitrito (BOA y BON) (Tabla 3.13).

Capítulo 3

Tabla 3.13 Relación entre los parámetros cinéticos K_S y K_{IA} de las condiciones NB y NA

RELACIÓN	$\frac{K_S NB}{K_S NA}$	RELACIÓN	$\frac{K_{IA} NB}{K_{IA} NA}$
	$\left[\frac{K_S NB}{K_S NA} \right]_{BON} \cong 4.82$		$\left[\frac{K_{IA} NB}{K_{IA} NA} \right]_{BON} \cong 2.14$
	$\left[\frac{K_S NB}{K_S NA} \right]_{BOA} \cong 1.53$		$\left[\frac{K_{IA} NB}{K_{IA} NA} \right]_{BOA} \cong 1.46$

Debido a que la relación de los coeficientes K_S y K_{IA} es mayor a 1 (Tabla 3.13), se puede concluir que el coeficiente de la condición NB para todos los estudios está influenciado por la transferencia interna de materia en el gránulo, lo cual indicaría que los coeficientes de esta condición incluyen el efecto del consumo de sustrato y la transferencia de masa interna (Carrera y col, 2004). Asimismo, la relación entre los coeficientes K_S de los dos grupos de microorganismos (BOA y BON) es distinta, lo que indica que la distribución de los grupos metabólicos es heterogénea (Carrera y col, 2004) con diferentes especies de microorganismos distribuidos en la parte interior y exterior del gránulo.

Como se ha mencionado anteriormente (Sección 3.9) en la condición NB se desarrollaron gránulos más pequeños (0.4 mm) que en la condición NA (1.2 mm). Sin embargo, los gránulos más pequeños (condición NB) podrían ser más densos y menos porosos, es decir con menos canales intragranulares. Esta hipótesis permitiría explicar los valores mayores a 1 determinados para la relación de los coeficientes K_S y K_{IA} , particularmente en el caso de las BON (Tabla 3.13). Estas características de la biomasa granular de la condición NB podrían indicar que las BON se encuentran ubicadas principalmente en las capas más internas de gránulos densos y no así expuestas en la superficie. Esta distribución donde las BON se encontrarían menos expuestas, permitiría explicar por un lado los valores hallados y observados en la Tabla 3.10 respecto a los parámetros K_S (aproximadamente cinco veces mayor que la condición NA) y K_{IA} (aproximadamente dos veces mayor que la condición NA). Probablemente los BON en esta última condición (NA) se encuentren en la superficie granular o con un mayor nivel de exposición en el interior de gránulos menos densos con mayor porosidad. Esta exposición podría hacerlos más susceptibles a las concentraciones de FA observadas.

Capítulo 3

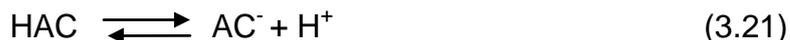
3.12 Velocidad de producción/consumo de protones para el monitoreo de SBR

En los sistemas que involucran lodos activados aeróbicos, los principales procesos que influyen en el pH son los siguientes: nitrificación, consumo de la fuente de carbono y energía, generación de CO₂ por medio del proceso de respiración, consumo de amonio y eliminación de CO₂ por aireación (Gernaey y col, 2002).

En este estudio se consideraron todos los procesos que suceden dentro del biorreactor en ambas condiciones (NB y NA), destacándose los procesos de remoción de nitrógeno inorgánico y carbono orgánico.

La producción o consumo de protones (H⁺) asociados con el consumo de acetato y amonio depende de las reacciones de equilibrio de cada especie química (Guisasola y col, 2007).

El ácido acético (HAC) en solución se disocia parcialmente de acuerdo con la siguiente reacción:



donde HAC y AC⁻ corresponden a las formas no disociadas y disociadas respectivamente.

El consumo de acetato por medio de las bacterias heterótrofas conduce al consumo de H⁺ provocando la alcalinización del sistema. Esto es debido a que los microorganismos consumen la forma no disociada del ácido y los H⁺ son consumidos por la reacción inversa (Pratt et al., 2004).

Cabe destacar que el consumo de protones implicaría un aumento del pH si este parámetro no fuese controlado automáticamente en el biorreactor. La aplicación de la técnica de titulación permite medir el consumo de protones mediante la adición de ácido (Gernaey y col, 2002).

La velocidad de consumo de H⁺ asociada con el consumo de HAC (rHP_{HAC}, mmol H⁺. (L.h)⁻¹) depende de su pK_{AC} (4.8) y el pH del sistema (7.5) y puede ser calculada mediante la siguiente expresión, modificada de Guisasola y col, (2007):

$$r\text{HP}_{\text{HAC}} = - \left(\frac{r\text{HAC}}{1 + 10^{(\text{pK}_{\text{AC}} - \text{pH})}} \right) \quad (3.22)$$

Capítulo 3

donde r_{HAC} corresponde a la velocidad de consumo de acetato expresada como $\text{mmol HAC} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, es decir hace referencia al consumo de H^+ asociado con el consumo de acetato (FCE). Para este análisis, fue necesario convertir el parámetro r_{DQOs} expresado como $\text{mmol O}_2 \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ en unidades de $\text{mmol HAC} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ utilizando el factor de conversión $0.5 \text{ mmol HAC} \cdot \text{mmol O}_2^{-1}$.

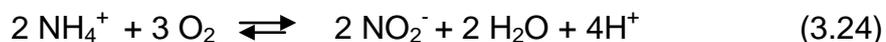
Debido a que el ácido acético está principalmente en forma disociada a un pH de 7.5, en el presente trabajo de tesis cabe esperar que el consumo de acetato cause una elevada velocidad de consumo de H^+ .

Otro de los procesos que tuvo lugar en el SBR_{ACET} (condiciones NB y NA) correspondió al consumo de amoníaco. Al ser el amoníaco una base débil ($\text{pK}_{\text{NH}_3} = 9.25$), se encuentra principalmente en forma protonada (NH_4^+) en el rango de pH cercano a la neutralidad. Por lo tanto, el consumo microbiano de amoníaco genera acidificación del sistema. La velocidad de producción de H^+ de este proceso ($r_{HP_{\text{NH}_3}}$, $\text{mmol H}^+ \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) se estimó mediante la siguiente expresión (modificada de Guisasola y col, 2007):

$$r_{HP_{\text{NH}_3}} = \left(\frac{r(\text{NH}_3 - \text{N})_T}{1 + 10^{(\text{pK}_{\text{NH}_3} - \text{pH})}} \right) \quad (3.23)$$

donde $r(\text{NH}_3 - \text{N})_T$ corresponde a la velocidad de consumo de amoníaco total expresado como $\text{mmol N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$.

Otro de los procesos que tomó lugar en el biorreactor fue la nitritación, la primera etapa del proceso de nitrificación, la cual también contribuye a la acidificación del sistema de acuerdo con la siguiente expresión:



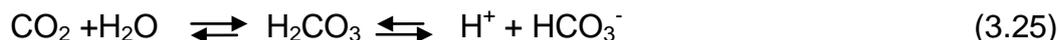
Según esta reacción, la r_{HP} correspondiente al proceso de nitrificación (r_{HP_N} , $\text{mmol H}^+ \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) puede ser calculada de la siguiente forma: $2 \cdot r(\text{NH}_3 - \text{N})_{\text{OX}}$. Para ello, $r(\text{NH}_3 - \text{N})_{\text{OX}}$ debe ser estimada a partir de la diferencia entre $r(\text{NH}_3 - \text{N})_T$ ($\text{mmol N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) y $r(\text{NH}_3 - \text{N})_X$ ($\text{mmol N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) (ecuación 3.16). Cabe destacar que la relación $\text{NH}_4^+ : \text{H}^+$ propuesta en la ecuación 3.24 fue utilizada con éxito en diferentes estudios para medir las velocidades

Capítulo 3

de nitrificación en sistemas operados con control de nitrógeno mediante sensores de pH (Massone y col, 1996).

Respecto al proceso de desnitrificación, el mismo contribuye a la alcalinización del sistema. Este proceso neutraliza aproximadamente la mitad de la acidez generada por nitrificación. En la desnitrificación con NO_3^- -N como aceptor de electrones, se ha asumido que se consume un H^+ por cada ion de NO_3^- que traspasa la pared celular, considerando que HNO_3 es un ácido fuerte (Petersen y col, 2002). Basado en este supuesto propuesto por estos autores, en el presente trabajo de tesis la rHP de desnitrificación ($r\text{HP}_D$, $\text{mmol H}^+ \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) se estimó como: $-1 \cdot r(\text{NO}_3^- - \text{N})_D$ expresada como $\text{mmol N} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$.

Otros procesos que tienen lugar en reactores biológicos aireados son la producción y la eliminación del CO_2 (stripping o desgasificación de CO_2), los cuales contribuyen a la generación y pérdida de H^+ respectivamente según la reacción de equilibrio del ácido carbónico (Guisasola y col, 2007), presentada en la siguiente expresión:



El CO_2 se produce a partir de la oxidación de acetato, glucógeno y PHA; mientras que la aireación genera una eliminación continua de CO_2 por medio del proceso de stripping. La rHP asociada con la producción neta de CO_2 ($r\text{HP}_{\text{CO}_2}$; $\text{mmol H}^+ \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) corresponde a la diferencia entre los procesos de producción y eliminación de CO_2 por stripping.

Finalmente, la rHP resultante de la combinación de los procesos de nitrificación y desnitrificación corresponde a:

$$r\text{HP}_{N+D} = r\text{HP}_N + r\text{HP}_D \quad (3.26)$$

Cabe destacar que $r\text{HP}_{\text{HAC}}$ y $r\text{HP}_D$ presentan valores negativos ya que implican el consumo de H^+ (alcalinización); mientras que $r\text{HP}_{\text{NH}_3}$ y $r\text{HP}_N$ presentan valores positivos contribuyendo a la acidificación. El $r\text{HP}_{\text{CO}_2}$ puede presentar valores positivos o negativos dependiendo del fenómeno prevalente, es decir la producción o la eliminación de CO_2 . Este parámetro $r\text{HP}_{\text{CO}_2}$ ($\text{mmol H}^+ \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) se estimó a partir del balance de rHP, el cual está

Capítulo 3

basado en la contribución de todos los procesos biológicos y físico-químicos involucrados de acuerdo con la siguiente expresión:

$$rHP_{Total} = rHP_{HAC} + rHP_{NH_3} + rHP_{N+D} + rHP_{CO_2} \quad (3.27)$$

donde rHP_{Total} ($\text{mmol H}^+ \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$) corresponde al valor de rHP determinado por titulación.

Para ambas condiciones NB y NA, los diferentes parámetros cinéticos (rHP) se calcularon considerando la parte inicial (lineal) de los períodos “feast” y “famine” para todos los ciclos operativos. La rHP total del SBR_{ACET} se determinó mediante el método de titulación para ambas fases.

Se observó que, para ambas condiciones, durante las primeras horas se produjo una disminución lineal en HP (consumo de H^+), lo cual fue relacionado con el consumo de la FCE (acetato) por las bacterias heterótrofas (período “feast”). Se observó una transición entre los períodos “feast” y “famine”, en la cual el consumo de protones fue compensado por el proceso de producción asociado a la nitrificación. En el período “famine”, se observó una producción continua de H^+ (aumento lineal) para ambas condiciones, lo cual fue asociado principalmente con el proceso de nitrificación (Figura 3.9)

Capítulo 3

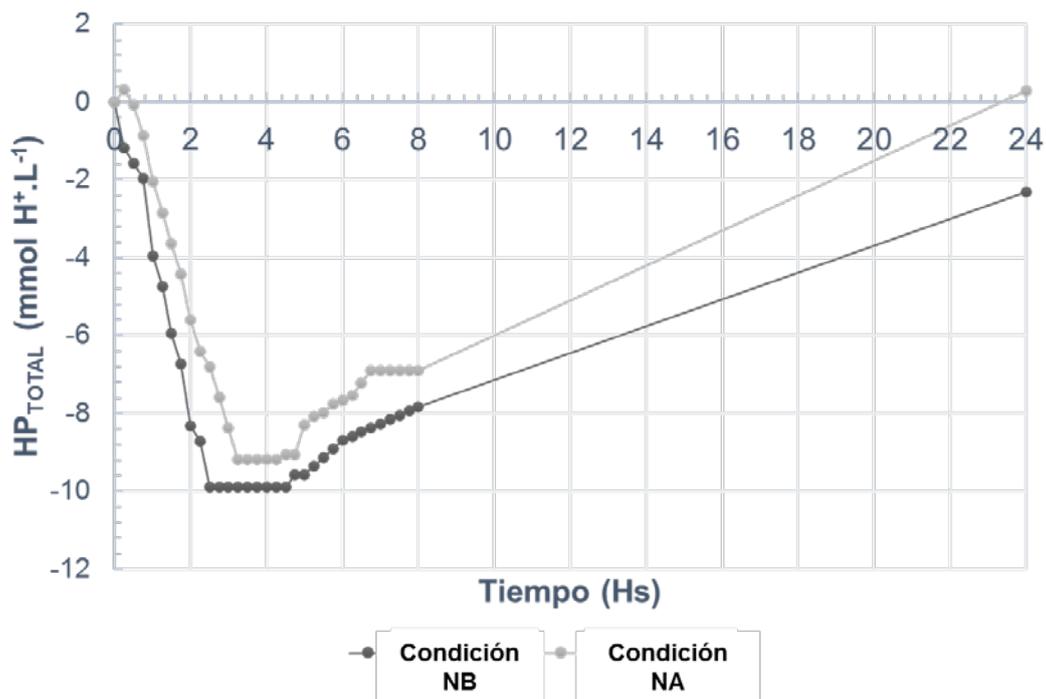


Figura 3.9: Perfil del HP de ambas condiciones (NB y NA) en función del tiempo

A partir de este gráfico y la estimación de rHP_{HAC} se pudo encontrar una correlación lineal entre rHP_{Total} y rHP_{HAC} , que incluyó los valores correspondientes al período “feast” de todos los ciclos operativos para ambas condiciones experimentales, representada por $rHP_{HAC} = 0.722.rHP_{Total} + 0.161$ ($R^2 = 0.936$) (Figura 3.10). Esta correlación, con una pendiente cercana a 1, permitió inferir que el consumo de acetato influye fuertemente en el cambio de pH. De manera similar, Gernaey y col, (2002) encontraron una relación lineal entre el acetato agregado y la cantidad de H^+ consumido en ensayos de degradación aeróbica.

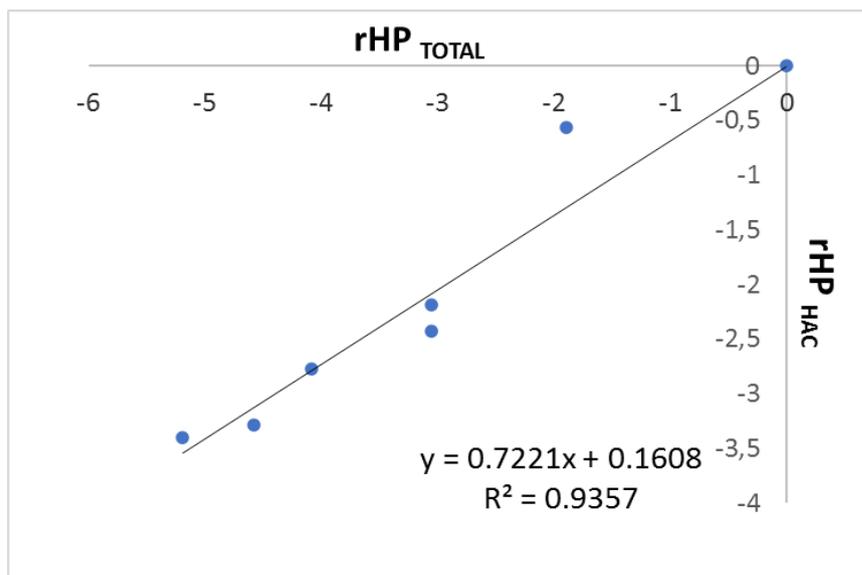


Figura 3.10: Correlación lineal entre rHP_{Total} y rHP_{HAC} .

Para el período “famine” se encontró una correlación lineal entre los valores obtenidos de rHP_{TOTAL} y rHP_{N+D} para todos los ciclos operativos de ambas condiciones, $rHP_{N+D} = 0.795 \cdot rHP_{TOTAL} - 0.038$, $R^2 = 0.937$ (Figura 3.11). La pendiente obtenida, cercana a 1, permitió determinar que los procesos de nitrificación-desnitrificación fueron los más relevantes en el cambio de pH de los sistemas estudiados en la fase “famine”. Esto se demuestra también en la Tabla 3.14 donde se presentan los valores promedio de rHP de todos los parámetros biológicos y fisicoquímicos estimados para los ciclos operativos estables de las condiciones NB y NA. Puede observarse que el consumo de protones causado por el consumo de DQO es el proceso que más fuertemente influyó en el cambio de pH (período “feast”). El valor promedio de rHP_{HAC} para la condición NB fue significativamente menor al valor hallado para condición NA en el período “feast”, lo cual se corresponde con lo observado para las velocidades de consumo de DQO ($rDQOs$) (Tabla 3.6).

Capítulo 3

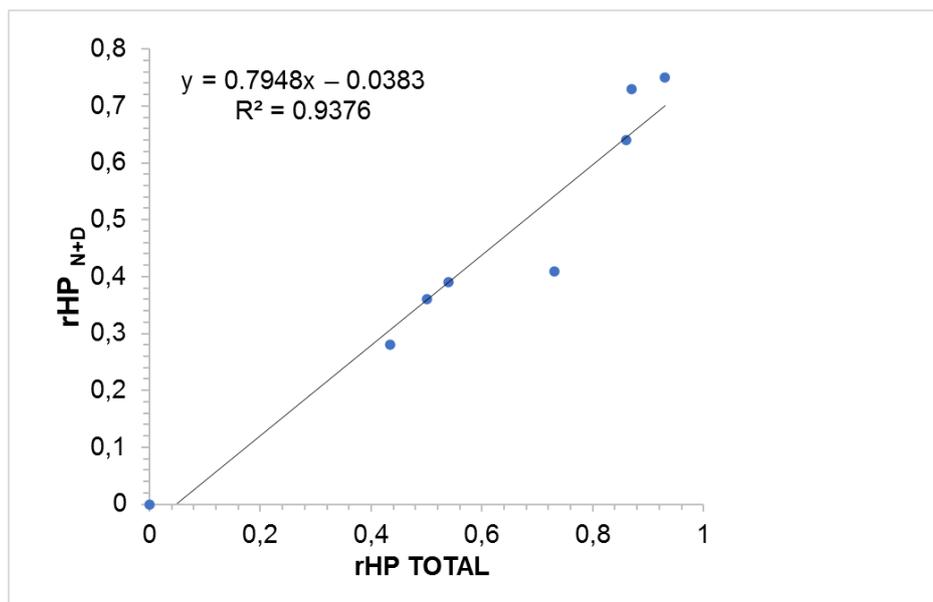


Figura 3.11: Correlación lineal entre rHP_{Total} y rHP_{N+D} .

Conforme a la correlación obtenida entre rHP_{Total} y rHP_{HAC} (Figura 3.10) resulta factible monitorear fácilmente la velocidad de consumo de acetato, en fase “feast” del sistema, mediante la determinación de la velocidad de consumo de H^+ .

Con respecto a los valores de rHP_N y rHP_{N+D} , en el caso de la condición NB se observó que los procesos de nitrificación y desnitrificación se volvieron relevantes una vez consumido casi completamente el acetato (período “famine”). En la condición NA, la nitrificación comenzó en el período “feast” generando nitrato (Figura 3.8 D); no obstante, no fue el proceso principal. Los valores de rHP_N y rHP_{N+D} estimados para el período “feast” y “famine” de la condición NA fueron relevantes. La producción de H^+ que estuvo asociada con el consumo de NH_3 fue insignificante (Tabla 3.14).

En el período “feast”, en ambas condiciones, se estimó una pérdida neta de CO_2 que condujo a un consumo de H^+ (rHP_{CO_2} negativo, Tabla 3.14). De acuerdo a estas estimaciones puede concluirse que el proceso de stripping fue más relevante que los procesos de producción metabólica de CO_2 .

Capítulo 3

Tabla 3.14: Valores de rHP promedio correspondientes a todos los procesos biológicos y fisicoquímicos estimados para todos los ciclos estables de las condiciones NB y NA. Análisis estadístico * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$ (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$).

mmol H^+ ·(L·h) ⁻¹	CONDICIÓN NB		CONDICIÓN NA	
	FEAST	FAMINE	FEAST	FAMINE
rHP_{TOTAL}	-3.78 (0.5)	0.73 (0.07)	-4.08 (0.54)	0.86 (0.09)
rHP_{NH_3}	0.06E ⁻¹ (0.80E ⁻²)	0.04E ⁻¹ (0.80E ⁻²)	0.05E ⁻¹ (0.10E ⁻¹)	0.09E ⁻¹ (0.70E ⁻²)
rHP_N	0.00 (0.00)*	0.44 (0.04)*	0.70 (0.02)*	0.89 (0.09)*
rHP_D	0.00 (0.00)*	-0.12 (0.01)*	-0.20 (0.02)*	-0.25 (0.03) *
rHP_{N+D}	0.00 (0.00)	0.32 (0.05)	0.5 (0.01)	0.64 (0.06)
rHP_{HAC}	-2.81 (0.44)*	-0.08 (0.07)**	-3.10 (0.23)*	-0.20 (0.10)**
rHP_{CO_2}	-1.03 (0.24)	0.49 (0.05)	-1.53 (0.60)	0.40 (0.32)

En el período “famine”, la velocidad de producción de H^+ asociada con el proceso de nitrificación (rHP_N) en la condición NA fue el doble a la correspondiente a la condición NB. La rHP_D para la condición NA fue también el doble de la determinada en la condición NB. Estos resultados indican que tanto la nitrificación como la desnitrificación fueron favorecidas a una mayor carga de nitrógeno. Asimismo, se observó que los valores de rHP_{N+D} también fueron más elevados en la condición NA (Tabla 3.14). Finalmente cabe destacar que la cinética de NDS fue favorecida por una mayor carga de nitrógeno (Tabla 3.14); sin embargo, esto no implicó un aumento en el porcentaje de eliminación de nitrógeno (Tabla 3.6). Este resultado pudo deberse al hecho de que la carga volumétrica aplicada en la condición NA fue 50% mayor que la correspondiente a la condición NB.

El balance de nitrógeno propuesto junto con la técnica de titulación constituyen metodologías económicamente viables y de fácil aplicación que permiten el rápido monitoreo del proceso NDS y del consumo de carbono orgánico.

Capítulo 3

3.13 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En el presente capítulo se estudió el proceso de nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS) en un reactor discontinuo secuencial (SBR) granular aeróbico, bajo condiciones alternantes de disponibilidad de carbono orgánico (fase “feast”) e inanición (fase “famine”), utilizando un efluente sintético fácilmente biodegradable basado en acetato de sodio y sulfato de amonio. Se han estudiado dos condiciones diferenciadas por la carga de nitrógeno (baja (NB) y alta (NA)). En ambas se pudo obtener estabilidad del sistema, en relación al tamaño granular y eficiente remoción de carbono orgánico y nitrógeno amoniacal. La condición NA ha demostrado mayores velocidades de remoción simultánea de nitrógeno amoniacal y carbono debido probablemente a una mayor concentración de $\text{NH}_3\text{-N}$ inicial que pudo haber favoreció la actividad nitrificante, sin afectar el consumo heterotrófico de la fuente de carbono y energía.

Se ha observado que el proceso de NDS ocurrió principalmente en el período “famine” (período de inanición) en ambos estudios con desnitrificación impulsada por fuentes de carbono intracelulares como PHA y glucógeno según el balance de masa propuesto en este capítulo, que permitió estimar y discriminar entre los procesos de crecimiento heterótrofo, nitrificación y NDS para cada período (“feast” y “famine”) como así también para el ciclo total. El amonio fue completamente removido en ambas condiciones, siendo la nitrificación el principal proceso responsable representando 72-74% del amonio total removido conforme a dicho balance. Asimismo, mediante la utilización de técnicas respirométricas y el adecuado ajuste obtenido de los modelos de Aiba y Monod a los datos experimentales de la actividad respiratoria de nitrificantes (BOA y BON) y heterótrofos respectivamente se ha demostrado la tolerancia y actividad de cada grupo metabólico a diferentes concentraciones de sustratos: amonio, nitrito y acetato como fuente de carbono y energía. A su vez, estos estudios pudieron determinar el enriquecimiento de bacterias nitrificantes en el sistema, el cual no difirió entre las dos condiciones experimentales estudiadas.

Finalmente, se logró demostrar que los procesos de consumo de carbono orgánico y NDS pueden ser monitoreados por la técnica de titulación, la cual es simple, rápida y económica, y permite poder comprender de forma sencilla los procesos que ocurrían en cada período del ciclo en estudio.

CAPÍTULO 4

**DETERMINACIÓN DE LAS VÍAS METABÓLICAS DE
REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y ANÁLISIS DE LA
COMPOSICIÓN MICROBIANA MEDIANTE HERRAMIENTAS
BIOTECNOLÓGICAS**

CAPÍTULO 4: DETERMINACIÓN DE LAS VÍAS METABÓLICAS DE REMOCIÓN DE NITRÓGENO Y ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS

4.1 OBJETIVOS

- Estudio del consorcio microbiano (de la composición de la comunidad microbiana) presente en los gránulos, mediante NGS, y su relación con los procesos de remoción de carbono orgánico y nitrógeno.
- Evaluación de vías metabólicas de remoción de nitrógeno en sistemas granulares aeróbicos.
- Evaluación cualitativa de los grupos metabólicos presentes en los SBRs.

4.2 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD: METABARCORDERING

Se realizó un análisis de metabarcoding (Mercier y col, 2013) para determinar la composición y la abundancia relativa de las poblaciones bacterianas presentes en el biorreactor. Metabarcoding hace referencia a un método rápido de evaluación de la biodiversidad que combina dos tecnologías: identificación basada en ADN y secuenciación de ADN de alto rendimiento. Esto permitió determinar la relación entre los procesos implicados en el tratamiento de un efluente modelo (fácilmente biodegradable), para lograr una adecuada eliminación simultánea de nitrógeno y carbono, y los microorganismos involucrados en esos procesos.

Tal como se mencionó en la sección 2.15, la secuenciación por el método de alto rendimiento (NGS, next generation sequencing technology) de los fragmentos de PCR del gen 16S rARN se realizó a partir del ADN total extraído de la biomasa granular presente en el SBR_{ACET}. Este estudio fue llevado a cabo únicamente en la condición NB (carga de nitrógeno baja), debido a que ambas condiciones ensayadas en el SBR presentaron perfiles similares respecto a la eliminación de nitrógeno inorgánico para el ciclo total como así también en los valores obtenidos de %NDS para el período “famine” y ciclo total. La predicción obtenida por PICRUSt, utilizando la base de datos de Greengenes, permitió revelar KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes o bien Enciclopedia de genes y genomas de Kioto) ortólogos (KO). Como ya se ha mencionado en el capítulo 2, la misma es una colección de bases de datos en línea de genomas, rutas enzimáticas, y químicos biológicos.

Capítulo 4

Por otra parte PICRUSt es un paquete de software bioinformático de Investigación filogenética de comunidades microbianas. Esta herramienta sirve en el campo del análisis metagenómico permitiendo la inferencia del perfil funcional de un microorganismo.

4.3 DETERMINACIÓN DE RUTAS METABÓLICAS: PREDICCIÓN POR PICRUSt

Tal como se indicó anteriormente se utilizó PICRUSt para revelar KEGG ortólogos (KO). Para lograr una mejor comprensión de la nomenclatura es necesario destacar que cuando se inició la base de datos KEGG en el año 1995, el número EC se utilizó como un identificador primario con el fin de poder reconstruir la ruta metabólica a partir del genoma completo. Los números EC (Enzyme Commission numbers) representan un esquema de clasificación numérica para las enzimas, basado en las reacciones químicas que catalizan. Cada número EC está asociado a un nombre recomendado para dicha enzima; los números EC codifican reacciones catalizadas por enzimas. Enzimas diferentes, pudiendo proceder de organismos diferentes, que catalicen la misma reacción recibirán el mismo número EC. Posteriormente en el año 1999 se introdujeron ID de genes ortólogos para reemplazar los números de la EC e identificar las vías metabólicas y no metabólicas. Las ID de genes ortólogos se convirtieron luego en KO en el año 2002. Actualmente, los números EC se tratan como atributos de KO. Existen casos en los que se asignan múltiples números EC al mismo KO o bien un solo número EC se puede dividir en múltiples grupos de similitud de secuencia (que a menudo representan múltiples grupos de organismos). El Comité de Nomenclatura Bioquímica IUBMB / IUPAC (anteriormente, Comisión de Enzimas) proporciona los números de la EC en la lista de Nomenclatura de enzimas en base a datos experimentales publicados sobre reacciones enzimáticas. Desafortunadamente, la lista de nomenclatura enzimática no contiene información de la secuencia de aminoácidos de las enzimas utilizadas en los experimentos. Sin embargo, es una práctica común asignar números EC en las bases de datos de secuencias (Kanehisa y col, 2017).

Existe una gran dificultad para comprender los procesos biológicos y vías metabólicas en hábitat naturales complejos y heterogéneos e incluso en sistemas de tratamiento de efluentes complejos y de difícil degradación, cuando poseen múltiples contaminantes, así como compuestos tóxicos. Es por este motivo que se plantea el uso de un efluente sintético modelo de aguas residuales fácilmente biodegradables, con fuentes de carbono y nitrógeno de sencilla asimilación (como es el acetato y sulfato de amonio),

Capítulo 4

como propósito de facilitar la identificación y comprensión de los mecanismos y vías metabólicas responsables de la eliminación de contaminantes de interés en sistemas granulares aeróbicos.

4.4 TEST BIOQUÍMICOS

Mediante los ensayos descritos en la sección 2.13 se analizaron de forma cualitativa las cepas bacterianas involucradas en los procesos biológicos de la condición de NB. Esta caracterización demostrada en la Tabla 4.1, permitió observar la presencia en esta condición de grupos de bacterias oxidantes de amonio y nitrito y de bacterias desnitrificantes. Sin embargo, tal como se observa en los resultados expuestos no se ha observado la producción de N_2 .

Tabla 4.1: Características bioquímicas de las cepas del consorcio microbiano de la condición NB

Características	Condición NB
Oxidantes de amonio	+
Oxidantes de nitrito	+
Producción de N_2	-
Desnitrificantes	+

Esto pudo deberse a las limitaciones que posee el método utilizado y asimismo a las condiciones en las cuales se desarrolla, considerando que este estudio comprende sólo la detección de bacterias desnitrificantes anóxicas convencionales, y no así desnitrificantes aeróbicos como tampoco permite revelar la presencia de bacterias que posean la capacidad de nitrificar y desnitrificar bajo condiciones de aerobiosis (NHDA).

4.5 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LOS GRÁNULOS

La extracción de ADN de la biomasa permitió evaluar un total de 59250 secuencias agrupadas en 813 OTU. Todas las secuencias representativas de cada OTU se clasificaron dentro del dominio Bacteria. La frecuencia relativa reveló la presencia de 6 órdenes bacterianos principales (Figura 4.1 A), entre los cuales prevalecieron 15 géneros principales (Figura 4.1 B). Los filos más abundantes encontrados fueron Proteobacterias

Capítulo 4

representando el 72% y Bacteroidetes el 25%. En menor proporción se hallaron los filos Verrucomicrobia (2%), Planctomycetes y Actinobacteria (que representaron menos del 1%).

Dentro del filo Proteobacteria, los órdenes más abundantes encontrados fueron: Rhodocyclales, Burkholderiales, Sphingomonadales y Xanthomonadales (Figura 4.1 A). En relación con los procesos estudiados en el biorreactor, se pudo predecir una correlación con la función de los microorganismos encontrados en el análisis de ADN. En primer lugar, en referencia al proceso de remoción de nitrógeno inorgánico, muchas bacterias que pertenecen al filo proteobacteria presentan un metabolismo capaz de transformar nitrógeno inorgánico y acumular y degradar sustancias de reservas. El orden Rhodocyclales, el cual presenta bacterias capaces de llevar a cabo la reducción de nitratos (Pacheco-Sánchez y col, 2019), mostró diferentes, géneros, siendo *Thauera* (4%), *Dechloromonas* (8.14%) y *Zoogloea* (43.25%) los más representativos en este estudio (Figura 4.1 B). El género *Thauera* se ha informado como nitrificante parcial heterótrofo (Chen y Ni, 2010) y desnitrificante aeróbico. Cabe destacar que *Thauera* es un género de bacterias Gram-negativas. La mayoría de las especies de este género son móviles por flagelos y en su mayoría tienen forma de bastón. La especie se encuentra en suelo húmedo y agua dulce contaminada.

Se ha demostrado además que puede desnitrificar en ambientes anóxicos y reducir especies de nitrógeno como nitrato de forma incompleta tanto en sistemas aeróbicos como anóxicos (Pishgar y col, 2019). El género *Dechloromonas* se caracteriza por ser un desnitrificante dominante con excelente capacidad para eliminar diferentes especies de nitrógeno inorgánico (Han y col, 2019). Se ha observado que puede reducir tanto especies de nitrato como nitrito y desnitrificar de forma aeróbica (Pishgar y col, 2019). *Zoogloea* presenta genes de nitrato reductasa periplásmica y una tasa metabólica extremadamente alta de eliminación de amoníaco comparada con otros géneros nitrificantes (Huang y col, 2015). Es conocido que la actividad desnitrificante de *Zoogloea* es estimulada por la alta disponibilidad de amoníaco. *Zoogloea* se ha caracterizado en los últimos tiempos por ser otra de los géneros con capacidad de nitrificación heterótrofa y desnitrificación aeróbica mediante el estudio de su gen *napA* (Pishgar y col, 2019), sin embargo, se ha destacado que su actividad depende en gran medida de la disponibilidad de nitrógeno amoniacal presente en el sistema. A diferencia de *Thauera*, este género se desarrolla en condiciones estrictamente aeróbicas (Pishgar y col, 2019).

Capítulo 4

Además, un estudio realizado por Cui y col (2016) informó que los géneros *Dechloromonas* y *Thauera* son capaces de acumular PHA como reserva de energía cuando utilizan como fuente de carbono y energía el acetato.

Diaphorobacter (4.28%) fue el género más abundante hallado en el orden Burkholderiales. Zhang y col, (2017) informaron que este orden (específicamente el género *Diaphorobacter*) presenta las enzimas necesarias para llevar a cabo tanto la nitrificación heterotrófica como la desnitrificación aeróbica. Xanthomonadales, particularmente el género *Lysobacter* (1.62%) representó el último orden relevante del filo proteobacterias en la condición NB del SBR_{AC} (Figura 4.1 B). Ya ha sido descrita por Sakuntal y col, (2016) la relevancia que tiene este orden en los procesos de nitrificación, lo cual respaldó nuestros hallazgos.

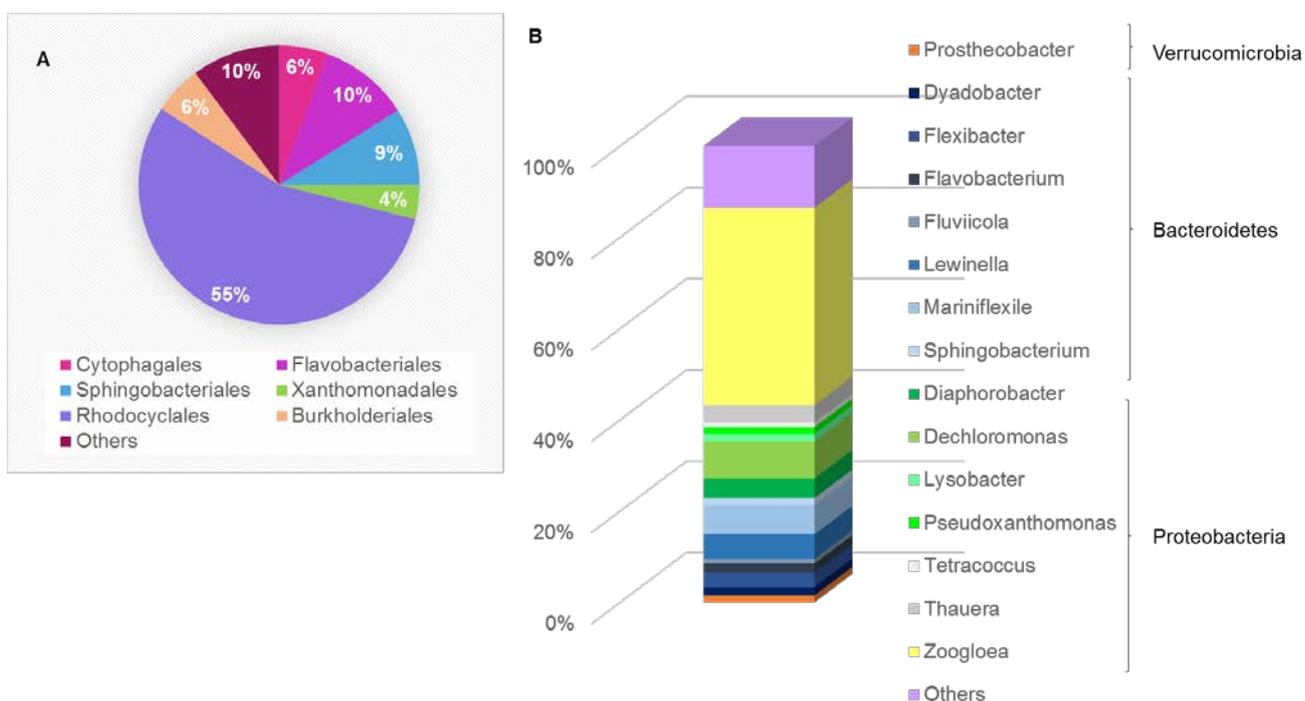


Figura 4.1: Abundancia relativa a nivel de orden (A) y género (B) en el SBR_{AC}. En la Figura B se muestran sólo las lecturas que representaron más del 2%, para una mejor interpretación de resultados, de la frecuencia relativa de los filios más relevantes y sus géneros más abundantes según lo revelado por la secuenciación Illumina. Los géneros con <1% de lecturas pertenecientes a cada filo se agruparon en "Others"

Capítulo 4

Dentro del phylum Bacteroidetes, los órdenes más relevantes encontrados fueron: Sphingobacteriales (9%) y Flavobacteriales (10%). Por un lado, cabe destacar que bacterias pertenecientes al orden Sphingobacteriales son conocidas por la capacidad de fijar CO₂ y degradar materia orgánica (Hester y col, 2018). Por otro, respecto al orden Flavobacteriales, Yang y col, (2019) informaron que es capaz de reducir nitrato y participar en los procesos de desnitrificación mediante un estudio llevado a cabo a partir de la cepa UJ101 perteneciente al género *Flavobacterium*. Este género estuvo presente en este estudio en un porcentaje de 1.92% (Figura 4.1 B). Asimismo, es importante mencionar que *Flavobacterium* tiene la capacidad de nitrificar y desnitrificar aeróbicamente (Yang y col, 2019).

Respecto al filo Planctynomicetes, el cuál se encuentra en una pequeña proporción en nuestro estudio, presenta especies que cumplen un papel importante en el proceso anammox. Las especies de este filo presentan un papel crucial en el ciclo biológico del nitrógeno ya que se estima que producen aproximadamente la mitad del gas nitrógeno (N₂) presente en la atmósfera (Van Teeseling y col, 2015).

Los principales géneros detectados en el SBR_{AC} (Condición NB) y su abundancia relativa son presentados en la Tabla S4 (Material suplementario, Capítulo 4)

Respecto a los microorganismos tradicionales encargados de la nitrificación autotrófica convencional (BOA y BON) se detectaron *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* en porcentajes muy bajos (<0.15 %) (Tabla S4 Material suplementario, Capítulo 4).

4.6 EVALUACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS A LOS PRINCIPALES PROCESOS BIOLÓGICOS

La predicción obtenida por PICRUSt, utilizando la base de datos de Greengenes, reveló 35 KEGG ortólogos (KO) que pertenecen a genes funcionales en las OTU bacterianas de los géneros más relevantes en el ciclo del nitrógeno encontrados en el SBR_{AC} (condición NB) involucrados en las rutas metabólicas de la transformación de nitrógeno inorgánico y la fijación de carbono (Tabla 4.2). Sin embargo, también hemos encontrado otros KO, con funciones relevantes en el ciclo del nitrógeno, en géneros menos abundantes en el sistema estudiado. Se puede observar en la Tabla 4.2 las funciones de cada una de las enzimas representadas en términos de KO (las más relevantes son representadas con un asterisco,*).

Capítulo 4

Para una mejor interpretación de la información obtenida, el análisis de KO se realizó a nivel de orden. En la Figura 4.2 se puede apreciar la distribución de KO entre los órdenes más relevantes.

Según la predicción de PICRUSt y el análisis de los géneros más abundantes en el sistema, Rhodocyclales fue considerado el principal grupo bacteriano funcional capaz de realizar la fijación de nitrógeno, mediado por reacciones clave catalizadas por enzimas nitrogenasa (K02586, K02588 y K02591) (Figura 4.2 A y Tabla 4.2). A partir de este análisis también se observó una contribución importante, aunque menor, de K02591 por Sphingomonadales y Burkholderiales.

Rhodocyclales fue también el principal contribuyente a las enzimas involucradas en la reducción desasimilatoria de nitrato y en el proceso de desnitrificación. Esto se observa principalmente por la presencia de la enzima nitrito reductasa representada por los siguientes KO: K00368 y K00363, y la enzima nitrato reductasa representada por K00370, K00371, K00374, K02567 y K02568.

La desnitrificación también estuvo representada por la enzima nitrato reductasa periplásmica NapA (K02567), óxido nítrico reductasa, subunidad II que contiene citocromo c (K02305) y la subunidad B de óxido nítrico reductasa (K04561) que se encontraron en el orden Rhodocyclales. Se destaca que los KO recientemente mencionados también se encontraron de forma significativa en el orden Xantomonadales, principalmente mediante K04561 y K00363, que se encuentran involucrados en el proceso de desnitrificación y reducción desasimilatoria de nitrato respectivamente (Figura 4.2 y Tabla 4.2).

Capítulo 4

Tabla 4.2: Kegg Orthologs (KO) involucrados en las rutas metabólicas de la transformación nitrógeno inorgánico, la producción de PHB y la fijación de carbono.

(* indica los KO más abundantes)

KO	Descripción
K00260	glutamate dehydrogenase [EC:1.4.1.2]
K00261	glutamate dehydrogenase (NAD(P)+) [EC:1.4.1.3]
K00262	glutamate dehydrogenase (NADP+) [EC:1.4.1.4]
K00265	glutamate synthase (NADPH/NADH) large chain [EC:1.4.1.13 1.4.1.14]
K00284	glutamate synthase (ferredoxin) [EC:1.4.7.1]
K00362	nitrite reductase (NAD(P)H) large subunit [EC:1.7.1.4]
K00363 *	nitrite reductase (NAD(P)H) small subunit [EC:1.7.1.4]
K00366	ferredoxin-nitrite reductase [EC:1.7.7.1]
K00367	nitrous-oxide reductase [EC:1.7.99.6] y [EC:1.7.2.4], ferredoxin-nitrate reductase [EC:1.7.7.2]
K00368 *	nitrite reductase (NO-forming) [EC:1.7.2.1]
K00370 *	nitrate reductase 1, alpha subunit [EC:1.7.99.4]
K00371 *	nitrate reductase 1, beta subunit [EC:1.7.99.4]
k00372	nitrate reductase catalytic subunit [EC:1.7.99.4]
K00374 *	nitrate reductase 1, gamma subunit [EC:1.7.99.4]
K00376 *	nitrous-oxide reductase [EC:1.7.99.6], nitrous-oxide reductase [EC:1.7.2.4]
K00390	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]
K00459	nitronate monooxygenase [EC:1.13.12.16]
K00531	nitrogenase [EC:1.18.6.1]
k01501	nitrilase [EC:3.5.5.1]
K01915	glutamine synthetase [EC:6.3.1.2]
K02305 *	nitric-oxide reductase, cytochrome c-containing subunit II [EC:1.7.99.7], nitric oxide reductase, cytochrome c-containing subunit II
K02567 *	periplasmic nitrate reductase NapA [EC:1.7.99.4]
K02568 *	nitrate reductase (cytochrome), electron transfer subunit, ferrocyanide:nitrate oxidoreductase [EC 1.9.6.1]
K02575	MFS transporter, NNP family, nitrate/nitrite transporter
k02586 *	nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain [EC:1.18.6.1]
K02588 *	nitrogenase iron protein NifH [EC:1.18.6.1]
K02591 *	nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain [EC:1.18.6.1]
K03385	nitrite reductase (cytochrome c-552) [EC:1.7.2.2]
K04561 *	nitric oxide reductase subunit B [EC:1.7.2.5]
K05601	hydroxylamine reductase [EC:1.7.99.1]
K10535	hydroxylamine oxidase [EC:1.7.3.4]
k10944	ammonia monooxygenase subunit A [EC:1.13.12]
K10945	ammonia monooxygenase subunit B [EC:1.13.12]

METABOLISMO DEL NITRÓGENO

K00010	*	myo-inositol 2-dehydrogenase [EC:1.1.1.18]
K00024	*	malate dehydrogenase [EC:1.1.1.37]
K00170		pyruvate ferredoxin oxidoreductase, beta subunit [EC:1.2.7.1]
K00172		pyruvate ferredoxin oxidoreductase, gamma subunit [EC:1.2.7.1]
K00239	*	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [EC:1.3.99.1]
K00240	*	succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit [EC:1.3.99.1]
K00241	*	succinate dehydrogenase / fumarate reductase, cytochrome b subunit
K00626	*	acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2.3.1.9]
K00720		ceramide glucosyltransferase [EC:2.4.1.80]
K00860		cysC; adenylsulfate kinase [EC:2.7.1.25]
K00955		cysNC; bifunctional enzyme CysN/CysC [EC:2.7.7.4 2.7.1.25]
K01007	*	phosphoenolpyruvate carboxylase [EC:4.1.1.31]
K01595	*	fumarate hydratase, class I [EC:4.2.1.2]
K01902	*	succinyl-CoA synthetase beta subunit [EC:6.2.1.5]
K01903	*	Succinyl-CoA synthetase beta subunit [EC:6.2.1.5]
K01676	*	Fumarate hydratase Class I [EC:4.2.1.2]

La enzima representada por el K00376, que desempeña un papel relevante en el proceso de desnitrificación, fue encontrada en los siguientes órdenes bacterianos Rhodocyclales, Cytophagales, Burkholderiales, Rhizobiales y Flavobacteriales (Figura 4.2).

Capítulo 4

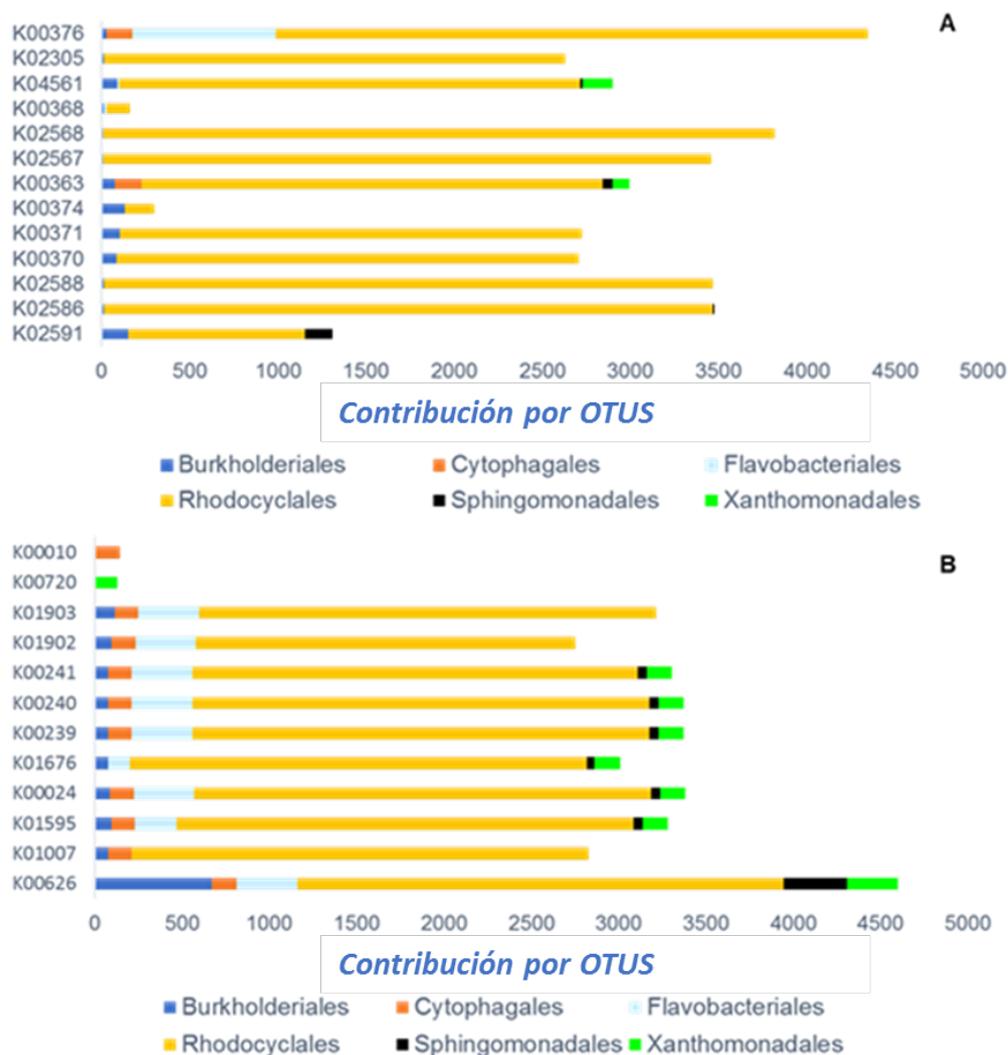


Figura 4.2: Representación de los genes más abundantes en términos de KO en los órdenes bacterianos más relevantes involucrados en el metabolismo de la eliminación de nitrógeno inorgánico (A) y el metabolismo de carbohidratos (B).

Los genes *Amo*, *Hao* y *Nap* se utilizan a menudo para detectar la capacidad de nitrificación de especies bacterianas NHDA (Lang y col, 2019).

Amo es un gen que codifica a AMO (amoniacó monooxigenasa), que es la primera enzima utilizada por los microorganismos para oxidar el nitrógeno amoniacal en hidroxilamina. *Hao* es el gen que codifica HAO (hidroxilamina oxidorreductasa), que juega un papel clave en la reacción de nitrificación. Se utiliza para oxidar hidroxilamina a nitrito. La enzima nitrato reductasa (NAP) puede reducir el nitrato a nitrito, que es esencial para la

Capítulo 4

transformación de nitratos en condiciones aeróbicas. A menudo se utiliza como marcador funcional para identificar desnitrificadores aeróbicos (Huang y col, 2015; Zhu y col, 2012).

Para probar la presencia de las secuencias de genes que codifican estas enzimas en las secuencias de ADN bacteriano, se puede utilizar técnicas como la amplificación por PCR de genes de enzimas potenciales como son: *amo*, *hao* y *napA* (Lang y col, 2019).

La enzima AMO que cataliza la oxidación de amoníaco a hidroxilamina correspondió a los siguientes KO: K10944, K10945 y K10946. Esta enzima también está involucrada en los siguientes ciclos: metabolismo de metano, de nitrógeno y de carbono. Las enzimas responsables de la oxidación de hidroxilamina a nitrito y finalmente nitrato también se detectaron, pero en menor proporción. La enzima representada por K10535 (hidroxilamina deshidrogenasa u oxidasa), por ejemplo, se detectó en el orden Nitrospirales y Nitrosomonadales. Cabe destacar que esta enzima, responsable de la oxidación de hidroxilamina a nitrito, ha sido encontrado en Nitrospirales entre otros órdenes (de Voogd y col, 2015). A través del análisis PICRUst también fue posible corroborar la existencia de enzimas responsables del transporte de nitrato (K002575).

La presencia de enzimas claves involucradas en la nitrificación, así como la detección de nitrito y fundamentalmente nitrato, permitió confirmar que este proceso tuvo lugar en el sistema.

Es necesario mencionar como se ha informado en el presente trabajo de tesis que PICRUst permite revelar las enzimas potenciales que podrían ser sintetizadas por la comunidad microbiana, pero no afirma que todas las halladas sean expresadas y por ende funcionales en los microorganismos. Sin embargo, nos permite confirmar la presencia y relevancia del proceso de nitrificación y desnitrificación en el sistema biológico estudiado.

Es importante destacar que, además de los KO relacionados con el proceso de nitrificación como K10944, K10945, K10946 y K10535, haya probablemente otros KO involucrados en la nitrificación-desnitrificación que no pudieron ser detectados. Esto es debido a que PICRUst es un software bioinformático que presenta una base de datos específica. Esto conlleva a que sólo se puede predecir un número limitado de genes funcionales, ya que cuando la secuencia de ARNr 16S no está presente en la base de datos, los programas de bioinformática utilizados no proporcionan información sobre las capacidades fisiológicas del organismo desconocido.

La enzima AMO correspondió probablemente a BOA autotróficas. En proteobacterias, AMO tiene tres subunidades, AMO-A, AMO-B y AMO-C, con diferentes

Capítulo 4

tamaños y estructuras. Las enzimas AMO de las bacterias nitrificantes y en particular la metano monooxigenasa (pMMO) de las bacterias metanotróficas son homólogas y comparten muchas características. Las estructuras de sus operones son casi idénticas (Bothe y col, 2000). En los microorganismos nitrificantes heterotróficos también se encontraron AMO. Sin embargo, esta enzima particularmente para *Paracoccus pantotrophus* GB17 consta de solo dos subunidades y tiene varias características en común con la familia de enzimas que incluye AMO y pMMO (Bothe y col, 2000).

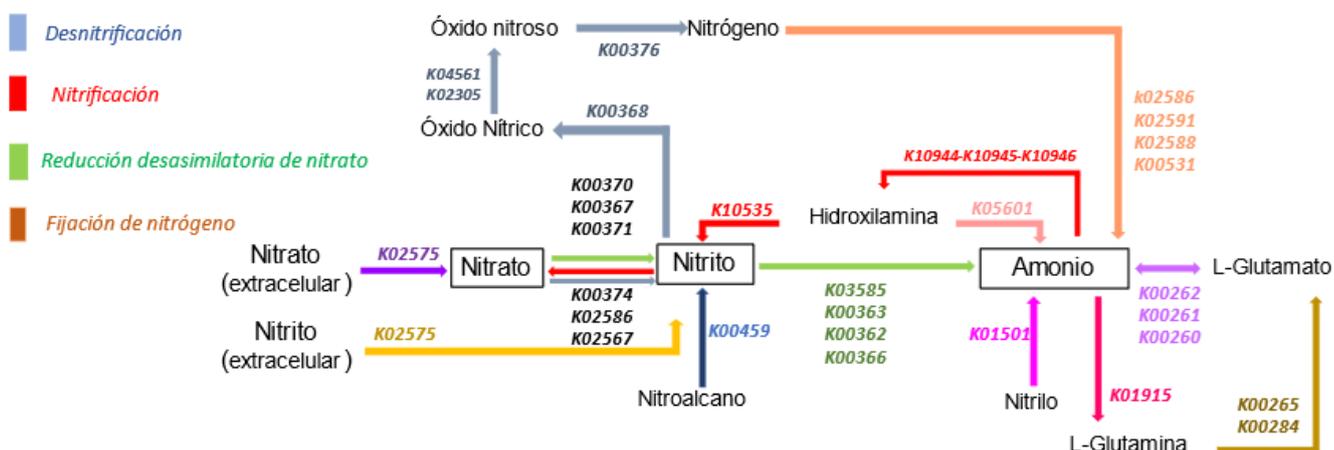
En relación con las enzimas relacionadas con el ciclo del carbono, la ceramida glucosyltransferasa (K00720) (enzima involucrada en el metabolismo de lípidos) fue aportada por el orden Xanthomonadales (Figura 4.2 B y Tabla 4.2). Respecto al flujo de carbono: las enzimas involucradas en la glucólisis / gluconeogénesis como la mioinositol 2-deshidrogenasa (K00010) se predijeron solamente para el orden Cytophagales. Asimismo, se detectaron enzimas para el ciclo hidroxipropionato-hidroxi-butirato y el ciclo Dicarboxilato-hidroxi-butirato (K00626) en los seis filotipos bacterianos presentes en SBR_{AC}. Cabe destacar que el K00626 también se encuentra involucrado en otros procesos como el metabolismo de lípidos, aminoácidos y proteínas. Las enzimas para el ciclo dicarboxilato-hidroxi-butirato fueron aportadas principalmente por el orden Rhodocyclales, seguido de los órdenes Flavobacteriales, Xanthomonadales y Cytophagales. Entre estas enzimas se encontraron la subunidad alfa y beta de succinil-CoA sintetasa (K01902, K01903) y fumarato hidratasa (K01595, K01676) las cuales también se encuentran involucradas en el ciclo del citrato (TCA) y en la biosíntesis de metabolitos secundarios, succinato deshidrogenasa (K00239, K00240 y K00241), cuya participación también involucra la acción en el ciclo TCA, en la biosíntesis de metabolitos secundarios y en la oxidación fosforilativa, la malato deshidrogenasa (K00024), cuya acción se ha hallado además del ciclo del TCA, en el metabolismo del piruvato, en la síntesis de aminoácidos y en el metabolismo descarboxilato, y fosfoenolpiruvato carboxilasa (K01007) que además de los procesos recientemente mencionados tiene una participación activa en la glucólisis. Esto se pudo observar en la Figura 4.2 B y Tabla 4.2.

4.7 PROCESOS TENTATIVOS DE ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

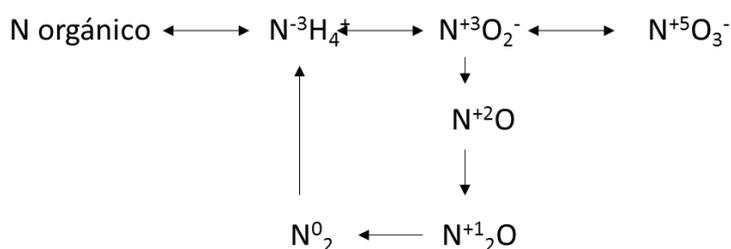
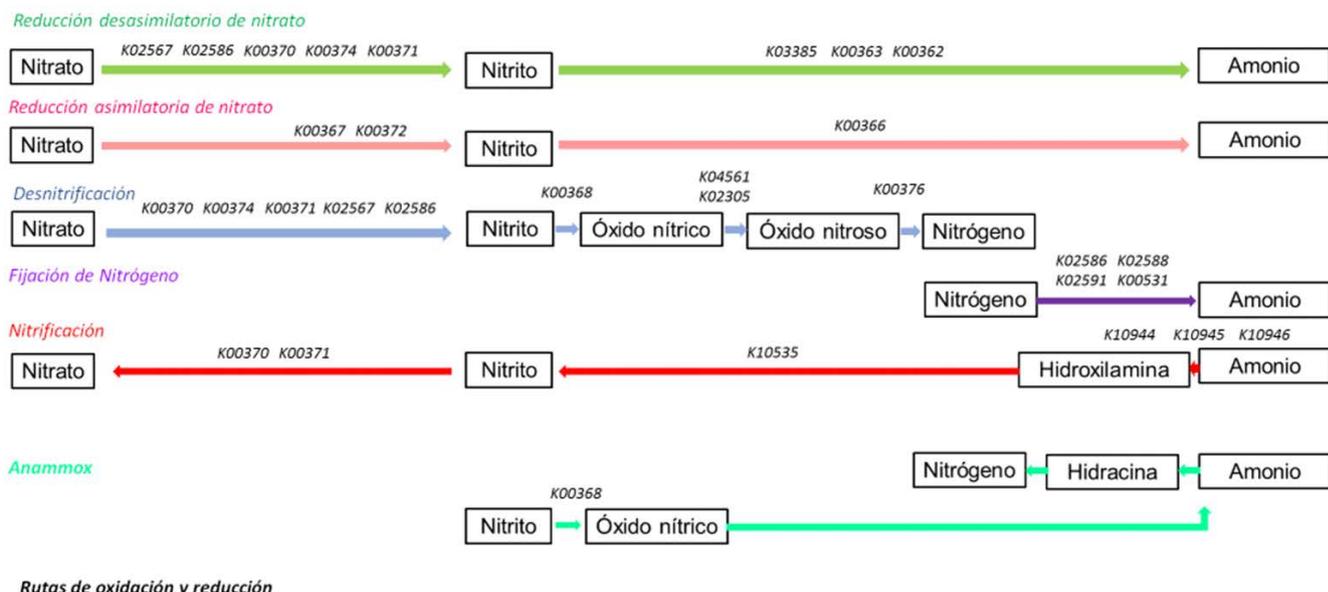
El modelo esquemático de genes funcionales implicados en el metabolismo del nitrógeno, predicho por PICRUSt, para el SBR_{AC} (condición NB) se presenta en la Figura 4.3. De acuerdo a esta Figura, los procesos probables relacionados con el metabolismo del

Capítulo 4

nitrógeno son los siguientes: nitrificación, fijación de nitrógeno, reducción desasimilatoria de nitrato y desnitrificación. Previamente fue demostrada una buena actividad nitrificante debido a la generación de elevadas concentraciones de nitrato (Sección 3.9.2). La fijación de nitrógeno se consideró poco relevante bajo las condiciones ambientales prevalentes, exceso de amoníaco, en el sistema. El proceso de reducción de nitrato podría tener lugar en el reactor aeróbico mediante la reducción desasimilatoria de nitrato hasta amonio (RDNA) y/o desnitrificación, aunque es bien conocido que estos procesos requieren generalmente condiciones anóxicas. Cabe destacar que en la ruta asimilatoria de nitrato, los KO fueron muy poco relevantes (Tabla 4.2) es por este motivo que no fueron considerados como proceso probable de reducción de nitrato.



Capítulo 4



Estados de oxidación

Figura 4.3 Modelo esquemático de los genes funcionales implicados en el metabolismo del nitrógeno codificados en el genoma de los microorganismos

Debe considerarse que la mayoría de los microorganismos desnitrificantes y algunas bacterias involucradas en la reducción desasimilatoria de nitrato hasta amonio son aeróbicas, pudiendo cambiar a un proceso de reducción de nitrito o nitrato bajo condiciones anóxicas; cabe destacar que muchas bacterias RDNA son anaerobias (Hardison y col, 2015). En presencia de nitrito/nitrato tiene lugar la competencia entre los desnitrificantes y las bacterias RDNA por los donadores de electrones y aceptores de electrones (NO_3^- -N y NO_2^- -N). Termodinámicamente, la desnitrificación produce más energía libre por electrón y RDNA produce más energía libre por molécula de nitrato ($\Delta G^\circ = -623$ KJ por mol de nitrato) que la desnitrificación completa hasta N_2 ($\Delta G^\circ = -556$ KJ por mol de nitrato) (Strohm y col, 2007). Por lo tanto, la desnitrificación ocurre comúnmente bajo condiciones limitantes del donador de electrones, es decir baja relación DQO: NO_3^- -N y

Capítulo 4

RDNA ocurre bajo condiciones limitantes de NO_3^- -N, es decir alta relación DQO: NO_3^- -N (Yoon y col, 2015 ; Chutivisut y col, 2018).

En el SBR_{AC} se determinó que la desnitrificación fue probablemente el proceso más relevante de reducción de nitrato por las siguientes razones:

a- El SBR fue operado a una baja relación DQO:N lo que condujo a niveles relativamente altos de nitrato por actividad nitrificante.

b- El acetato, fuente de carbono y energía, es un compuesto fácilmente biodegradable que fue utilizado principalmente para el crecimiento microbiano y la síntesis y almacenamiento de glucógeno y PHA.

c- La reducción de nitrato fue impulsada principalmente por las reservas de carbono intracelular.

Estos fenómenos condujeron a condiciones de nitrato no limitantes (baja relación DQO: NO_3^- -N), las cuales fueron favorables para las bacterias desnitrificantes. Finalmente, las altas concentraciones de oxígeno favorecieron el crecimiento de desnitrificantes aeróbicos, los cuales pueden llevar a cabo el proceso de desnitrificación en presencia de oxígeno.

Por otra parte, las condiciones operativas probablemente fueron responsables del enriquecimiento de bacterias nitrificantes heterótrofas. Se propone que el amoníaco fue removido por el proceso de nitrificación completo, que involucra la oxidación de amoníaco seguido de oxidación de nitrito hasta nitrato, llevado a cabo principalmente por heterótrofos, aunque se considera que es un proceso energéticamente desfavorable para estas bacterias (Stein, 2011). Cabe destacar que las bacterias autótrofas además pudieron contribuir al proceso de nitrificación.

Estudios previos han informado que el proceso de oxidación de NH_4^+ acoplado a la desnitrificación de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ por bacterias nitrificantes heterótrofas puede contribuir al mantenimiento del equilibrio redox celular mediante la oxidación del exceso de NADH bajo condiciones de hipoxia (Stein, 2011). Sin embargo, en el presente estudio probablemente no hubo bajos niveles de oxígeno dentro de los gránulos debido a las altas concentraciones de oxígeno en el licor de mezcla del biorreactor ($7.5 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$). La actividad nitrificante heterotrófica probablemente constituyó un mecanismo de detoxificación del amoníaco libre. Se propone que el proceso de desnitrificación pudo haber ocurrido a partir de nitrato, asumiendo como válidos los supuestos planteados en el capítulo 3, sección 3.10, particularmente el hecho de que el proceso de nitrificación parcial,

Capítulo 4

desde amonio hasta nitrito, seguido de desnitrificación, desde nitrito hasta N_2 , es favorecido a concentraciones de O_2 bajas ($< 1 \text{ mg } O_2 \cdot L^{-1}$). *Zoogloea* sp. (Rodocyclales) fue probablemente el principal microorganismo responsable del proceso de desnitrificación de nitrato (Figura 4.3).

En bibliografía se ha informado que hay una gran variedad de nitrificantes heterótrofos capaces de llevar a cabo la desnitrificación aeróbica a través del proceso de nitrificación heterótrofa y desnitrificación aerobia (NHDA) como *Diaphorobacter* sp. (Burkholderiales) y *Flavobacterium* sp. (Flavobacteriales), entre otros, los cuales fueron encontrados con alta abundancia en el SBR_{AC} (Figura. 4.1) Probablemente, estas bacterias NHDA contribuyeron al proceso de desnitrificación aeróbica del sistema

4.8 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En el presente capítulo se determinó que la nitrificación heterotrófica-desnitrificación aeróbica (NHDA) fue el principal proceso responsable de la eliminación biológica del nitrógeno mediante la detoxificación a partir del amonio. Esta conclusión pudo obtenerse a partir de una combinación de profundos estudios llevados a cabo en los diferentes ciclos estudiados. Estos estudios incluyeron un detallado y criterioso análisis bioinformático, utilizando la predicción por PYCRUst, asociado a los análisis de los principales aspectos ecológicos de la comunidad microbiana junto al profundo estudio bibliográfico realizado, así como el análisis de los diferentes balances de masa propuestos (capítulo 3).

El análisis de la comunidad microbiana a partir de la extracción de ADN y posterior secuenciación de NGS, posibilitaron el estudio de las enzimas determinadas por los KO de cada uno de los géneros y/o especies más abundantes y principales asociados a su ruta metabólica mediante la base de datos brindada por la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto. Estos estudios complementaron la interpretación de los resultados obtenidos por los balances de masa y junto al análisis de las variables ambientales (OD, relación $DQO:NO_3^-N$) permitieron sustentar y concluir que la remoción por medio de la desnitrificación aeróbica predominaba sobre el proceso de reducción desasimilatoria de nitrato hasta amonio (RDNA).

Cabe destacar que los ensayos realizados de forma cualitativa mediante test bioquímicos permitieron tener un resultado preliminar acerca de los posibles procesos biológicos, nitrificación y desnitrificación, que estaban ocurriendo en el SBR.

Capítulo 4

Entre los órdenes detectados, se ha encontrado gran abundancia de bacterias NHDA, entre las que se encuentran principalmente, *Diaphorobacter sp.* y *Flavobacterium sp.* Asimismo se han detectado especies potenciales con capacidad de desnitrificación aeróbica, como lo es *Zooglea sp.* Se sugiere que estos géneros fueron los principales responsables del proceso NHDA.

Los microorganismos nitrificantes autótrofos convencionales fueron hallados en menores abundancias relativas de lo que se esperaba según la bibliografía reportada hasta la fecha. Por lo tanto no fueron las principales especies destacadas en los procesos de remoción de nitrógeno. Esto demuestra la importancia de realizar un abordaje integral, de los procesos biológicos, basado en la aplicación de diferentes técnicas y herramientas metodológicas como análisis de compuestos químicos, cinética y balances de masa, análisis ecológico y bioinformático.

4.9 TABLAS SUPLEMENTARIAS SBR_{ACET}: CONDICIÓN NB

Se encuentran resaltados a continuación en color celeste los géneros, así como las diferentes categorías taxonómicas, más abundantes

Tabla S1. Abundancia relativa bacteriana a nivel de filios

FILO	SBR _{ACET}
<i>ascomycota</i>	0.0063
<i>bacteroidetes</i>	25.5839
<i>chloroflexi</i>	0.0511
<i>arthropoda</i>	0.0000
<i>actinobacteria</i>	0.5891
<i>verrucomicrobia</i>	1.9941
<i>fibrobacteres</i>	0.0010
<i>planctomycetes</i>	0.6497
<i>eukaryota</i>	0.0177
<i>cyanobacteria</i>	0.0029
<i>chlamydiae</i>	0.0976
<i>acidobacteria</i>	0.1145
<i>gemmatimonadetes</i>	0.0087
<i>firmicutes</i>	0.0547
<i>proteobacteria</i>	70.7874
<i>chlorobi</i>	0.0129
<i>nitrospirae</i>	0.0186
<i>deinococcus</i>	0.0099

Tabla S2. Abundancia relativa bacteriana a nivel de clase

CLASE	SBR _{ACET}
<i>oligoflexia</i>	3
<i>opitutae</i>	684
<i>chloroflexia</i>	8
<i>gemmatimonadetes</i>	16
<i>bacteroidia</i>	581
<i>acidobacteriia</i>	209
<i>clostridia</i>	15
<i>sphingobacteriia</i>	16217
<i>oscillatoriophycidae</i>	5
<i>deinococci</i>	18
<i>deltaproteobacteria</i>	1575

betaproteobacteria	111091
<i>thermomicrobia</i>	83
<i>fibrobacteria</i>	2
<i>bacteroidetes</i>	31
<i>chlamydia</i>	170
<i>planctomycetia</i>	1176
<i>actinobacteria</i>	1081
<i>verrucomicrobiae</i>	2931
<i>chlorobia</i>	24
gammaproteobacteria	8626
<i>nitrospira</i>	33
<i>caldilineae</i>	3
<i>bacilli</i>	82
alphaproteobacteria	8638
<i>cytophagia</i>	10318
flavobacteriia	18920

Tabla S3. Abundancia relativa bacteriana a nivel de orden

ORDEN	SBR _{ACET}	ORDEN	SBR _{ACET}
<i>clostridiales</i>	15	<i>bdellovibrionales</i>	1224
<i>planctomycetales</i>	1155	<i>caldilineales</i>	3
<i>chattonellales</i>	23	<i>burkholderiales</i>	10262
<i>bacteroidales</i>	581	<i>bacillales</i>	66
<i>hydrogenophilales</i>	14	<i>acidobacteriales</i>	209
<i>aeromonadales</i>	13	<i>eurotiales</i>	11
<i>verrucomicrobiales</i>	2931	<i>longamoebia</i>	9
<i>cytophagales</i>	10318	<i>sphingomonadales</i>	1693
<i>opitutales</i>	684	<i>candidatus brocadiales</i>	21
<i>oscillatoriales</i>	5	<i>deinococcales</i>	18
<i>chloroflexales</i>	8	<i>rhodobacterales</i>	3331
<i>thermomicrobiales</i>	83	<i>holosporales</i>	52
<i>actinomycetales</i>	1065	<i>rhodospirillales</i>	146
<i>flavobacteriales</i>	18920	<i>solirubrobacterales</i>	7
<i>sphingobacteriales</i>	16217	<i>oligoflexales</i>	3
<i>nitrosomonadales</i>	402	<i>neisseriales</i>	13
<i>alphaproteobacteria</i>	1	<i>thiotrichales</i>	1

Capítulo 4

<i>fibrobacterales</i>	2	<i>gemmatimonadales</i>	16
<i>chromatiales</i>	720	<i>pseudomonadales</i>	319
<i>chlamydiales</i>	170	<i>chlorobiales</i>	24
<i>myxococcales</i>	314	<i>caulobacterales</i>	867
<i>desulfuromonadales</i>	37	<i>xanthomonadales</i>	7262
<i>alteromonadales</i>	33	<i>rhodocyclales</i>	100400
<i>rhizobiales</i>	1773	<i>acidimicrobiales</i>	9
<i>bacteroidetes order ii. incertae sedis</i>	31	<i>nitrospirales</i>	33
<i>lactobacillales</i>	16	<i>rickettsiales</i>	775
<i>legionellales</i>	278		

Tabla S4. Abundancia relativa bacteriana a nivel de género

GÉNERO	SBR _{ACET}	GÉNERO	SBR _{ACET}	GÉNERO	SBR _{ACET}
<i>prostheco bacter</i>	2818	<i>filimonas</i>	2	<i>fibrobacter</i>	2
<i>aciditerrimonas</i>	5	<i>marinobacter</i>	33	<i>cytophaga</i>	21
<i>ohtaekwangia</i>	23	<i>hymenobacter</i>	9	<i>chlorobium</i>	24
<i>caldilinea</i>	3	<i>dokdonella</i>	345	<i>rhizobium</i>	148
<i>citricella</i>	96	<i>nitrospira</i>	33	<i>candidatus nucleicultrix</i>	52
<i>derxia</i>	14	<i>adhaeribacter</i>	10	<i>gordonia</i>	4
<i>salinirepens</i>	3	<i>geobacter</i>	33	<i>verrucomicrobiu m</i>	36
<i>lechevalieria</i>	4	<i>nitrosomonas</i>	339	<i>defluviicoccus</i>	4
<i>gemmata</i>	51	<i>planctomyces</i>	135	<i>novosphingobium</i>	24
<i>sporocytophaga</i>	4	<i>aquisphaera</i>	250	<i>candidatus kuenenia</i>	21
<i>flaviumibacter</i>	142	<i>pirellula</i>	9	<i>nakamurella</i>	24
<i>haliscomenobacter</i>	181	<i>proteinclasticum</i>	4	<i>heterosigma</i>	23
<i>pseudonocardia</i>	357	<i>phaeobacter</i>	2	<i>vitellibacter</i>	146
<i>pseudolabrys</i>	71	<i>acidisphaera</i>	5	<i>flavisolibacter</i>	33
<i>silanimonas</i>	5	<i>flavitalea</i>	52	<i>owenweeksia</i>	38
<i>reyranella</i>	7	<i>rhodobacter</i>	716	<i>desulfuromusa</i>	4
<i>byssovorax</i>	275	<i>aquibacter</i>	13	<i>paracoccus</i>	13
<i>aquicola</i>	88	<i>singulisphaera</i>	353	<i>bradyrhizobium</i>	48
<i>sphingobacterium</i>	2952	<i>rhodocyclus</i>	6	<i>zoogloea</i>	78641
<i>luteolibacter</i>	77	<i>labilithrix</i>	19	<i>cellulosimicrobiu</i>	44

Capítulo 4

<i>cystobacter</i>	5	<i>deinococcus</i>	18	<i>curvibacter</i>	78
<i>tsukamurella</i>	1	<i>leadbetterella</i>	4	<i>diaphorobacter</i>	7782
<i>amaricoccus</i>	2	<i>peredibacter</i>	3	<i>epilithonimonas</i>	3
<i>janthinobacterium</i>	5	<i>luteimonas</i>	787	<i>caedibacter</i>	759
<i>ralstonia</i>	1	<i>chondromyces</i>	12	<i>acinetobacter</i>	109
<i>sphingopyxis</i>	1225	<i>chloroflexus</i>	8	<i>comamonas</i>	1
<i>conexibacter</i>	7	<i>rhodoferax</i>	19	<i>niastella</i>	40
<i>opitutus</i>	684	<i>ilumatobacter</i>	4	<i>xylophilus</i>	217
<i>thiobacillus</i>	14	<i>leucobacter</i>	21	<i>carnobacterium</i>	1
<i>gemmobacter</i>	117	<i>lactococcus</i>	11	<i>methylibium</i>	26
<i>pseudorhodofera</i> x	99	<i>mucilaginibacter</i>	15	<i>erythrobacter</i>	31
<i>flavobacterium</i>	3557	<i>sphingomonas</i>	277	<i>roseomonas</i>	123
<i>winogradskyella</i>	14	<i>rhodoplanes</i>	2	<i>cyanothece</i>	5
<i>hyphomicrobium</i>	81	<i>lysobacter</i>	2959	<i>solitalea</i>	68
<i>terrimonas</i>	203	<i>variovorax</i>	11	<i>legionella</i>	278
<i>aquimonas</i>	171	<i>bdellovibrio</i>	1221	<i>thauera</i>	6943
<i>cloacibacterium</i>	5	<i>pseudomonas</i>	210	<i>leuconostoc</i>	3
<i>fluviicola</i>	1857	<i>bacteroides</i>	581	<i>candidatus</i> <i>aquirestis</i>	5
<i>thermomonas</i>	45	<i>phenylobacterium</i>	1	<i>leptothrix</i>	2
<i>aspergillus</i>	11	<i>devosia</i>	80	<i>streptococcus</i>	1
<i>sphingobium</i>	17	<i>pseudoxanthomonas</i>	2661	<i>demequina</i>	2
<i>thiothrix</i>	1	<i>microbacterium</i>	351	<i>mariniflexile</i>	11536
<i>xanthomonas</i>	78	<i>brevundimonas</i>	150	<i>shinella</i>	83
<i>rickettsia</i>	16	<i>methylosinus</i>	1	<i>kaistobacter</i>	4
<i>lacibacter</i>	133	<i>kaistia</i>	1	<i>tepidimonas</i>	1
<i>gelidibacter</i>	18	<i>hydrogenophaga</i>	703	<i>thermomicrobium</i>	83
<i>woodsholea</i>	714	<i>burkholderia</i>	8	<i>formosa</i>	13
<i>nitrosovibrio</i>	8	<i>ideonella</i>	7	<i>mesorhizobium</i>	371
<i>acidovorax</i>	883	<i>sphingosinicella</i>	115	<i>dyadobacter</i>	3258
<i>chryseobacterium</i>	14	<i>rhodovastum</i>	3	<i>candidatus</i> <i>metachlamydia</i>	170
<i>fusibacter</i>	11	<i>emticicia</i>	660	<i>nitrosospira</i>	55
<i>xenophilus</i>	1	<i>acetobacter</i>	1	<i>saccharibacter</i>	3
<i>bartonella</i>	3	<i>isosphaera</i>	357	<i>steroidobacter</i>	98
<i>oligoflexus</i>	3	<i>methylocystis</i>	146	<i>arenimonas</i>	28
<i>spirosoma</i>	509	<i>nordella</i>	3	<i>simplicispira</i>	316

Capítulo 4

<i>gemmatimonas</i>	16	<i>rhodothermus</i>	31	<i>niabella</i>	1665
<i>aeromicrobium</i>	1	<i>stenotrophomonas</i>	6	<i>bosea</i>	207
		<i>s</i>			
<i>vitreoscilla</i>	13	<i>rhodanobacter</i>	79	<i>phyllobacterium</i>	273
<i>acanthamoeba</i>	9	<i>flexibacter</i>	5820	<i>rhodococcus</i>	25
<i>sulfuritalea</i>	7	<i>cellulomonas</i>	2	<i>pedobacter</i>	29
<i>dechloromonas</i>	14803	<i>candidatus</i>	1	<i>caulobacter</i>	2
		<i>alysiosphaera</i>			
<i>nitrobacter</i>	255	<i>acidobacterium</i>	209	<i>arthrobacter</i>	228
<i>aeromonas</i>	13	<i>tetracoccus</i>	1861	<i>paenibacillus</i>	66
<i>pararhodobacter</i>	524	<i>chitinophaga</i>	858	<i>anaeromyxobacte</i>	3
				<i>r</i>	
<i>nitrosococcus</i>	720	<i>lewinella</i>	9839	<i>crocinitomix</i>	1703
				<i>tessaracoccus</i>	1

CAPÍTULO 5

TRATAMIENTO DE EFLUENTES LÁCTEOS EN SBR GRANULAR AERÓBICO

Capítulo 5

CAPÍTULO 5. TRATAMIENTO DE EFLUENTES LÁCTEOS EN SBR GRANULAR AERÓBICO

5.1. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

Objetivo general:

Evaluar la factibilidad de lograr el tratamiento de aguas residuales lácteas (suero de queso) suplementadas con amoníaco utilizando un reactor discontinuo secuencial, con biomasa granular aeróbica, operado bajo régimen “feast/famine”.

Los objetivos de este capítulo estuvieron centrados en los siguientes criterios

Objetivos específicos:

- Optimización de los procesos de remoción de nitrógeno y carbono orgánico de un efluente modelo lácteo a partir de la evaluación del efecto de las variables operativas posteriormente descriptas.
- Evaluar el efecto de la carga orgánica, la relación DQO / N y micronutrientes en la capacidad de nitrificación y desnitrificación de los SBR alimentados con efluentes sintéticos de la industria láctea.
- Analizar la capacidad de acumulación de reservas de carbono intracelulares (glucógeno) y su uso como fuente de carbono para la desnitrificación, en los SBRs que exhibieron nitrificación.
- Análisis de la composición de los consorcios microbianos mediante secuenciación por ILLUMINA y la utilización de técnicas bioinformáticas del sistema en estudio.
- Relación de la composición microbiana del SBR, determinada por tecnología NGS, con los procesos biológicos detectados para cada condición operativa.

5.2 CARACTERIZACIÓN GENERAL DE EFLUENTES LÁCTEOS

Los efluentes del procesamiento de la leche tienen una temperatura aumentada y grandes variaciones en el pH, ST, DBO, DQO, nitrógeno total (NT), fósforo total (PT) y aceite y grasa (FOG, fat, oil and grease) (Slavov, 2017). Existe poca información sobre la composición de efluentes lácteos a escala industrial (Britz y col, 2006). Típicamente las aguas residuales lácteas son de color blanco y tienen un olor desagradable y un carácter turbio (Quasim y Mane, 2013). Los efluentes lácteos se caracterizan por una alcalinidad muy baja, aproximadamente 2.5 g.L^{-1} expresada como CaCO_3 en el permeado de leche, lo que genera un potencial de acidificación rápida y mayores costos de reactivos para el mantenimiento del pH durante la purificación (Slavov, 2017). Debido a su alto contenido orgánico, las aguas residuales lácteas se caracterizan por altos valores de DBO y DQO que varían entre 60 y 80 g.L^{-1} (Slavov, 2017). Alrededor del 90% de la carga de DBO y DQO es causada por la lactosa, mientras que la fracción restante corresponde a las proteínas del suero.

Cada efluente lácteo tiene notablemente diferentes concentraciones de NT y PT (Karadag y col, 2014). El nitrógeno existe principalmente en forma de grupos amino a partir de proteínas de la leche. También se detectan otros compuestos nitrogenados: urea, ácido úrico e iones NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- (Slavov, 2017). También se pueden encontrar pequeñas cantidades de sales de nitrógeno y amonio procedentes de compresores de amoníaco (Slavov, 2017). Los compuestos de fósforo son principalmente inorgánicos, fosfato (PO_4^{3-}) y difosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$); pero también pueden estar presentes en forma orgánica (Demirel y col, 2005).

El principal contaminante en las aguas residuales de procesamiento de leche es el suero debido a su alta carga orgánica y volumétrica. Sintéticamente, el suero de leche es la fracción líquida obtenida durante la coagulación de la leche en el proceso de fabricación del queso y de la caseína, después de la separación del coágulo o fase micelar (entre el proceso de mezclado y reposo) (Figura 5.1). La coagulación se obtiene mediante la acción de, principalmente, enzimas del tipo del cuajo. En el caso del suero ácido, la coagulación se produce, principalmente, por acidificación (CODEX STAN 289-1995). El suero en polvo es un producto lácteo obtenido por medio del secado del suero o del suero ácido.

Capítulo 5

Sus características corresponden a un líquido de color amarillo verdoso, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido con un promedio de pH que rara vez supera el valor de 5 (Slavov, 2017). El volumen del suero de queso depende de la productividad del queso y del tipo de leche procesada: bovina, caprina, ovina, etc. (Venetsaneas y col, 2009).

Es un subproducto rico en proteínas globulares hidrosolubles, lactosa, grasas y minerales. Debido a ello es una de las principales fuentes de contaminación ambiental, de ahí proviene la importancia de su valorización. La formación de depósitos de proteínas y grasas en el interior de las tuberías requiere una limpieza periódica apropiada con preparaciones químicas o bacterianas, como por ejemplo proteasas, bacterias lácticas entre otras. La principal ventaja en la aplicación de tales bacterias es que continúan actuando en las siguientes etapas del tratamiento de aguas residuales, aumentando el efecto de purificación (Camarota y Freire, 2006).

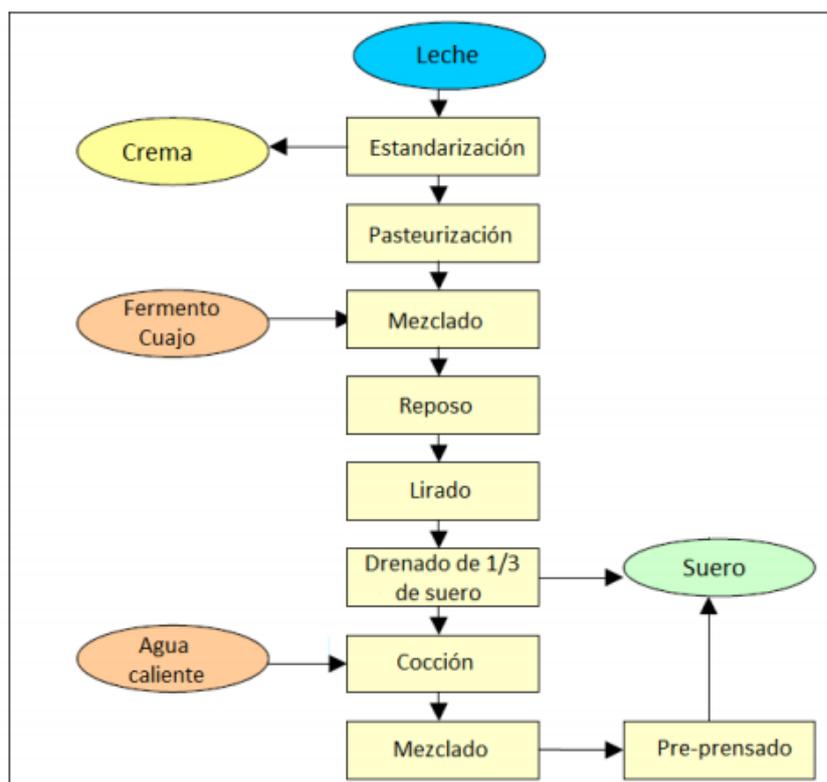


Figura 5.1: Flujo de operación para obtención del suero de queso
(De Araujo, Florencia y Cozzi, Facundo Martin, 2016)

Capítulo 5

Se ha adoptado la DQO como parámetro de medición del carbono orgánico pudiendo identificar fracciones de DQO con diferentes características de biodegradación (Ekama y Dold, 1986).

5.3 TRATAMIENTO AERÓBICO DE EFLUENTES LÁCTEOS

Los procesos aeróbicos permiten lograr una excelente calidad del efluente en términos de eliminación de DQO, DBO y nutrientes. Entre los procesos aeróbicos, el SBR parece ser la tecnología más prometedora para el tratamiento de aguas residuales de la industria láctea (Kushwaha y col, 2011), sin embargo, en este tipo de efluentes los procesos biológicos pueden ser afectados por limitaciones en la transferencia de oxígeno así como por problemas de sedimentación de lodos. Cabe destacar que las altas concentraciones de DBO y DQO de los efluentes lácteos conducen a una elevada tasa de consumo de oxígeno, lo cual reduce drásticamente la disponibilidad del mismo limitando en consecuencia los procesos de oxidación biológica. Además, debe considerarse que las aguas residuales de suero de queso tienen una relación DQO: N:P media de 100:1.75:0.5, que se ha considerado deficiente en nitrógeno para el tratamiento de efluentes por procesos biológicos (Prazeres y col, 2012), siendo la relación óptima de DQO:N:P de 100:5:1 aceptada para procesos aeróbicos basados en el crecimiento heterotrófico. Para superar las dificultades mencionadas, la dilución de las aguas residuales de la industria láctea con efluentes ricos en amonio podría implementarse en sistemas de tratamiento aeróbico (Fux y col, 2002).

El tratamiento conjunto de las aguas residuales de la industria láctea con efluentes ricos en amonio permitiría ajustar la deficiente relación DQO:N que tienen los efluentes lácteos, a una relación de 100:5 o incluso menor, 100:10 o 100:15, permitiendo tratar mayores volúmenes de efluentes con elevadas concentraciones de amonio. Esta estrategia evitaría los costos causados por la adición de carbono o nitrógeno, estrictamente necesarios si cada tipo de efluente se querría tratar individualmente por métodos biológicos al no tener las concentraciones óptimas estas fuentes requeridas para el tratamiento adecuado.

5.4. MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1 Efluente sintético basado en suero de queso (SQ) suplementado con amonio

Para la elaboración del efluente modelo de la industria láctea se utilizó el suero de queso en polvo marca LACTOFOOD (Food S.A., Buenos Aires), cuyos componentes se describen en la Tabla 5.1.

En el suero de queso utilizado, las proteínas representaron $< 12\%$ (m.m^{-1}) de acuerdo al análisis informado por Food S.A (Tabla 5.1). El contenido en proteína es de 6.38 multiplicado por el Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK) (CODEX STAN 289-1995). Asumiendo que el suero de queso presenta un contenido proteico de aproximadamente 10.0% (m.m^{-1}), de acuerdo a dicha norma internacional, el NTK representó 1.57% (m.m^{-1}). Este valor es equivalente a $15.67 \text{ mg NTK. (g SQ)}^{-1}$ resultando una relación DQO: NTK= 100:1.567. Esto conlleva a observar que esta relación indica un exceso de DQO, o deficiencia en nitrógeno, para el tratamiento biológico. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis, el suero de queso fue suplementado con nitrógeno amoniacal para satisfacer los requerimientos nutricionales de los microorganismos heterótrofos.

Para corroborar el contenido de nitrógeno del suero de queso utilizado en la tesis, el NTK fue determinado por el método de microKjeldahl (Capítulo 2, sección 2.6.6).

En el efluente líquido resultante, el carbono orgánico proveniente del suero de queso puede encontrarse en forma soluble ($<0,45 \mu\text{m}$) (SQS) o bien de forma particulada (SQP). El contenido de nitrógeno en el agua residual también comprende una parte soluble, compuesta por amonio y por la fracción soluble del nitrógeno orgánico proveniente del suero (aminoácidos y proteínas), y el nitrógeno particulado de naturaleza orgánica aportado también por el suero.

Capítulo 5

Tabla 5.1: Características del SQ LACTOFOOD utilizado en el efluente modelo
(cumplimiento según CODEX STAN 289-1995)

CARACTERÍSTICAS	LÍMITES PERMITIDOS	LACTOFOOD
ASPECTO	Polvo fino, blanco amarillento, aroma agradable	Cumple
PH	6.5 + 1 en sol. 10%	6.7
ACIDEZ	Expresada en ácido láctico no superior a 0.20 %.	6.3
SOLUBILIDAD	En agua destilada a 40 °C min. 98%.	Cumple
HUMEDAD AL EMBOLSE	máx. 5.0%	3.9 %
LÍPIDOS TOTALES	máx. 3.0%	2.7 %
PRÓTIDOS TOTALES	máx. 12.0%	Cumple
LACTOSAS LIBRE	máx. 20.0%	7.1 %
CENIZAS (500 - 550 °C)	máx. 5.0%	1.8 %
LACTOSA HIDROLIZADA MODIFICADA		73.1 %
<u>RECUENTOS DE:</u>		
BACTERIAS MESÓFILAS AERÓBIAS	máx. 100 ufc/dgr	< 30
BACTERIAS COLIFORMES	máx. 1 ufc/dgr	< 1
LEVADURAS	max. 5 ufc/dgr	< 1
HONGOS	max. 5 ufc/dgr	< 1
COLIFORMES A 45° C	Negativo en 1 gr	Negativo
STAPHYLOCOCCUS COAGULASA POSITIVO	Negativo en 3 gr	Negativo
SALMONELLA	Negativo en 25 gr	Negativo

Capítulo 5

5.4.2 Composición del efluente y condiciones de operación del SBR

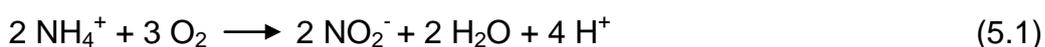
En el SBR alimentado con efluente basado en suero de queso (SBR_{SQ}) se evaluaron 6 condiciones experimentales detalladas en la Tabla 5.2, definidas principalmente por la carga volumétrica de DQO y de nitrógeno (inorgánico, orgánico y NTK) y la ausencia/presencia de micronutrientes. Las soluciones de micronutrientes utilizadas (M1 y M2) fueron descritas en Sección 2.2.

Cabe destacar que la nomenclatura utilizada para cada condición estudiada se llevó a cabo considerando la presencia (M) o ausencia de micronutrientes (SM), la carga orgánica, baja (CB), media (CM) o alta (CA), el cambio de la carga volumétrica de nitrógeno fácilmente asimilable (Nitrógeno inorgánico) por una más baja (NB) y el tiempo de residencia celular representado como subíndice, correspondiente a 20 o 10 días.

En todas las condiciones experimentales, el SBR se alimentó con agua residual sintética modelo de la industria láctea, que corresponde a una versión modificada de Chen y col. (2015), que fue suplementada con amonio. La misma estuvo compuesta por: suero de queso (marca LACTOFOOD) como fuente de carbono y energía para heterótrofos, sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) como fuente de nitrógeno para heterótrofos y autótrofos, fosfato dipotásico (K₂HPO₄) y fosfato monopotásico (KH₂PO₄) como fuente de fósforo y buffer fosfato y NaHCO₃ para mantener el pH estable entre 7.0 y 8.0 (Tabla 5.3). Cabe destacar que el suero de queso aporta nitrógeno orgánico que puede ser utilizado tanto por autótrofos como por heterótrofos.

Es ampliamente aceptado que las bacterias nitrificantes crecen adecuadamente bajo condiciones de pH entre 7.0 y 8.0 (Ciudad y col, 2006). Por debajo de las condiciones de neutralidad, el metabolismo de estos microorganismos disminuye significativamente.

Un problema a tener en cuenta en los reactores aeróbicos con actividad nitrificante es la disminución del pH a valores inferiores a 6.0. Este fenómeno es causado por el proceso de nitrificación, que implica la producción de protones que aportan acidez al medio:



Capítulo 5

Tabla 5 2: Cargas volumétricas diarias de nitrógeno, fósforo y DQO (suero de queso) en el SBR_{SQ}

Efluente sintético SQ	Condición (SMCM₂₀)	Condición (MCM₂₀)	Condición (SMCB₂₀)	Condición (MCM₁₀)	Condición (MCA₂₀)	Condición (MCANB₂₀)
Carga volumétrica de nitrógeno inorgánico mg NH ₃ -N.(L.día) ⁻¹	71.5	71.5	71.5	71.5	71.5	61.5
Carga volumétrica de fósforo inorgánico mg PO ₄ ³⁻ -P.(L.día) ⁻¹	35.83	35.8	35.8	35.8	35.8	35.8
Carga volumétrica de DQO mg DQO.(L.día) ⁻¹	716.8	716.8	358.4	716.8	1075.2	1075.2
Carga volumétrica de NTK mg NTK.(L.día) ⁻¹	83.5	83.5	77.5	83.5	88.7	78.7
Carga volumétrica de nitrógeno orgánico (Norg) mg Norg.(L.día) ⁻¹	12.0	12.0	6.0	12.0	17.2	17.2
DQO:NTK:P	100:11.6:5	100:11.6:5	100: 21.6:10	100:11.6:5	100:8.2:3.3	100:7.3:3.3
Micronutrientes (M ₁ y M ₂)	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Presencia	Presencia
TRC (días)	20	20	20	10	20	20

Por esta razón en este estudio se usó agua residual que contenía un buffer fosfato (3.3 mM) y una concentración óptima de bicarbonato de sodio (0.375 g L⁻¹) para mantener condiciones de pH adecuadas en todas las condiciones estudiadas en este sistema.

Capítulo 5

Tabla 5.3: Composición de los efluentes sintéticos modelo de la industria láctea suplementados con amonio utilizados en las diferentes condiciones experimentales

Efluente sintético	Condición SMCM₂₀ (gr.L⁻¹)	Condición MCM₂₀ (gr.L⁻¹)	Condición SMCB₂₀ (gr.L⁻¹)	Condición MCM₁₀ (gr.L⁻¹)	Condición MCA₂₀ (gr.L⁻¹)	Condición MCANB₂₀ (gr.L⁻¹)
Suero de queso	1.024	1.024	0.512	1.024	1.536	1.536
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.481	0.481	0.481	0.481	0.481	0.313
KH ₂ PO ₄	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139
K ₂ HPO ₄	0.109	0.109	0.109	0.109	0.109	0.109
NaHCO ₃	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375
Solución M ₁	----	1 mL	----	1 mL	1 mL	1 mL
Solución M ₂	----	1 mL	----	1 mL	1 mL	1 mL

5.4.3 Cultivos microbianos: proceso de aclimatación y granulación

El SBR_{SQ} se operó inicialmente bajo la condición experimental SMCM₂₀. El reactor fue inoculado con un consorcio microbiano aerobio (lodos activados, 0.2 L), y se agregó el agua de residual sintética (0.8 L), descrita en la Tabla 5.3 (condición SMCM₂₀), para alcanzar el volumen final de trabajo de 1 L. El SBR_{SQ} fue operado manualmente a temperatura ambiente. La granulación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.4. De la misma forma que para el SBR_{ACET}, con acetato como fuente de carbono y energía (capítulo 3), se redujo el tiempo de sedimentación desde 20 hasta 5 minutos, resultando este último un tiempo óptimo para la obtención de un efluente clarificado para las diferentes condiciones estudiadas.

Los lodos fueron aclimatados en el SBR_{SQ} a la condición experimental SMCM₂₀. La biomasa granular generada en el reactor, bajo condiciones operativas estables, fue utilizada como inóculo de las restantes condiciones experimentales (Condición MCM₂₀ y SMCB₂₀, Tabla 5.2).

El tiempo de residencia celular (TRC) para todas las condiciones experimentales, excepto condición MCM₁₀, fue de 20 días (Tabla 5.2). El tiempo de residencia hidráulico (TRH) utilizado correspondió a 2.79 días.

Capítulo 5

El período de aclimatación y período de estabilidad fueron determinados siguiendo los criterios expuestos para el SBR_{ACET} alimentado con acetato (Sección 3.7.3). La aclimatación se logró una vez alcanzada una completa remoción de carbono orgánico y un buen índice de sedimentabilidad (ISV) de la biomasa. El establecimiento de velocidades constantes de consumo de carbono orgánico y amonio, así como un tamaño granular medio e ISV constantes determinaron la estabilidad del reactor para cada condición experimental estudiada.

El pH del reactor estuvo controlado en un rango entre 7.0 y 8.0 debido a la presencia de bicarbonato de sodio y buffer fosfato en la composición del efluente sintético. Cabe destacar que este rango de pH es el que se considera óptimo para el crecimiento de microorganismos nitrificantes (Cheng y col, 2006).

El SBR_{SQ} , para las diferentes condiciones experimentales, fue operado bajo régimen “feast/famine” y ciclos repetitivos de 24 hs con las siguientes fases: adición del efluente sintético (2 minutos), fase de reacción aeróbica (1428 min), purga de lodos (1 minuto), fase de sedimentación (5 minutos) y extracción del sobrenadante (2 minutos).

5.4.4 Cuantificación de la eficiencia de la eliminación del nitrógeno amoniacal, nitrógeno inorgánico y nitrógeno total Kjeldahl

La eficiencia de remoción de nitrógeno amoniacal (% NH_3-N_R) y eficiencia de remoción de nitrógeno inorgánico (% Ni_R) se determinaron aplicando las ecuaciones 2.9 y 2.10 presentadas en la sección 2.7.

La remoción de Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK_R) se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\%NTK_R = \left(\frac{NTK_O - NTK_F}{NTK_O} \right) 100 \quad (5.2)$$

Donde NTK_O es la concentración de NTK al comienzo del ciclo operativo del SBR_{SQ} dada por la suma de la concentración de nitrógeno amoniacal y el nitrógeno orgánico (N_{ORG}) aportado por el suero de queso.

Capítulo 5

Cabe señalar que el N_{ORG} puede encontrarse en forma de partículas, como N orgánico particulado, lo cual dificulta que sea separado de la biomasa para una adecuada cuantificación mediante el método microKjeldahl. Por lo tanto, al comienzo del ciclo, N_{ORG} se estimó indirectamente a partir del análisis NTK del suero de queso (NTK_{SQ}). Por último, NTK_{F} hace referencia al NTK final luego de la sedimentación, donde se incluye el nitrógeno amoniacal, N_{ORG} (soluble y particulado) aportado por el suero de queso, el N_{ORG} aportado por la biomasa y los productos de lisis.

5.4.5 Parámetros cinéticos

Se determinaron las velocidades volumétricas y específicas de consumo de DQO_5 y $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y las velocidades volumétricas de producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ y $\text{NO}_2^-\text{-N}$ a partir de la metodología explicada en la sección 2.8. Asimismo, se estudiaron otros parámetros cinéticos tales como la velocidad de consumo de oxígeno asociada a la oxidación de la fracción soluble del suero de queso (SQS, suero de queso soluble) y la fracción particulada (SQP, suero de queso particulado) así como la velocidad de consumo de nitrógeno orgánico particulado (aportado por el SQP), como se explica en las siguientes secciones.

5.4.6 Ensayos de respirometría: determinación de la velocidad de oxidación del suero de queso particulado y suero de queso soluble

Se llevaron a cabo ensayos respirométricos para estimar la velocidad de oxidación del suero de queso particulado y soluble. Para el desarrollo de este estudio se utilizó el respirómetro descrito en la sección 2.9. Los ensayos respirométricos fueron realizados con muestras de licor de mezcla correspondiente a las condiciones operativas MCM_{20} y SMCB_{20} . Cabe destacar que en este estudio el SBR_{SQ} se encontraba en condiciones de funcionamiento estable en base al tamaño granular, ISV y velocidades constantes de remoción de carbono orgánico y nitrógeno. Las muestras del licor de mezcla, tomadas al final del ciclo de operación es decir luego de 24 hs de reacción, fueron sometidas a un pretratamiento y luego fueron colocadas en el respirómetro como se explica a continuación. Inicialmente se tomó un volumen de 90 mL de licor de mezcla del SBR_{SQ} .

Capítulo 5

La muestra fue centrifugada a 10.000 R.P.M durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua corriente. Este proceso de lavado se realizó dos veces. Posteriormente se realizaron los siguientes ensayos, los cuales se llevaron a cabo por duplicado.

A- Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) heterotrófica (OUR_H) para el suero de queso particulado (SQP)

Se añadió 15 mL del efluente sintético detallado en la Tabla 5.3 de la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀ a un vaso de precipitado de 50 mL que contenía 25 mL del licor de mezcla previamente lavado. Posteriormente la mezcla fue agitada durante 1 minuto y luego centrifugada a 3000 R.P.M durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó y se resuspendió el pellet en agua corriente. Este proceso de lavado se realizó dos veces con el fin de eliminar la fracción soluble del suero de queso (< 0.45 µm). Luego, la biomasa lavada junto con la fracción de SQP se suplementó con una solución compuesta por amoníaco, fósforo y micronutrientes. La mezcla (40 mL) se colocó en el respirómetro, se agitó durante 1 minuto a 200 R.P.M; luego se añadió 1 mL de alitiourea (Sigma Aldrich, 116.18 g.mol⁻¹, 98%) con el objetivo de inhibir la actividad nitrificante. Finalmente, la mezcla se aireó durante 1 minuto y posteriormente se detuvo la aireación. La pendiente obtenida de la disminución lineal de la concentración de oxígeno disuelto correspondió a OUR_{HA}.

B- Determinación de la OUR heterotrófica (OUR_H) para el suero de queso soluble (SQS)

Para llevar a cabo este ensayo se añadió 15 mL de agua corriente a un vaso de precipitado (50 mL) conteniendo 25 mL del licor de mezcla previamente lavado. La mezcla fue centrifugada y lavada, siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo A, con el propósito de someter el lodo a un tratamiento físico idéntico. Posteriormente, la biomasa se resuspendió en el efluente sintético (15 mL), descrito en la Tabla 5.3 para la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀, filtrado mediante una membrana de celulosa de 0.45 µm de tamaño de poro y se suplementó con una solución que contenía amoníaco, fósforo y micronutrientes.

Finalmente, se agregó 1 mL de alitiourea (Sigma Aldrich, 116.18 g.mol⁻¹, 98%). La mezcla (40 mL) se colocó en el respirómetro, se aireó y se determinó OUR_{HB} como se describió anteriormente (Ensayo A).

Capítulo 5

Cabe señalar que OUR_{HA} y OUR_{HB} involucraron no solo el consumo microbiano de oxígeno asociado a la oxidación del suero de queso particulado y soluble respectivamente, sino también la oxidación de las reservas endógenas y la autooxidación de la biomasa. Por lo tanto, también fue necesario determinar la actividad respiratoria endógena.

C- Determinación de la OUR endógena heterotrófica

Para llevar a cabo esta determinación se siguió el procedimiento descrito en el ensayo B. Sin embargo, en este caso, la biomasa fue resuspendida en agua corriente (en lugar de utilizarse el efluente sintético filtrado) y la OUR correspondió a la actividad endógena de los heterótrofos (OUR_{END}).

Finalmente, los valores de OUR correspondientes a la oxidación de suero de queso particulado (OUR_{SQP}) y el suero de queso soluble (OUR_{SQS}) se determinaron mediante las siguientes expresiones

$$OUR_{SQP} = OUR_A - OUR_{END} \quad (5.3)$$

$$OUR_{SQS} = OUR_B - OUR_{END} \quad (5.4)$$

Cabe destacar que OUR_{SQP} y OUR_{SQS} corresponden a la oxidación del carbono orgánico del suero de queso particulado y suero de queso soluble respectivamente.

5.5 RESULTADOS DE LA OPERACIÓN DEL SBR_{SQ} ALIMENTADO CON UN EFLUENTE SINTÉTICO BASADO EN SUERO DE QUESO SUPLEMENTADO CON AMONIO

En esta sección se exponen los resultados del efluente modelo de la industria láctea suplementado con sulfato de amonio. El suero de queso constituyó la fuente de carbono y energía para microorganismos heterótrofos, así como la fuente de nitrógeno tanto para heterótrofos como autótrofos. La adición de amonio permitió lograr una relación DQO:N adecuada, además de proveer una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable, para ambos grupos microbianos. En primer lugar, se estudió el efecto de la presencia/ausencia de micronutrientes sobre el proceso de nitrificación. Asimismo, para este estudio se evaluaron cambios en la carga orgánica de suero de queso, con el fin de evaluar la competencia por parte de los microorganismos por los micronutrientes.

Capítulo 5

Para este fin, primero se estudiaron las primeras tres condiciones expuestas en la Tabla 5.2: condición SMCM₂₀ la cual no contenía micronutrientes (SM) y tenía una carga orgánica media (CM) (respecto a los otros ensayos que se llevaron a cabo), la condición MCM₂₀, la cual contenía micronutrientes (M) y también contenía carga orgánica media (CM) y la condición SMCB₂₀, la cual no contenía micronutrientes (SM) y tenía una carga orgánica baja (CB), la cual correspondió a la mitad de la CM. Las tres condiciones correspondieron a un TRC de 20 días, como se explicó anteriormente, el subíndice 20 en la nomenclatura utilizada.

En las siguientes secciones se expondrán inicialmente los resultados para estas tres primeras condiciones, donde se detallará para cada una de ellas: el tamaño granular, ISV, morfología, eficiencia de remoción de carbono orgánico soluble y amoníaco, así como los ensayos respirométricos para determinar consumo de suero particulado y N orgánico. También se caracterizó la comunidad microbiana de cada sistema mediante análisis genómico.

Finalmente se presentan los resultados correspondientes a las restantes condiciones experimentales MCM₁₀, MCA₂₀ y MCANB₂₀ detalladas en la Tabla 5.2.

5.5.1 Efecto de la presencia de micronutrientes sobre la nitrificación. Análisis de parámetros físico-químicos

Se estudió en primer lugar el efecto de la presencia de micronutrientes sobre la capacidad de nitrificación, tal como se mencionó recientemente, así como sobre la remoción conjunta de carbono y nitrógeno. Es por este motivo que se analizaron tres condiciones. Inicialmente se estudió la condición SMCM₂₀, la cual tal como indica la Tabla 5.2, en ausencia de micronutrientes. La condición MCM₂₀ con igual carga orgánica y presencia de micronutrientes. La condición SMCB₂₀ se operó en ausencia de micronutrientes y con la carga orgánica reducida a la mitad. Estos ensayos permitirían evaluar el efecto de la presencia de micronutrientes sobre la capacidad de nitrificación, así como la competencia entre microorganismos autótrofos y heterótrofos por los micronutrientes. A partir de los resultados observados en estos dos últimos ensayos, se fueron modificando distintos parámetros para seguir optimizando el sistema (resultados que serán presentados luego de los estudios de estas tres primeras condiciones).

Capítulo 5

5.5.1.1 Estabilidad de los sistemas: tamaño de gránulos e índice volumétrico de sedimentabilidad (ISV)

La biomasa del SBR automatizado se usó como inóculo en el reactor SBR_{SQ} para la condición SMCM₂₀. La biomasa granular generada en dicha condición, bajo condiciones de estabilidad, fue utilizada como inóculo de las condiciones experimentales MCM₂₀ y SMCB₂₀.

A continuación, se detallan las concentraciones de biomasa expresadas como ST (g.L⁻¹) alcanzadas en el SBR_{SQ} para las condiciones ensayadas (Tabla 5.4).

Tabla 5.4: Concentración en ST (g.L⁻¹) de la biomasa en las diferentes condiciones. Análisis estadístico *p< 0.05 y **p> 0.05. (Test de normalidad, Shapiro-Wilk p<0.05).

SBR_{SQ}	Condición SMCM₂₀	Condición MCM₂₀	Condición SMCB₂₀
ST (g.L⁻¹)	3.0 (0.5)	3.0 (0.4)	1.5 (0.22)*

Las concentraciones de ST se mantuvieron constantes durante todo el tiempo de operación de cada condición. Asimismo, para determinar si los sistemas se encontraban estables, se estudió la evolución del tamaño de los gránulos (biomasa granular) a lo largo de los diferentes TRC en las tres condiciones. Para la condición SMCM₂₀ se requirieron 5 TRC (100 días) para la formación de los gránulos de un tamaño promedio de 3 mm de diámetro, cuyo valor se mantuvo constante durante todo el estudio.

Cabe destacar que según bibliografía el tamaño promedio de los gránulos aeróbicos se encuentra entre 0.2 y 5 mm (Liu y Tay, 2004).

En la Figura 5.2 (A y B) se presenta el estudio del diámetro promedio de las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀. Cabe destacar que no se presenta la evolución del tamaño granular de la condición SMCM₂₀ ya que el mismo se mantuvo estable durante todo el estudio. En la Figura 5.2 se puede observar que el diámetro promedio de los gránulos aumentó con el tiempo hasta alcanzar condiciones de estabilidad, a 134 días para la condición MCM₂₀ (0.3-0.35 mm, 6.7 TRC) y 260 días (0.3-0.35 mm, 13 TRC) para la condición SMCB₂₀.

Capítulo 5

El índice volumétrico de sedimentabilidad (ISV) de las condiciones $SMCM_{20}$, MCM_{20} y $SMCB_{20}$ estuvo por debajo de 90 mL.g ST^{-1} indicando una buena sedimentación (Liu y Tay, 2004). En la condición $SMCM_{20}$, el ISV se mantuvo en aproximadamente 30 mL.g ST^{-1} , en el caso de la condición MCM_{20} se observó un perfil de ISV que fue disminuyendo a lo largo de los TRC transcurridos hasta alcanzar valores de aproximadamente 50 mL.g ST^{-1} . En el $SMCB_{20}$, el ISV se mantuvo constante a lo largo de los TRC transcurridos en 25 mL.g ST^{-1} . Cabe destacar que las condiciones de estabilidad para estos sistemas son definidas conforme a lo detallado en la sección 5.4.3 de la tesis. Tanto el perfil de la condición MCM_{20} como $SMCB_{20}$ se puede observar en la Figura 5.2.

En la Figura 5.2 se observan los parámetros d y D obtenidos de las mediciones del tamaño granular. Cabe destacar que las barras de color naranja se refieren al diámetro hidrodinámico (d) y las barras color verde agua se refieren al coeficiente de difusión traslacional (D), tal como se menciona en el capítulo 2.

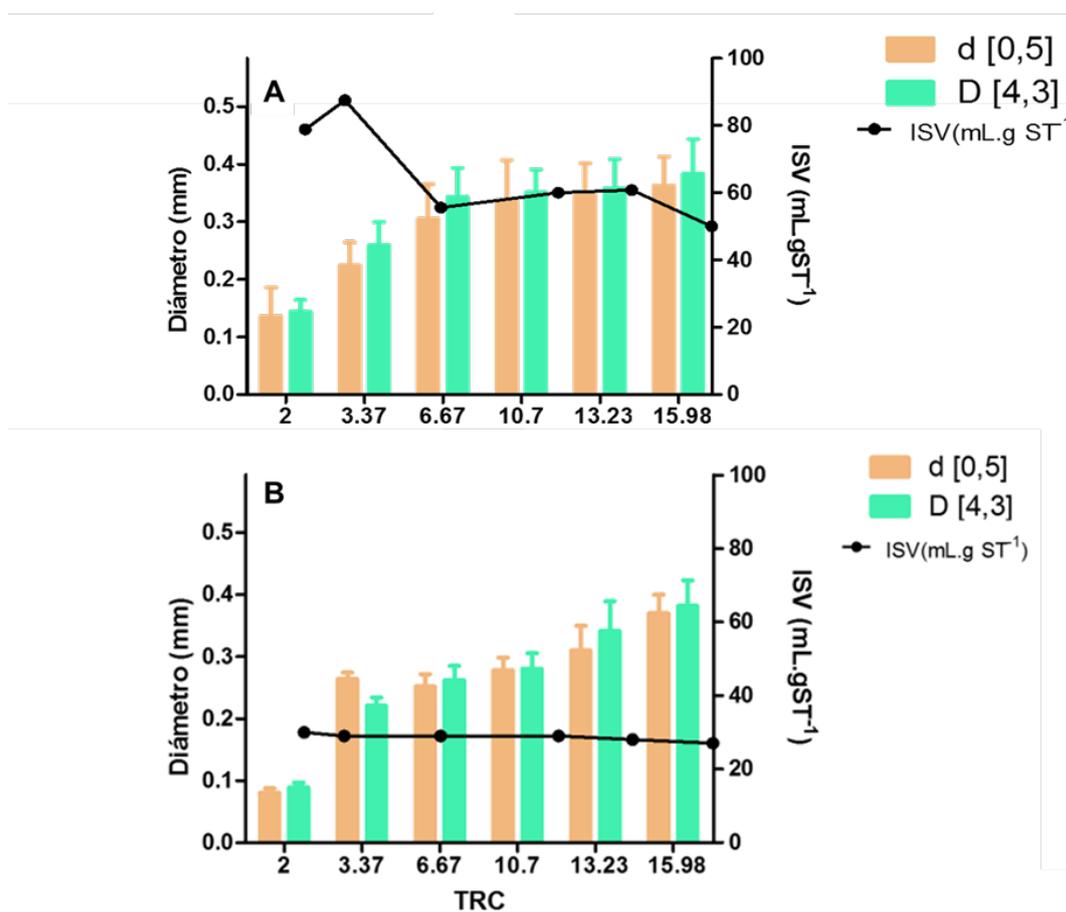


Figura 5.2: Tamaño granular (diámetro, mm) e índice volumétrico de lodo (ISV_{30} , mL.gST^{-1}) en función de los TRC transcurridos. SBR_{SQ} condición MCM_{20} (A), SBR_{SQ} condición $SMCB_{20}$ (B).

Capítulo 5

Respecto al estudio de tamaño y morfología granular, se llevó a cabo la observación microscópica de la biomasa en las condiciones MCM_{20} y $SMCB_{20}$. Las micrografías SEM de los gránulos se muestran en la Figura 5.3 A y B (condición MCM_{20}) y en la Figura 5.3 C y D (condición $SMCB_{20}$), las cuales mostraron una morfología granular regular y tridimensional, con límites perfectamente delimitados. Cabe destacar que también se observa lodo activado, con crecimiento disperso, lo cual es típico de los sistemas granulares aeróbicos.

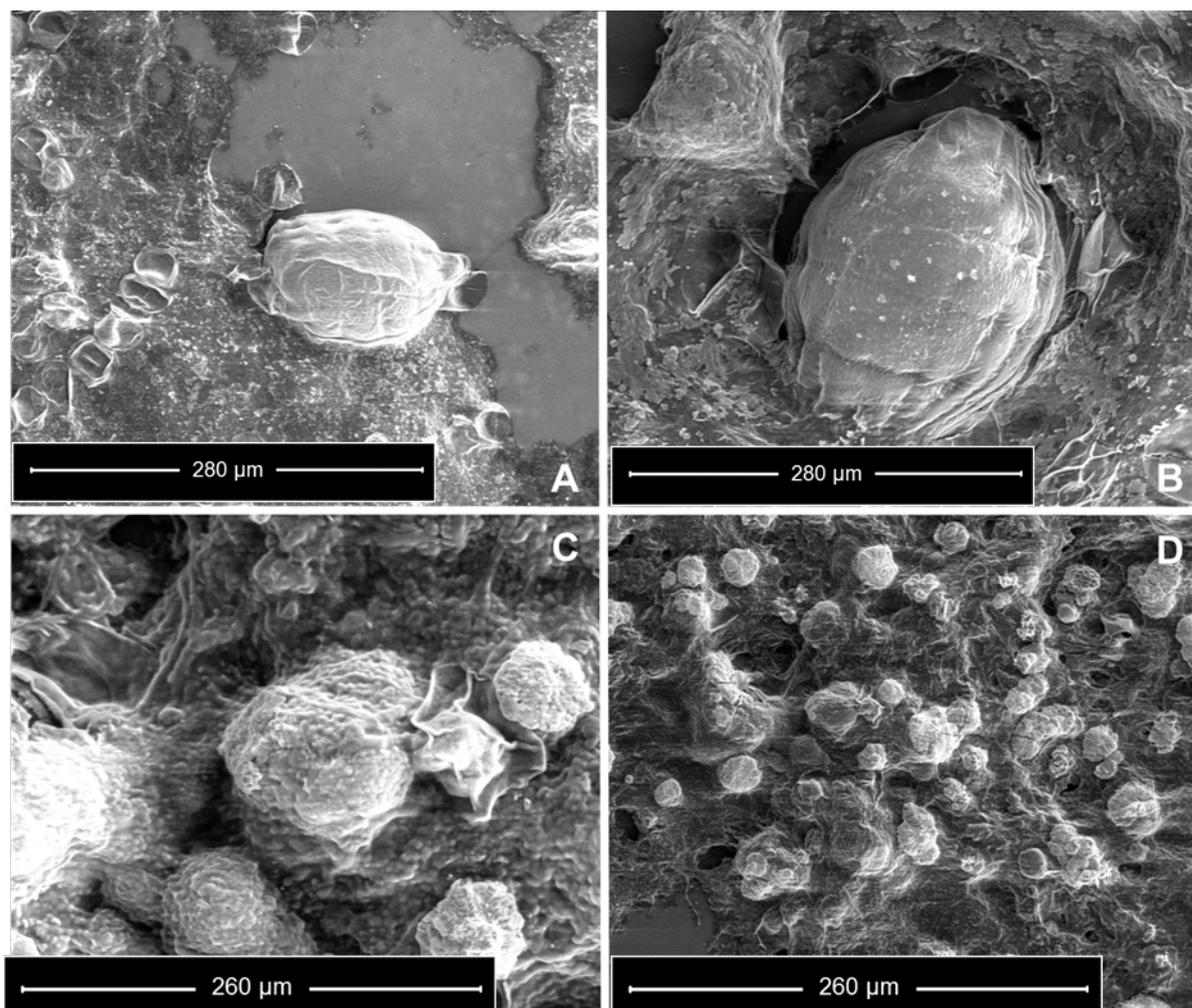


Figura 5.3: Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de lodo granular aeróbico en la condición MCM_{20} (A, B) y en la condición $SMCB_{20}$ (C, D).

Cabe destacar que en la condición $SMCM_{20}$, los gránulos eran demasiado grandes para ser observados por SEM.

Capítulo 5

5.5.1.2 Consumo de carbono orgánico soluble y amoniaco

Para el estudio del consumo de la fuente de carbono orgánico soluble y la remoción de nitrógeno amoniacal, se dividió el ciclo correspondiente a 24 hs en dos períodos (“feast” y “famine”). El carbono orgánico soluble correspondió a la fracción del suero de queso fácilmente biodegradable, siendo medido como DQOs. La remoción de 90-95% del carbono orgánico soluble permitió definir la extensión del período de disponibilidad de carbono externo de fácil biodegradación (fase “feast”). La duración de cada período dependió de la condición estudiada.

En la condición SMCM₂₀, al estudiar el perfil de las formas de nitrógeno, se observó una formación muy pobre de las especies de nitrato y nitrito (Figura 5.4 A) revelando que la nitrificación fue irrelevante. El descenso de NH₄⁺-N estuvo asociado principalmente al crecimiento de microorganismos heterótrofos. Respecto a la remoción de carbono orgánico soluble, medido como DQO, se puede observar que el mismo se agotó casi completamente a las 8 horas del ciclo (fase feast), logrando una completa remoción durante la fase “famine” (Figura 5.4 B).

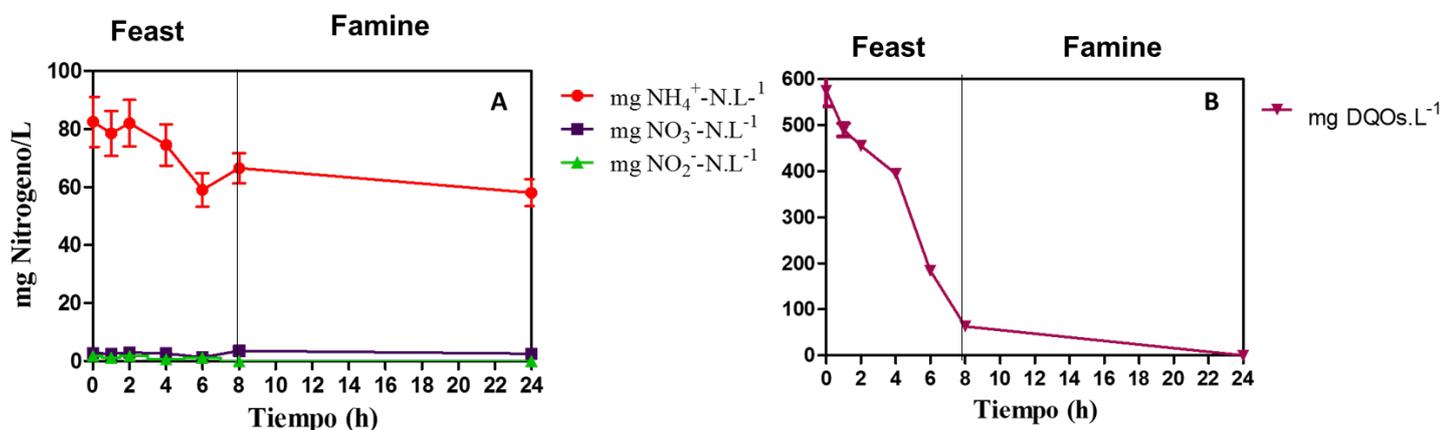


Figura 5.4: Cambios en las concentraciones de carbono orgánico soluble (suero de queso soluble, DQOs) y las diferentes formas de nitrógeno inorgánico a lo largo de un ciclo operativo del reactor en estado estable de la condición SMCM₂₀. DQO_S (▼), NH₄⁺-N (●), NO₃⁻-N (■), NO₂⁻-N (▲).

Cabe destacar que esta condición no condujo a resultados promisorios asociados al proceso de nitrificación, observándose luego de 24 hs de reacción aún elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal lo cual llevó a que fuese descartada para estudios posteriores, continuando el estudio con las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀.

Capítulo 5

En la condición MCM₂₀, el carbono orgánico soluble (DQOs) representó 60-70% de la carga orgánica proporcionada por el suero de queso. El nitrógeno amoniacal disminuyó progresivamente a lo largo del ciclo (Figura 5.5 A). El DQOs fue removido casi completamente en las primeras 2 horas del ciclo operativo con una acumulación simultánea de glucógeno (300 mg.L⁻¹) (Figura 5.5 B). Esta fase con disponibilidad de DQO fácilmente biodegradable correspondió al período “feast”. En el período “famine” tuvo lugar la degradación del glucógeno y el proceso de nitrificación.

La actividad nitrificante condujo a la formación de NO₃⁻-N, cuya concentración se incrementó de forma continua hasta el final del ciclo, sin acumulación significativa de NO₂⁻-N (Figura 5.5 A).

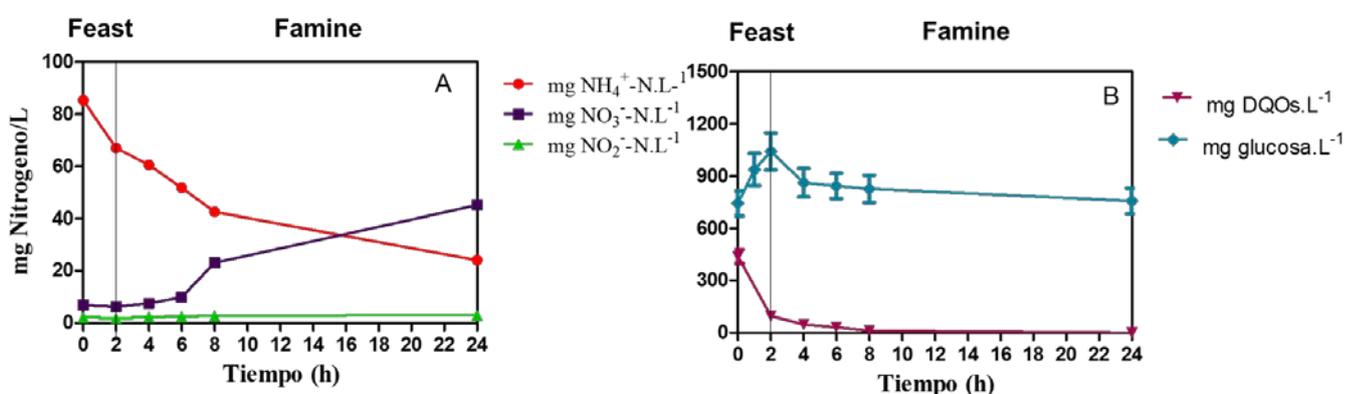


Figura 5.5: Cambios en las concentraciones de carbono orgánico soluble (suero de queso soluble, DQOs), glucógeno y las diferentes formas de nitrógeno inorgánico a lo largo de un ciclo operativo, del reactor en estado estable, de la condición MCM₂₀, DQOs (▼), Glucógeno (◆), NH₄⁺-N (●), NO₃⁻-N (■), NO₂⁻-N (▲).

La condición SMCB₂₀ poseía la mitad de la carga orgánica con respecto a la condición SMCM₂₀, implicando una reducción de la relación DQO: NTK de 100:11.6 a 100:21.6, y sin micronutrientes (Tabla 5.2). Además, se observó que el DQOs representaba casi por completo el carbono orgánico inicial. La reducción de la carga orgánica conduce a un menor crecimiento heterotrófico, como consecuencia de esto, el sistema podría favorecerse en el desarrollo de nitrificantes autótrofos. En esta condición, el nitrógeno amoniacal se removió parcialmente durante todo el ciclo (Figura 5.6). El proceso de nitrificación tuvo lugar desde el principio hasta el final del ciclo, observándose un aumento en la concentración de NO₃⁻-N a lo largo del estudio. Asimismo, se observó casi de forma

Capítulo 5

despreciable una mínima acumulación de NO_2^- -N entre las 2-4 hs de comenzado el ciclo, que luego disminuyó rápidamente a niveles no detectables (Figura 5.6. A). La remoción de DQOs y la acumulación de glucógeno (207 mg.L^{-1}) tuvieron lugar en las primeras 4 horas del ciclo operativo, correspondiente al período “feast”; posteriormente el glucógeno fue degradado en la fase “famine” (Figura 5.6 B).

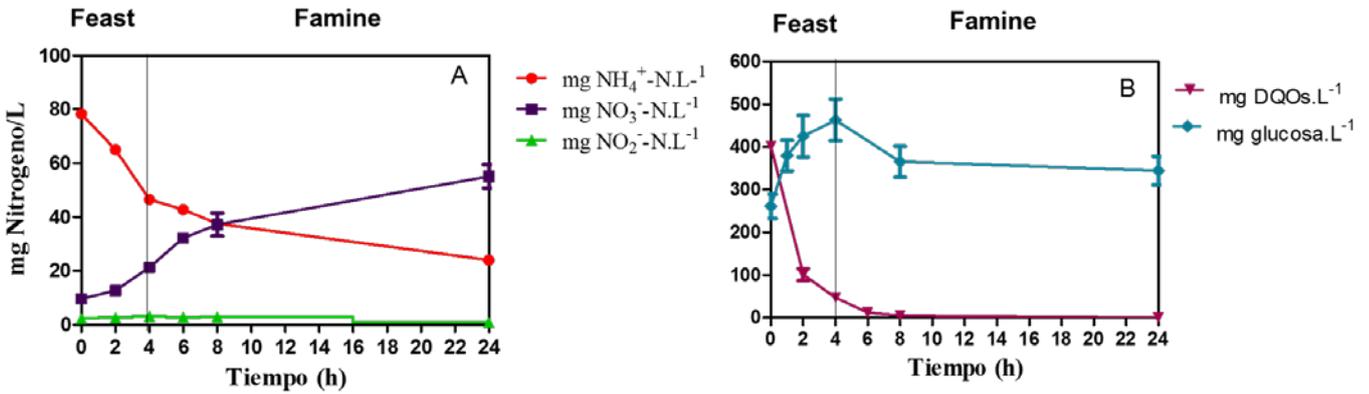


Figura. 5.6: Cambios en las concentraciones de carbono orgánico soluble (suero de queso soluble, DQOs), glucógeno y las diferentes formas de nitrógeno inorgánico a lo largo de un ciclo operativo del reactor, en condiciones de estabilidad, de la condición SMCB_{20} . DQOs (▼), Glucógeno (◆), NH_4^+ -N (●), NO_3^- -N (■), NO_2^- -N (▲).

Cabe destacar que en las condiciones estudiadas la acumulación de PHA fue pobre. Se llevó a cabo un balance de masa (en unidades de DQO), durante el período “feast” con el fin de conocer cuál era la principal reserva de carbono intracelular sintetizada a partir del suero de queso. En este balance se incluyó la velocidad de consumo de carbono orgánico externo, suero de queso, (r_{SQ}), la velocidad de consumo de oxígeno asociada a la actividad heterotrófica ($r_{\text{O}_2\text{SQ}}$), la velocidad de crecimiento heterotrófico a partir del consumo del suero de queso (r_x) y la velocidad de producción de glucógeno (r_{GLU}) y PHB (r_{PHB}):

$$r_{\text{SQ}} = 1.125 r_{\text{PHB}} + r_{\text{glu}} + r_{\text{O}_2\text{SQ}} + 1.05 r_x \quad (5.5)$$

Capítulo 5

El balance propuesto fue realizado para el período “feast” de la condición MCM₂₀, en el cual no tuvo lugar el proceso de nitrificación, de manera que el consumo de oxígeno asociado a la actividad heterotrófica r_{O_2SQ} correspondió a la velocidad total de consumo de oxígeno (r_{O_2T}) determinado por respirometría. Asumiendo que el carbono orgánico fue principalmente acumulado como reserva intracelular, es decir considerando despreciable el crecimiento heterótrofo, el balance puede expresarse como:

$$r_{SQ} = 1.125 r_{PHB} + r_{glu} + r_{O_2T} \quad (5.6)$$

A partir de las medidas experimentales de r_{SQ} , r_{glu} y r_{O_2T} pudo estimarse la síntesis de PHA como reserva de carbono. De acuerdo con este balance, el glucógeno fue la principal reserva de carbono intracelular sintetizada a partir del suero de queso durante el período “feast”; la síntesis de PHA fue insignificante, obteniéndose un porcentaje de acumulación de reservas de carbono y energía del 91 % (± 6) para el glucógeno y 9 % (± 2) para el PHA. La tinción de PHA con Negro Sudán (Sudan Black) permitió confirmar estos resultados. Cabe destacar que el suero de queso del efluente sintético presentó un alto contenido de lactosa hidrolizada (Tabla 5.1), y los monosacáridos de glucosa y galactosa podrían ser almacenados fácilmente como glucógeno. Este análisis, así como los resultados obtenidos del balance de masa, concuerdan con los resultados presentados por Miao y col. (2016), quienes informaron que la glucosa se convierte principalmente en glucógeno.

La condición SMCB₂₀ presentó menores velocidades volumétricas de consumo de DQOs y amonio respecto a la condición MCM₂₀ (Tabla 5.5). Esta diferencia puede explicarse teniendo en cuenta que en la condición SMCB₂₀ la concentración de biomasa alcanzada fue la mitad que la correspondiente a la condición MCM₂₀ (Tabla 5.4). Ambas condiciones presentaron porcentajes de eliminación de nitrógeno amoniacal y velocidades específicas de remoción DQOs y nitrógeno amoniacal que no fueron significativamente diferentes (Tabla 5.5).

Capítulo 5

Tabla 5.5: Parámetros cinéticos y eficiencia de la remoción de las diferentes formas de nitrógeno. Análisis estadístico * $p < 0.05$ y ** $p > 0.05$. (Test de normalidad, Shapiro-Wilk $p < 0.05$).

	Parámetros	Condición MCM ₂₀	Condición SMCB ₂₀
Ciclo total	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N	74 (7.8)**	70 (8.8)**
	% Remoción de NTK	89 (7.6)**	86 (8.1)**
	% Remoción de N inorgánico	48 (5.6)*	24 (3.3)*
	% Remoción de NTK (nitrificación)	76 (8.9)**	74 (9.8)**
	% Remoción de NTK (Crecimiento heterótrofo)	24 (3.5)**	26 (2.6)**
	%NDS	52 (4.3)*	18 (1.7)*
Fase "Feast"	r _{DQOs} (mg DQOs·(L.h) ⁻¹)	132.1 (9.5)*	71.5 (5.4)*
	q _{DQOs} (mg DQOs·(g ST.h) ⁻¹)	43.3 (2.1)**	42.4 (4.6)**
	% Remoción de NTK	29 (3.0)*	54.7 (5.6)*
	% Remoción de NTK (nitrificación)	0*	100*
	% Remoción de NTK (Crecimiento heterótrofo)	100*	0*
	%NDS	0*	18.0 (1.7)*
	Y _{GLU/DQOs} (mg DQO. (mg DQOs) ⁻¹)	0.80	0.93
Fase "Famine"	r _{NH₄⁺-N} (mg NH ₄ ⁺ -N·(L.h) ⁻¹)	6.3 (0.7)*	3.4 (0.5)*
	q _{NH₄⁺-N} (mg NH ₄ ⁺ -N·(g ST.h) ⁻¹)	1.8 (0.2)**	2.3 (0.33)**
	% Remoción de NTK	71 (4.5)*	46.4 (4.5)*
	% Remoción de NTK (nitrificación)	80 (7.1)*	23 (6.7)*
	% Remoción de NTK (Crecimiento heterótrofo)	20 (2.5)*	77 (8.8)*
	%NDS	52 (4.3)*	0*

Inicialmente al estudiar la condición SMCM₂₀ se observó una baja actividad nitrificante, aunque cabe destacar que no pueden destacarse errores en la estimación de nitrito y nitrato debido a la sensibilidad de los métodos espectrofotométricos utilizados (secciones 2.6.4 y 2.6.5). Sin embargo, el porcentaje de remoción de nitrógeno inorgánico observado en este estudio fue del 20%, lo que indicaría que la remoción de nitrógeno amoniacal estaría asociada al consumo por microorganismos heterótrofos para crecimiento.

Capítulo 5

Sin embargo, cabe destacar que esta condición condujo a resultados atractivos frente a otros escenarios, como por ejemplo el tamaño granular, el cual fue casi 10 veces mayor que el obtenido para las condiciones restantes. Respecto a la remoción de carbono orgánico, si bien se logró una buena remoción, la misma requirió más tiempo (casi 8 horas para lograr entre el 90 y 95% de remoción) que para los estudios de las condiciones MCM_{20} y $SMCB_{20}$.

Esta considerable diferencia de tamaño del gránulo para la condición $SMCM_{20}$ podría deberse a la acumulación del nitrógeno amoniacal en el reactor debido al pobre proceso de nitrificación en este sistema, produciendo mayor concentración de amonio libre, y por ende una mayor toxicidad para los microorganismos heterótrofos por parte de este compuesto. Esto podría haber provocado una menor tasa metabólica de la biomasa presente y por ende un crecimiento más lento de estos microorganismos, conduciendo a un incremento en la producción de sustancias poliméricas extracelulares (exopolisacáridos) (Seviour y col, 2009). Los exopolisacáridos al poseer propiedades gelificantes, pueden contribuir a la hidrofobicidad y estructura elástica de los gránulos, permitiendo una mayor adhesión de los microorganismos y por ende un aumento en el tamaño granular (Lin y col, 2010).

5.5.1.3 Consumo de carbono orgánico particulado y nitrógeno orgánico y nitrógeno total Kjeldahl (NTK). Ensayos respirométricos

5.5.1.3.1 Cambios de las diferentes formas de NTK

Los cambios en el nitrógeno total Kjeldahl (NTK), cuantificado por el método de micro-Kjeldahl, se estudiaron a lo largo de los ciclos operativos del SBR_{SQ} de las condiciones MCM_{20} y $SMCB_{20}$, en los cuales se observó una eliminación significativa de carbono orgánico y nitrógeno amoniacal (Figura 5.5 y 5.6). Como se mencionó anteriormente, la condición $SMCM_{20}$ fue descartada luego de observar una pobre remoción de nitrógeno amoniacal y muy baja actividad nitrificante.

Capítulo 5

Se cuantificó el NTK del efluente sintético (NTK_{AR} , NTK del agua residual), aportado tanto por el suero de queso (NTK_{SQ}) y el amonio influente, del licor de mezcla (NTK_{LM}) y el presente en forma soluble, correspondiente este último a muestras filtradas del reactor utilizando una membrana de celulosa de tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$ (NTK_{S}). NTK_{LM} y NTK_{S} fueron determinados a diferentes tiempos del ciclo operativo. Cabe destacar que el amonio, del influente como el correspondiente a diferentes tiempos del ciclo operativo, fue determinado por el método Nessler (sección 2.6.3).

El NTK aportado por el suero de queso (NTK_{SQ}) constituyente de los efluentes lácteos utilizados en los SBR_{SQ} resultó: $12 \text{ mg N} \cdot (\text{L} \cdot \text{día})^{-1}$ y $6 \text{ mg N} \cdot (\text{L} \cdot \text{día})^{-1}$ para la condición MCM_{20} y condición SMCB_{20} respectivamente. Las concentraciones de NTK_{S} (NTK soluble aportado por el suero de queso, $\text{NH}_3\text{-N}$ y productos de lisis microbiana) del reactor fueron similares a las concentraciones correspondientes al $\text{NH}_3\text{-N}$ determinado por el método de Nessler para las dos condiciones experimentales estudiadas. Esto implica que tanto el suero de queso como la biomasa no contribuyeron con cantidades significativas de nitrógeno a la fase soluble.

El NTK del licor de mezcla (NTK_{LM}) estuvo compuesto por las formas reducidas de nitrógeno aportadas por: a- el efluente lácteo modificado, conteniendo NH_3 proveniente del suplemento de nitrógeno ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y nitrógeno orgánico (N_{ORG} , soluble y particulado) aportado por las proteínas del suero de queso, b- N_{ORG} correspondiente a la biomasa microbiana y a los productos de lisis de la misma. El NTK_{P} se determinó a partir de la diferencia entre NTK_{LM} y NTK_{S} , y correspondió al nitrógeno orgánico aportado por el suero de queso y la biomasa.

En la condición SMCB_{20} se aprecia una disminución de NTK_{LM} en el período “feast” (Figura 5.7 B) causada por la remoción de nitrógeno por parte del proceso de nitrificación, en concordancia con el perfil de nitrato observado en la Figura 5.6. El NTK_{LM} disminuye ligeramente durante el periodo “famine” de ambas condiciones. Cabe destacar que el NTK_{LM} presenta mayores valores iniciales en la condición MCM_{20} , ya que la misma contenía el doble de carga orgánica que la condición SMCB_{20} y en consecuencia una mayor concentración de biomasa.

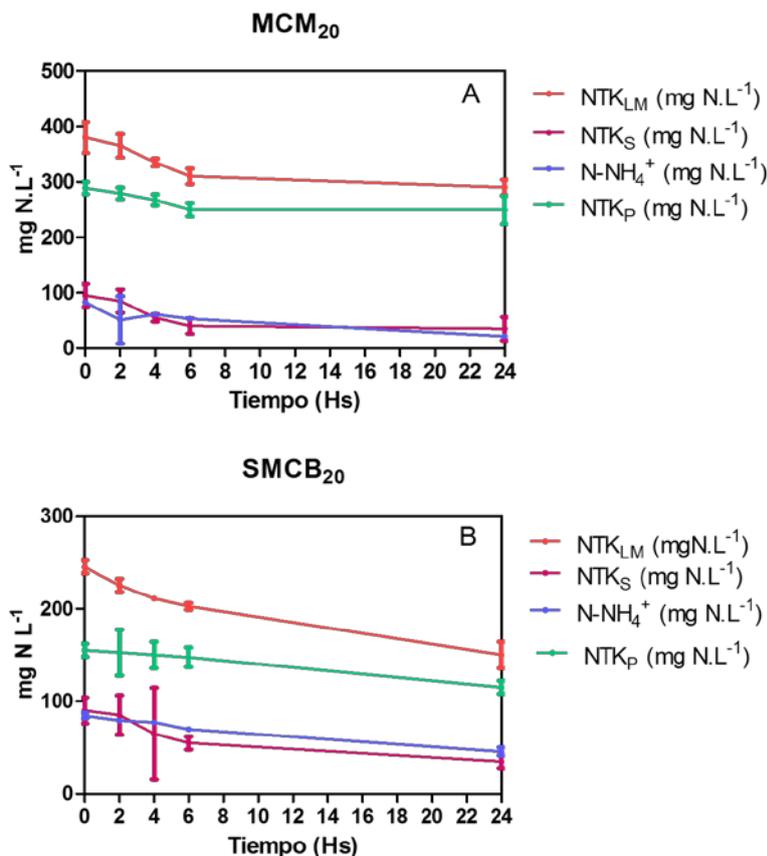


Figure 5.7: Variación de la concentración de las diferentes formas de NTK. NTK_{LM} (●) (lodo granular + suero de queso + NH₄⁺-N), NTK_S (●) (suero de queso + NH₄⁺-N + productos de lisis), NH₄⁺-N (●) y NTK_P (●) (particulado). En el gráfico A se observa la condición MCM₂₀ y en el gráfico B la condición SMCB₂₀.

El perfil de concentración hallado para el NTK_P a lo largo de los ciclos de estudio, demostrado en la Figura 5.7 A (condición MCM₂₀) y Figura 5.7 B (condición SMCB₂₀) se determinó a partir de la diferencia existente entre NTK_{LM} y NTK_S.

En la condición MCM₂₀, el análisis comparativo entre valores de NTK_S y NH₃-N permite demostrar que no son significativamente diferentes permitiendo demostrar lo mencionado anteriormente donde tanto el suero de queso como la biomasa no contribuyeron con cantidades significativas de nitrógeno a la fase soluble. Esto permite corroborar que el NTK_P corresponde al nitrógeno aportado por el suero y a la biomasa presente en el sistema. En la condición SMCB₂₀, el NTK_S coincidió nuevamente con el perfil del nitrógeno amoniacal (NH₃-N) (Figura 5.7 B).

Capítulo 5

En ambas condiciones, el NTK_P presenta un similar comportamiento a NTK_{LM} . En el caso de NTK_P , su ligera disminución a lo largo del ciclo medido está asociada probablemente a la oxidación del nitrógeno orgánico particulado por actividad nitrificante; sin embargo, podrían existir fenómenos de solubilización.

5.5.1.3.2 Consumo de carbono orgánico particulado y nitrógeno orgánico mediante análisis respirométricos

El consumo de suero de queso particulado, carbono orgánico y nitrógeno orgánico, no pudo ser determinado directamente por los métodos de DQO y Kjeldahl respectivamente, ya que resulta sumamente complejo separarlos de la biomasa para la cuantificación. Cabe destacar que el leve decaimiento de NTK_P observado en la Figura 5.7 (A y B) podría reflejar en parte la oxidación del nitrógeno orgánico particulado del suero de queso, como se describió previamente; sin embargo, no brinda información respecto de la cantidad de nitrógeno orgánico que es asimilado por los microorganismos a largo del ciclo operativo. Por esta razón se utilizó la técnica respirométrica para estimar la velocidad de consumo de suero de queso particulado.

La velocidad de consumo de suero de queso particulado (carbono orgánico) se determinó indirectamente a partir de las mediciones de OUR realizadas teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

a- La velocidad de consumo de oxígeno asociada a la oxidación de suero de queso particulado (OUR_{SQP}) representó el 22% del OUR correspondiente a la oxidación de suero de queso soluble (OUR_{SQS}), es decir $OUR_{SQP} = 0.22 \cdot OUR_{SQS}$, según se determinó mediante los ensayos respirométricos descritos en la sección 5.4.6.

b- La velocidad de consumo de oxígeno es proporcional a la velocidad de consumo de sustrato carbonáceo (r_S) es decir, $OUR = y_{O/S} \cdot r_S$ siendo $y_{O/S}$ el coeficiente de oxidación del sustrato.

c- Se supuso que $y_{O/S}$ para el suero de queso particulado es el mismo que el correspondiente al suero de queso soluble, lo que condujo a la siguiente expresión:

$$\frac{OUR_{SQP}}{r_{SQP}} = \frac{OUR_{SQS}}{r_{SQS}} \quad (5.7)$$

Capítulo 5

donde r_{SQP} y r_{SQS} es la velocidad de degradación del suero de queso particulado y el suero de queso soluble respectivamente.

Reorganizando la ecuación 5.7 y teniendo en cuenta que $OUR_{SQP} = 0.22 \cdot OUR_{SQS}$, la velocidad de degradación del suero de queso particulado (r_{SQP}) correspondió al 22% de la correspondiente a la fracción soluble de suero de queso (r_{SQS}). Cabe señalar que r_{SQS} se determinó fácilmente a partir de mediciones de DQO soluble (sección 5.5.1.2). r_{SQP} y r_{SQS} corresponden específicamente a la velocidad de degradación del carbono orgánico del suero particulado y soluble respectivamente.

La velocidad de consumo de nitrógeno orgánico, presente en forma particulada, puede considerarse proporcional a la velocidad de consumo del suero de queso particulado, ya que el nitrógeno orgánico proviene de las proteínas aportadas por el suero de queso. La velocidad de consumo de nitrógeno orgánico particulado se estimó teniendo en cuenta los siguientes supuestos: en primer lugar se consideró que la tasa de consumo de nitrógeno (r_N) es proporcional a la velocidad de degradación del sustrato carbonáceo para la síntesis microbiana, $r_N = y_{N/S} \cdot r_S$, siendo $y_{N/S}$ el coeficiente que relaciona el consumo de nitrógeno y sustrato carbonáceo. Asumiendo que $y_{N/S}$ para el suero de queso particulado es el mismo que el correspondiente al suero de queso soluble, se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{r_{N_{SQP}}}{r_{SQP}} = \frac{r_{N_{SQS}}}{r_{SQS}} \quad (5.8)$$

donde $r_{N_{SQP}}$ y $r_{N_{SQS}}$ es la velocidad de consumo de nitrógeno asociada al consumo de suero de queso particulado y suero de queso soluble respectivamente.

Teniendo en cuenta que $r_{SQP} = 0.22 \cdot r_{SQS}$, r_N para el suero de queso particulado ($r_{N_{SQP}}$) se puede determinar cómo $r_{N_{SQP}} = 0.22 \cdot r_{N_{SQS}}$. La velocidad de consumo de nitrógeno asociada con el consumo de suero de queso soluble correspondió a la velocidad de consumo de NH_3-N . La tasa de degradación relativamente lenta del suero de queso particulado implicó también una velocidad de consumo lenta de nitrógeno orgánico.

Capítulo 5

A partir de estos análisis se estimó que el nitrógeno orgánico fue consumido por completo en aproximadamente 8 hs para la condición MCM_{20} y 3 horas para la condición $SMCB_{20}$ respectivamente. A partir de los resultados obtenidos del consumo de amonio y nitrógeno orgánico, mediante respirometría, se pudo estimar el NTK_{AR} removido en cada condición estudiada. Ambos sistemas presentaron un porcentaje similar de remoción de NTK_{AR} (Tabla 5.5).

El NTK_{AR} consumido en el período “feast”, incluyendo el amoníaco y el nitrógeno orgánico, se estimó mediante la siguiente expresión:

$$\Delta(NTK)_{ARFE} = \Delta(NH_3 - N)_{FE} + 0.22 \Delta(NH_3 - N)_{FE} \quad (5.9)$$

Donde $\Delta(NTK)_{ARFE}$ y $\Delta(NH_3-N)_{FE}$ corresponde a NTK_{AR} y al nitrógeno amoniacal consumido en el período “feast” respectivamente y $0.22.\Delta(NH_3-N)_{FE}$ corresponde a N_{ORG} consumido en este mismo período.

Respecto al período “famine”, el NTK consumido fue estimado de la siguiente forma:

$$\Delta(NTK)_{ARFA} = \Delta(NH_3 - N)_{FA} + (NTK_{SQ} - 0.22 \Delta(NH_3 - N)_{FE}) \quad (5.10)$$

donde $\Delta(NTK)_{ARFA}$ y $\Delta(NH_3-N)_{FA}$ corresponde a NTK_{AR} y al nitrógeno amoniacal consumido en el período “famine” respectivamente, NTK_{SQ} es el NTK proveniente del suero de queso, el cual fue completamente consumido en cada ciclo de operación.

5.5.1.4 Remoción de nitrógeno mediante crecimiento heterotrófico y procesos de nitrificación y nitrificación-desnitrificación simultánea: balances de masa

El amoníaco, así como el nitrógeno orgánico se pueden oxidar mediante actividad nitrificante o bien utilizarse para el crecimiento heterotrófico. La identificación de cada proceso es muy difícil por dos razones: por un lado, la biomasa activa aumenta ligeramente durante cada ciclo operativo, lo cual no puede detectarse satisfactoriamente por métodos gravimétricos, por el otro lado los compuestos nitritos y/o nitratos generados por la

Capítulo 5

actividad nitrificante pueden ser desnitrificados simultáneamente y, en consecuencia, el proceso de nitrificación podría subestimarse.

La desnitrificación puede ser estimada mediante la recolección y cuantificación de los gases de nitrógeno (NO, N₂O, N₂), generados en el reactor, mediante cromatografía gaseosa. Sin embargo, este proceso se ha estimado de forma teórica sencilla mediante un balance de todas las formas de nitrógeno generadas, para las tres condiciones estudiadas, con el fin de determinar la pérdida de nitrógeno en forma gaseosa (NO, N₂O, N₂). Para ello se consideró el N presente en el influente (NH₃-N y N_{ORG} del suero), el efluente final (NH₃-N, NO₂⁻-N, NO₃⁻-N) y el N_{ORG} que sale con la purga de biomasa.

En la Tabla 5.6 se presenta la magnitud del proceso de desnitrificación estimada para las tres condiciones experimentales, siendo más representativo en los estudios SMCM₂₀ y MCM₂₀ en comparación con SMCB₂₀. Cabe destacar que el porcentaje de N desnitrificado se calculó en relación al NTK removido en todo el ciclo (removido por crecimiento y nitrificación) para cada una de las condiciones ensayadas.

Tabla 5.6: Nitrógeno gaseoso y porcentajes de remoción de nitrógeno por desnitrificación.

	Condición SMCM ₂₀	Condición MCM ₂₀	Condición SMCB ₂₀
N gaseoso (mg.L⁻¹)	14.1 (± 1.9)	22.9 (± 2.9)	7.1 (± 2.0)
% N desnitrificado	46.2 (± 3.3)	27.9 (± 3.1)	9.1 (± 1.4)

El consumo de NTK del agua residual modelo de la industria láctea, suplementada con amonio, puede expresarse como sigue:

$$\Delta(\text{NTK})_{AR} = \Delta(\text{NTK})_{OX} + \Delta(\text{NTK})_X \quad (5.11)$$

donde $\Delta(\text{NTK})_{AR}$ corresponde al NTK consumido del agua residual, $\Delta(\text{NTK})_{OX}$ corresponde al NTK oxidado por la actividad nitrificante y $\Delta(\text{NTK})_X$ es el NTK utilizado para el crecimiento heterotrófico. Cabe destacar que el $\Delta(\text{NTK})_{AR}$ para los períodos “feast” y “famine” fue determinado anteriormente mediante las ecuaciones 5.9 y 5.10 representadas en la sección 5.5.1.3.

Capítulo 5

En la condición MCM_{20} , $\Delta(NTK)_{AR}$ (correspondiente a amoníaco y nitrógeno orgánico) utilizado en el período “feast” ($\Delta(NTK)_{ARFE}$) fue destinado al crecimiento heterotrófico ya que el proceso de nitrificación no tuvo lugar; de esta forma $\Delta(NTK)_X$ correspondió a $\Delta(NTK)_{AR}$. En la condición $SMCB_{20}$, el proceso de nitrificación tuvo lugar desde el comienzo hasta el final del ciclo operativo. En esta condición, teniendo una baja relación DQO: NTK, se asumió que el proceso de nitrificación prevaleció sobre el crecimiento heterotrófico. Con el objetivo de simplificar el análisis, el consumo de nitrógeno en el período “feast” fue atribuido exclusivamente a la actividad nitrificante, es decir $\Delta(NTK)_{OX} = \Delta(NTK)_{AR}$.

En el período “famine”, de ambas condiciones, ocurrió simultáneamente el proceso de nitrificación y el crecimiento heterotrófico a partir de la reserva intracelular de glucógeno.

En este período, el crecimiento de la biomasa se estimó utilizando el coeficiente estequiométrico teórico: $0.5 \text{ C-mol X} \cdot (\text{C-mol glucógeno})^{-1}$.

Asimismo, el nitrógeno asimilado por el crecimiento heterotrófico se estimó utilizando el coeficiente estequiométrico que relaciona los contenidos de nitrógeno y carbono de la biomasa ($0.2 \text{ mol N} \cdot (\text{C-mol X})^{-1}$), asumiendo la fórmula elemental de biomasa $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$. Finalmente, el $\Delta(NTK)_{OX}$ en el período “famine” fue estimado por medio de la ecuación 5.11.

Para los períodos “feast” y “famine” se estimó la eliminación de nitrógeno mediante el proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS) a partir de la siguiente expresión:

$$\% NDS = \left(\frac{\Delta(NTK)_{OX} - \Delta(NO_X - N)}{\Delta(NTK)_{OX}} \right) \times 100 \quad (5.12)$$

donde $\Delta(NO_X-N)$ corresponde a la acumulación de las formas oxidadas de nitrógeno, representadas como nitrógeno en forma de nitrito y nitrato, generadas en cada período.

En la condición MCM_{20} , en estado estable, el nitrato generado representó aproximadamente el 65% del $\Delta(NTK)_{AR}$ removido, lo que indicó una adecuada actividad nitrificante del sistema. La remoción de NTK de alrededor de 75% se atribuyó principalmente al proceso de nitrificación y, en menor medida, a la asimilación de nitrógeno por el crecimiento heterotrófico (Tabla 5.5).

Capítulo 5

El proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS) tuvo lugar en el período “famine” y fue sumamente relevante ya que aproximadamente el 52% del nitrógeno nitrificado fue desnitrificado. Respecto al nitrógeno inorgánico, la remoción fue aproximadamente del 50%, lo que se atribuyó principalmente al proceso de desnitrificación aeróbica impulsado por las reservas de carbono intracelular (glucógeno) acumuladas en el período “feast” a partir del consumo de la fuente de carbono (DQO) y, en menor medida, a la asimilación heterotrófica de nitrógeno (Tabla 5.5).

Los ensayos realizados demostraron que la adición de micronutrientes a los efluentes lácteos es una buena alternativa para promover el crecimiento de bacterias nitrificantes, contribuyendo significativamente a la remoción biológica del nitrógeno.

En la condición $SMCB_{20}$ se observó también una buena actividad nitrificante ya que el nitrato formado representó aproximadamente el 85% del $\Delta(NTK)_{AR}$ removido. En este caso, el NTK también se eliminó casi exclusivamente por actividad nitrificante y, en menor grado, por asimilación heterotrófica, demostrando que una carga orgánica relativamente baja favoreció la actividad nitrificante desde el inicio del ciclo operativo. El nitrato al final de cada ciclo operativo representó casi totalmente la cantidad de $\Delta(NTK)_{AR}$ removido. En este caso, a diferencia de la condición MCM_{20} , el proceso de NDS no fue relevante. La eliminación de nitrógeno inorgánico fue deficiente, lo que podría atribuirse al crecimiento heterotrófico relativamente bajo y a la baja actividad desnitrificante (Tabla 5.5).

En la Tabla 5.5 se puede observar el rendimiento proveniente de la formación de glucógeno (expresado como DQO) en función del consumo de suero de queso soluble ($Y_{Glu/DQOs}$) para ambas condiciones.

Es importante destacar que si bien la actividad nitrificante en la condición MCM_{20} comenzó una vez concluida la fase “feast”, en el proceso global no presentó diferencias significativas con la condición $SMCB_{20}$, tal como se demostró en el análisis estadístico (Tabla 5.5).

Por último, es importante destacar que si bien las eficiencias de eliminación de NTK del ciclo global fueron similares para ambos reactores (Tabla 5.5), la carga volumétrica de NTK de la condición MCM_{20} fue ligeramente mayor (<10%) respecto a la condición $SMCB_{20}$.

Capítulo 5

5.5.2 Análisis de la composición bacteriana de los gránulos mediante tecnología de secuenciación de alto rendimiento

Con el objetivo de conocer la composición detallada y las abundancias relativas de las poblaciones bacterianas presentes en el biorreactor (SBR_{SQ}), de las condiciones $SMCM_{20}$, MCM_{20} y $SMCB_{20}$, se utilizó una tecnología de secuenciación de alto rendimiento (NGS) debido a las ventajas potenciales de ser flexible y fácilmente automatizable (Fakruddin y col, 2013).

La secuenciación de los fragmentos de PCR del gen 16S ARNr se llevó a cabo luego de la extracción de ADN total de los microorganismos presentes en el reactor para cada una de las condiciones estudiadas.

Se generaron secuencias agrupadas en 222 OTU para la condición $SMCM_{20}$, 905 OTU para la condición MCM_{20} y 685 OTU para la condición $SMCB_{20}$.

Todas las secuencias representativas de cada OTU de cada condición se clasificaron dentro del dominio Bacteria.

En la condición $SMCM_{20}$ se detectaron 10 órdenes bacterianos y 16 géneros relevantes. Los filos con mayor abundancia detectados fueron los siguientes: Proteobacteria (61%), Bacteroidetes (15%), Actinobacteria (13%) y en menor abundancia Chloroflexi (5%) y Chlamydiae (3.3 %) (Figura 5.8).

Capítulo 5

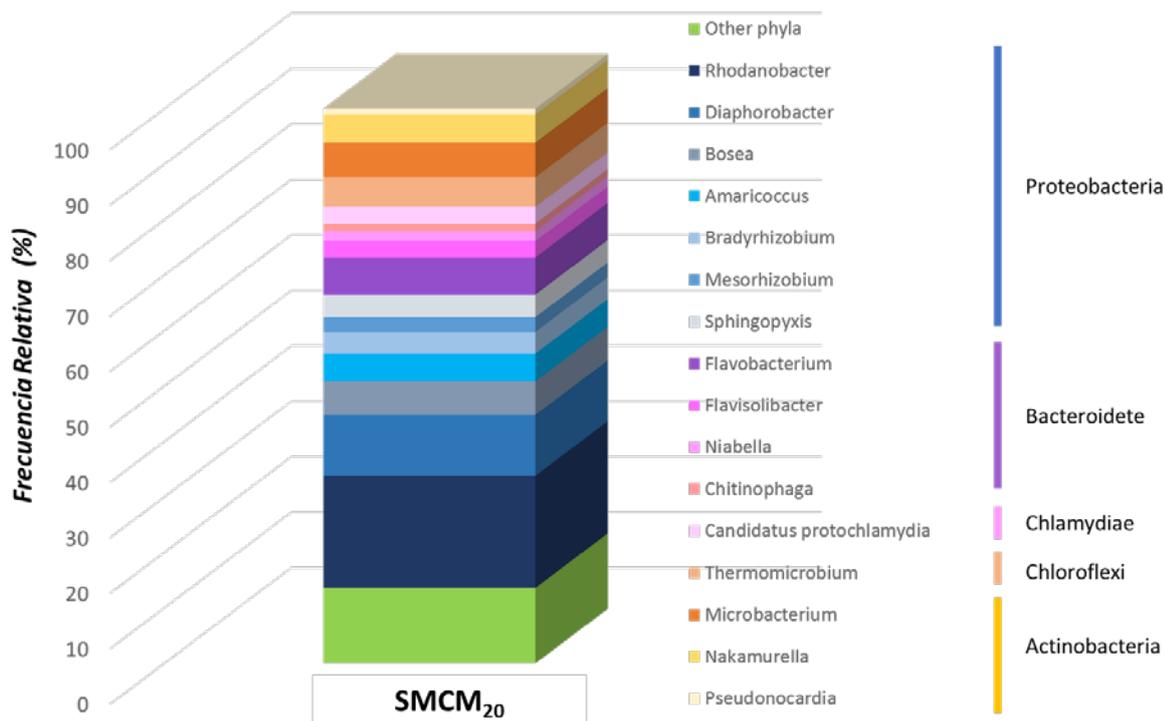


Figura 5.8: Frecuencia relativa de filotipo a nivel de género según lo revelado por la secuenciación Illumina en la condición SMCM₂₀. Los géneros con <1% de lecturas pertenecientes a cada filo se agruparon en "Otros" (Other). Los géneros pertenecientes a otros filios con un <2% de lecturas se agruparon en "Otros filios" (Other phyla).

En la condición MCM₂₀, la frecuencia relativa reveló la presencia de 14 órdenes bacterianos principales, dentro de los cuales se encontraron 27 géneros relevantes. Los filios más abundantes hallados fueron: Bacteroidetes representando un 39% y Proteobacterias un 35% con una proporción similar entre las clases Beta, Alfa y Gamma. En menor proporción se halló Actinobacteria (12%), Planctomycetes y Chloroflexi en un 5% del total cada uno de ellos (Figura 5.9).

En la condición SMCB₂₀ se detectaron 7 órdenes bacterianos con 22 géneros relevantes. Los filios más abundantes fueron similares a los hallados en la condición MCM₂₀. Bacteroidetes representando el 52% y Proteobacterias un 24%, con una proporción similar entre las clases Beta, Alfa y Gamma. Aquí también se halló en menor porcentaje los filios Actinobacterias (14%) y Planctomycetes (6%) (Figura 5.9).

Capítulo 5

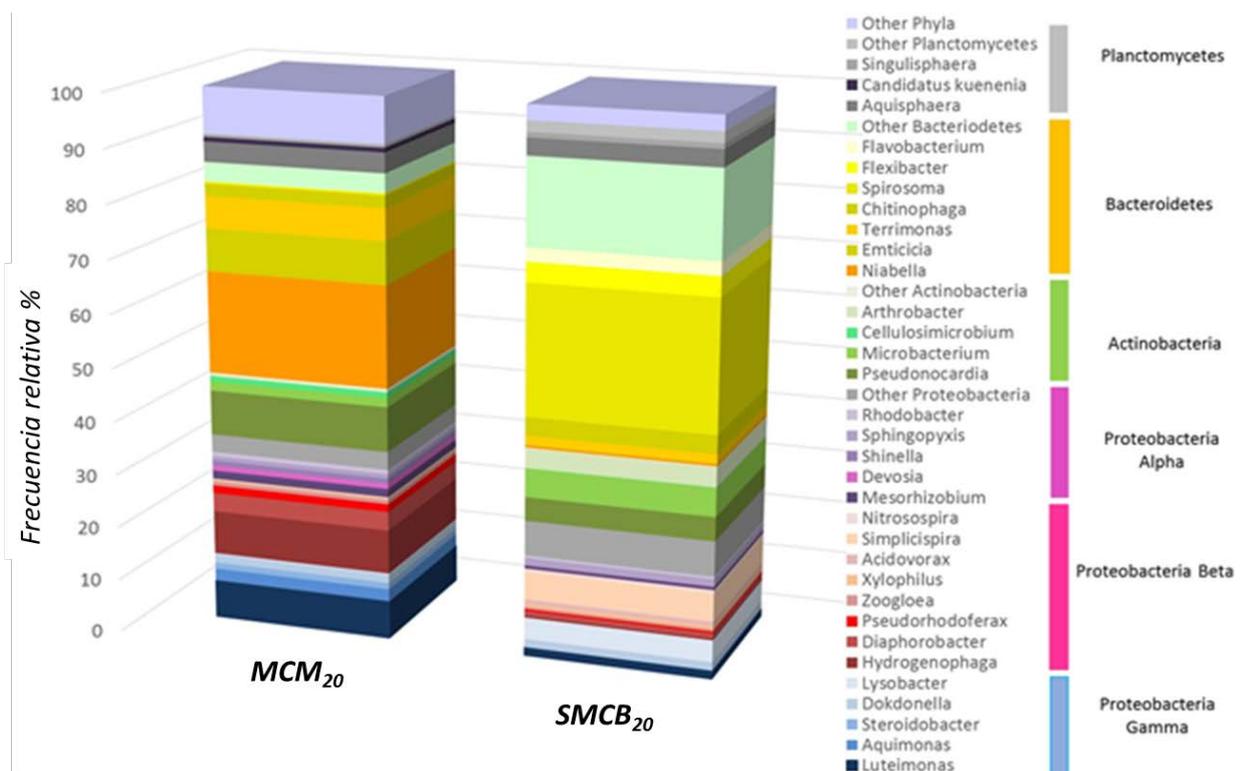


Figura 5.9: Frecuencia relativa de filotipo a nivel de género según lo revelado por la secuenciación Illumina en la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀. Los géneros con <1% de lecturas pertenecientes a cada filo se agruparon en "Otros" (Other). Los géneros pertenecientes a otros fillos con un <2% de lecturas se agruparon en "Otros fillos" (Other phyla).

Dentro del filo Bacteroidetes, el orden más abundante correspondió a Sphingobacteriales en un 27% para la condición MCM₂₀, 16% para la condición SMCB₂₀, y en un porcentaje mucho menor (7.51%) para la condición SMCM₂₀ (Figura 5.10). El orden estuvo dominado por el género *Flavobacterium* en la condición SMCM₂₀ y SMCB₂₀ y el género *Niabella* en la condición MCM₂₀ (18.9%) y SMCB₂₀ (9.6%); sin embargo, *Niabella* también fue hallada, aunque en una menor proporción en SMCM₂₀ (1.8%) respecto a lo detectado en MCM₂₀ (Figura 5.8 y 5.9) Un gran número de las especies pertenecientes al género *Niabella* se han caracterizado como cepas oxidantes de amonio (Khan, y col 2002). *Emticicia* (hallada únicamente en las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀) y *Spirosoma* (especie hallada en las tres condiciones) presentan cepas capaces de llevar a cabo el proceso de reducción de nitratos (Finster y col 2009). Otro de los géneros hallados en este filo en proporción considerable principalmente para la condición MCM₂₀ fue *Terrimonas* en un 5.9%. Este género se caracteriza por presentar especies activas en el ciclo del nitrógeno

Capítulo 5

específicamente en la reducción del nitrato y capacidad de acumulación de polihidroxi butirato (PHB) (Jin y col, 2014). En la condición $SMCB_{20}$ este género se halló en menor proporción (1.65%), mientras que en la condición $SMCM_{20}$ *Terrimonas* se halló en un porcentaje aún menor (0.31 %), que no es considerado relevante para este estudio por presentar abundancia menor a 1% dentro del filo (Figura 5.8 y 5.9).

Flavobacterium, el género más abundante en la condición $SMCM_{20}$ (dentro de Sphingobacteriales) hallado en un porcentaje de 6.7% y poco representativo en las condiciones MCM_{20} y $SMCB_{20}$, hallados en un 0.1% y 2.5% respectivamente, es conocido por tener cepas activas y dominantes en la oxidación de amonio (Horn y col, 2005). Asimismo, este género heterotrófico se ha identificado como BOA, presentando cepas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, principalmente en la desnitrificación, la nitrificación, fijación de nitrógeno y la reducción desasimilatoria de nitrato a amoníaco. *Flavobacterium* se ha identificado como bacteria NHDA (Baskaran y col, 2020).

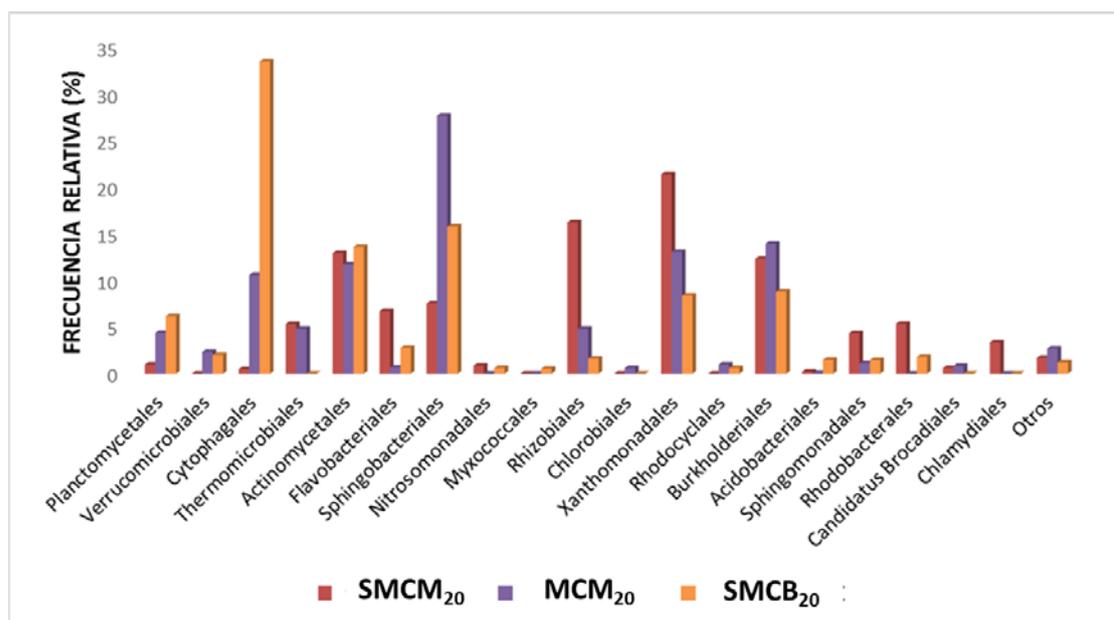


Figura 5.10: Diferencias en la abundancia relativa del filotipo a nivel de orden en las condiciones $SMCM_{20}$, MCM_{20} y $SMCB_{20}$. Para una mejor visualización sólo se muestran las lecturas que representaron más del 2%.

Dentro del orden Sphingobacteriales también se han hallado otros géneros en proporciones considerables. Como similitud en las tres condiciones estudiadas se halló *Chitinophaga* en las siguientes proporciones 1.3 % en la condición $SMCM_{20}$, 2.16% en la

Capítulo 5

condición MCM₂₀ y 3.4% en la condición SMCB₂₀. *Flexibacter* ha sido relevante en la condición SMCB₂₀ (3.6%) y no así las condiciones SMCM₂₀, y MCM₂₀ donde se encontró representando un porcentaje de 0.029% y 0.12% respectivamente. Sin embargo, actualmente no se ha encontrado bibliografía que confirme su participación activa o directa en el proceso de nitrificación. Estudios adicionales con cultivos puros de estos géneros determinarían sus capacidades metabólicas potenciales en el proceso de eliminación de nitrógeno. Por último, en este orden y únicamente en la condición SMCM₂₀ se ha identificado en una proporción considerable (2.95%) el género *Flavisolibacter*, el cual se ha informado que tiene la capacidad de reducir nitrato y/o intermedios como el óxido nítrico y el óxido nitroso (Novinscak y col, 2016).

El orden Cytophagales (Figura 5.10) también perteneciente al filo Bacteroidetes se halló en una proporción importante en las condiciones MCM₂₀ (10.5%) y SMCB₂₀ (33.4%), pero no en la condición SMCM₂₀. Cabe destacar que las bacterias de este orden contienen enzimas involucradas en la reducción de nitrato (Andreote y col, 2016).

Con respecto al Filo Proteobacterias, los órdenes más abundantes hallados fueron: Xanthomonadales, Burkholderiales y Rhizobiales para las tres condiciones (Figura 5.10). El orden Xanthomonadales presente en un 21% en la condición SMCM₂₀, 13% en la condición MCM₂₀ y un 8% en la condición SMCB₂₀, estuvo dominado por los géneros *Aquimonas*, *Dokdonella*, y *Lysobacter*. *Aquimonas* estuvo presente únicamente de manera relevante en la condición MCM₂₀ (2.38%). Respecto a la condición SMCM₂₀ no se encontró y en la condición SMCB₂₀ se halló en una proporción despreciable (0.046%). *Dokdonella* no fue relevante en la condición SMCM₂₀ (0.0029%), pero si en la condición MCM₂₀ (1.6%) y en la condición SMCB₂₀ (1.5%). *Lysobacter* fue relevante en la condición SMCB₂₀, ya que se encontró en un 4%, pero no así en la condición SMCM₂₀ (0.11%) y MCM₂₀ (0.23%) (Figura 5.9). Cabe destacar que estos géneros son reconocidos como microorganismos desnitrificantes para muchas de sus especies (Naushad y col 2015). En la condición SMCM₂₀ este orden estuvo dominado únicamente por el género *Rhodanobacter* (Figura 5.8) en una proporción muy relevante (21%), siendo muy poco relevante en las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀. Resultados previos han indicado que *Rhodanobacter* presenta cepas desnitrificantes (Green y col 2012). Por otro lado, se ha indicado que si bien algunas especies aisladas de *Rhodanobacter* son capaces de desnitrificar por completo (Prakash O y col, 2011), otros estudios han indicado que la actividad desnitrificante podría ser parcial y incompleta (Van den Heuvel y col, 2010). El orden Burkholderiales, el cual posee varios

Capítulo 5

géneros con cepas desnitrificantes capaces de degradar el poli (3-hidroxi-butirato) (Khan y col 2002), estuvo representado en las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀ por *Hydrogenophaga* relevante para la condición MCM₂₀ (8 %) y no así para la condición SMCB₂₀ (0.3%), *Pseudorhodofera* hallada en una mayor proporción para MCM₂₀ (1.4%) respecto a condición SMCB₂₀ (0.35 %), *Simplicispira* predominante en la condición SMCB₂₀ (5.3%) respecto a MCM₂₀ (0.5%) y *Diaphorobacter*. Este último género hallado de forma relevante en las tres condiciones, en la condición SMCM₂₀ en 10.9%, en la condición MCM₂₀ en un 3.5% y en la condición SMCB₂₀ en un 0.93%. Zhang y col 2017 demostraron que el género *Diaphorobacter* presenta muchas especies capaces de llevar a cabo el proceso de nitrificación heterotrófica y desnitrificación aeróbica. Sin embargo, cabe destacar que no todas sus cepas presentan esta capacidad.

Por último, dentro del Filo Proteobacterias, el orden Rhizobiales estuvo dominado en la condición SMCM₂₀ por los géneros *Bosea* (6%) y *Bradyrhizobium* (3.9%) (Figura 5.8). Dandie y col 2007 indicaron que algunas especies de *Bosea* podrían ser capaces de desnitrificar, sin embargo, al no conocerse la vía exacta por la cual realizan dicho proceso, se requeriría de un estudio más minucioso acerca de las vías metabólicas de este género con el objetivo de identificar las especies que presentan la capacidad de desnitrificación. Por otro lado, se ha informado que algunas cepas de los géneros *Bosea* y *Bradyrhizobium* podrían presentar genes capaces de reducir nitrito (Silke Falk y col 2010).

En la condición MCM₂₀ el género más abundante de este orden (Rhizobiales) fue *Mesorhizobium* encontrándose en un 1.5%. Sin embargo, es importante destacar que este género también fue relevante en la condición SMCM₂₀ donde se halló en un 2.67%, pero no así en la condición SMCB₂₀ donde se encontró en un porcentaje mucho menor (0.5%). *Devosia* fue otro de los géneros hallados en la condición MCM₂₀ (1.06%) (Figura 5.8 y 5.9). Este género se halló en porcentajes menor para la condición SMCM₂₀ (0.75%) y más aún para la condición SMCB₂₀ (0.039%). La mayoría de estas especies presentan la capacidad de fijar nitrógeno (Choi y col 2019). *Mesorhizobium* se ha caracterizado como una bacteria con capacidad oxidante de amonio, mientras que *Devosia* presenta la capacidad de nitrificación heterótrofa y desnitrificación aeróbica (Baskaran y col, 2020)

Por su parte el filo Actinobacteria estuvo representado principalmente por el orden Actinomycetales (13% para la condición SMCM₂₀, 12% para la condición MCM₂₀ y 14% para la condición SMCB₂₀), mientras que el filo Planctomycetes estuvo representado mayoritariamente por el orden Planctomycetales en un 4% para la condición MCM₂₀ y 6%

Capítulo 5

para la condición SMCB₂₀ aproximadamente (Figura 5.10). Es importante destacar que el orden Planctomycetales poseen géneros capaces de remover nitrógeno amoniacal mediante el proceso de nitrificación (Boedeker y col, 2019). Dentro de este orden se halló un género, sin bien en baja proporción para SMCB₂₀ y mayor en SMCM₂₀ y MCM₂₀ denominado *Candidatus kuenenia*, el cual posee la capacidad de oxidar de forma anaeróbica el amonio (anammox) mediante el uso de nitrito como aceptor de electrones en condiciones anóxicas, convirtiendo el amoníaco en gas N₂ (Speth y col, 2012).

Es importante destacar que, en este estudio, los géneros representativos de los procesos convencionales de oxidación de amonio y nitrito correspondientes a microorganismos nitrificantes autótrofos (BOA y BON) se han encontrado en porcentajes bajos. Los géneros encontrados para BOA fueron *Nitrosococcus* en un porcentaje de 0.012% para las condiciones MCM₂₀ y SMCM₂₀ y 0.017% para la condición SMCB₂₀ respectivamente, *Nitrosomonas* en 0.105 % para la condición SMCM₂₀, 0.035% para la condición MCM₂₀ y 0.039% para la condición SMCB₂₀. Respecto al género *Nitrospira* fue hallada en un 0.74% en la condición SMCM₂₀, 0.55 % SMCB₂₀ y en porcentajes menores (0.016%) en MCM₂₀. Por último, el género *Nitrosovibrio* fue encontrado en porcentajes aún menores en la condición SMCM₂₀, y no hallado en las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀. Para BON, se encontraron *Nitrospira* y *Nitrobacter*, pertenecientes al orden Nitrosomonadales, con porcentajes inferiores a 0.02% para la condición MCM₂₀ (sólo hallado el género *Nitrobacter*) y 0.042% para la condición SMCB₂₀ respectivamente.

A partir de los datos hallados se obtuvo el porcentaje promedio total correspondiente a BOA y BON para las tres condiciones estudiadas (Tabla 5.7).

Tabla 5.7 Porcentaje de las BOA y BON autótrofas correspondientes a los mecanismos tradicionales de oxidación de amonio y nitrito para las tres condiciones estudiadas.

Análisis estadístico *p< 0.05 y **p> 0.05. (Test de normalidad, Shapiro-Wilk p<0.05).

MICROORGANISMOS (GRUPO METABOLICO)	CONDICIÓN SMCM₂₀	CONDICIÓN MCM₂₀	CONDICIÓN SMCB₂₀
BOA (%)	0.850*	0.063*	0.606*
BON (%)	0.000*	0.020**	0.040**
BOA+BON (%)	0.850*	0.083*	0.646*

Capítulo 5

5.5.2.1 Análisis de diversidad microbiana

La diversidad de una comunidad es una función de dos componentes. Uno de ellos es el número total de especies presentes en la muestra, conocido como riqueza de especies, y el segundo la distribución de los individuos entre las especies, lo que se conoce como equitatividad (Dejonghe y col, 2001). Las comunidades microbianas con un alto nivel de equitatividad son más resistentes a los tóxicos en las aguas residuales, es por este motivo que los consorcios bacterianos presentan una ventaja frente a la utilización de cultivos puros (Bardi y col, 2006). En este estudio se obtuvieron los índices de diversidad y la riqueza de especies de cada condición, a partir de muestras analizadas por duplicado, y representado por el valor promedio del índice de Shannon y las curvas de rarefacción (Figura 5.11), mediante la utilización de técnicas bioinformáticas con el uso del software Microbiome Helper y servidores como QIIME1 y QIIME2. Para la condición SMCM₂₀ el índice fue de 4.86 y para las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀ fue de 4.58, indicando una diversidad genética idéntica para estos dos últimos estudios. Estos valores indican una elevada diversidad, ya que el índice puede encontrarse entre 0.5 y 5 y los valores inferiores a 2 se consideran bajos y superiores a 3 altos (Shannon C, 1948).

Las curvas de rarefacción obtenidas (Figura 5.11) alcanzaron un plateau, lo que demuestra que el número de secuencias recuperadas fue suficiente para representar la diversidad presente en los tres estudios llevados a cabo.

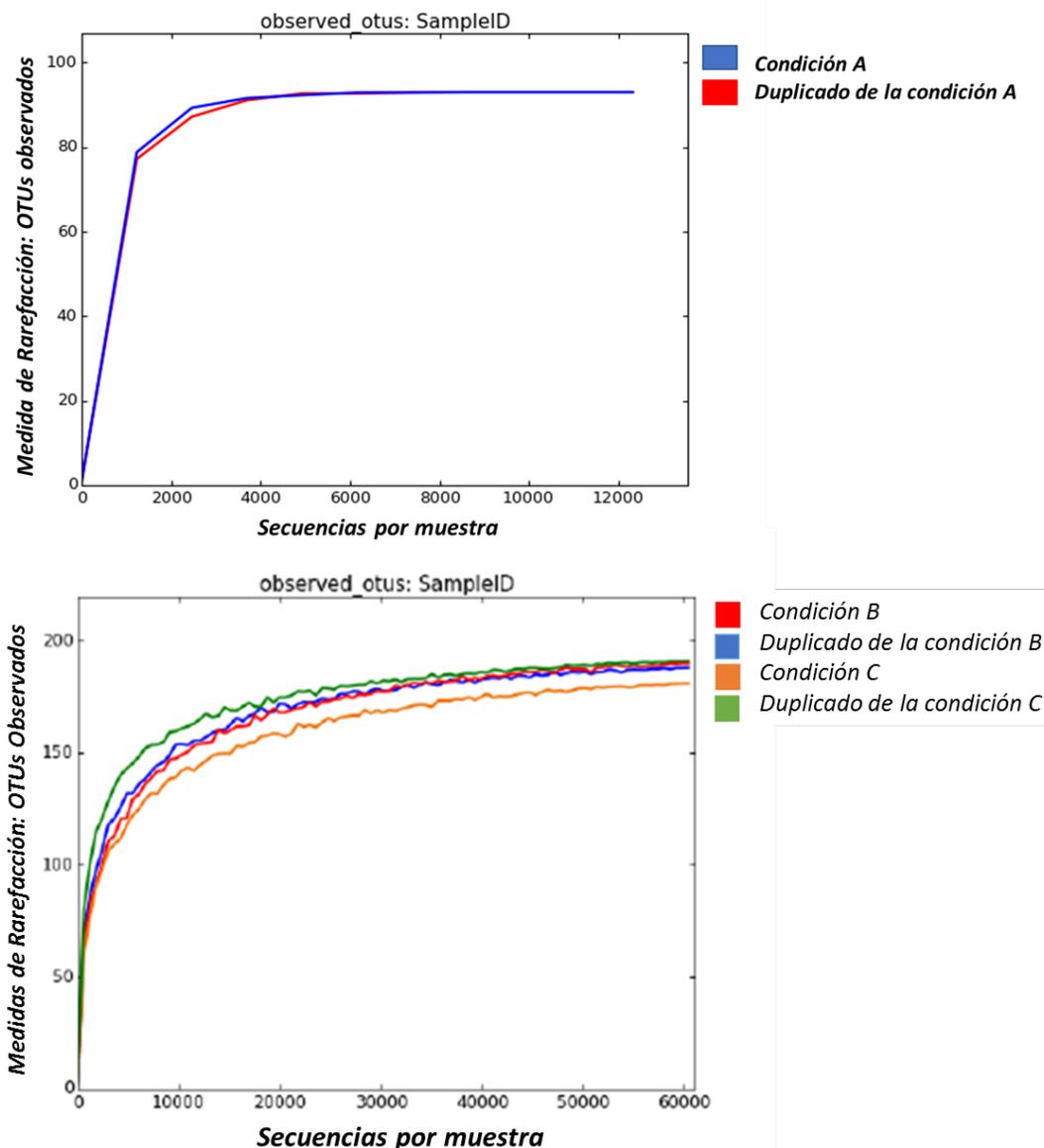


Figura 5.11 Análisis de rarefacción construido utilizando la tubería Qiime1 para el análisis de datos sin procesar. Las curvas de rarefacción indican el número observado de unidades taxonómicas operativas (OTU) (eje y) para las condiciones $SMCM_{20}$ representado como condición A (superior), MCM_{20} representado como condición B (inferior) y $SMCB_{20}$ representado como condición C (inferior) con sus duplicados en función del número de lecturas (eje x)

En el material suplementario se exponen las Tablas completas correspondientes a la abundancia relativa de las bacterias en función de filo, clase, orden y género de cada condición estudiada (Tabla S1-S7).

Capítulo 5

5.5.3 Evaluación de la contribución de las poblaciones bacterianas a los principales procesos biológicos

Tal como se mencionó en el capítulo 2 (sección 2.15.3) a partir de la utilización de PICRUSt se reveló, utilizando la base de datos de Greengenes, la presencia de 50 KEGG ortólogos (KO) que pertenecen a genes funcionales en las OTU bacterianas de géneros encontrados en mayor abundancia, para las tres condiciones, involucrados en las rutas metabólicas de la degradación de nitrógeno inorgánico, fijación de carbono y degradación de carbono (Figura 5.12 y 5.13). En la Tabla 4.2 (capítulo 4, sección 4.6) se ha demostrado las funciones de cada una de las enzimas representadas en términos de KO. Cabe destacar que en las tres condiciones estudiadas se han encontrado diferentes enzimas representadas por KO; sin embargo muchos de estos KO no son demostrados en los gráficos expuestos, debido a que nuestro objetivo ha sido comparar aquellos que se encuentren relacionados principalmente con las rutas objetivo.

Respecto al ciclo del nitrógeno, en la Figura 5.12 se presentan las enzimas más abundantes, representadas por los KO, que están involucradas en la remoción del nitrógeno. Algunas de ellas corresponden a los órdenes más abundantes hallados y representados en la Figura 5.10. Entre estos se destacan: Cytophagales (K00362, K00363, K04561, K00376), Sphingomonadales (K00362, K00363, K00372), Burkholderiales, (K00362, K00363, K00366, K00368, K00370, K00371, K00372, K00374, K00376, K00459, K02305, K04561), Rhodobacterales (K02588, K02591, K00531, K00368, K00371, K00376, K02305, K02588, K04561), Actinomicetales (K00362, K00363, K00366, K00372, K00370, K00371, K00374, K00376), Xanthomonadales Flavobacteriales (K00370, K00371, K00374, K00369) y Rhizobiales (K02586, K02588, K02591, K00531, K00362, K00363, K00366, K00368, K00370, K00371, K00372, K00374, K00376, K02305, K02567, K02568, K02588, K04561).

Capítulo 5

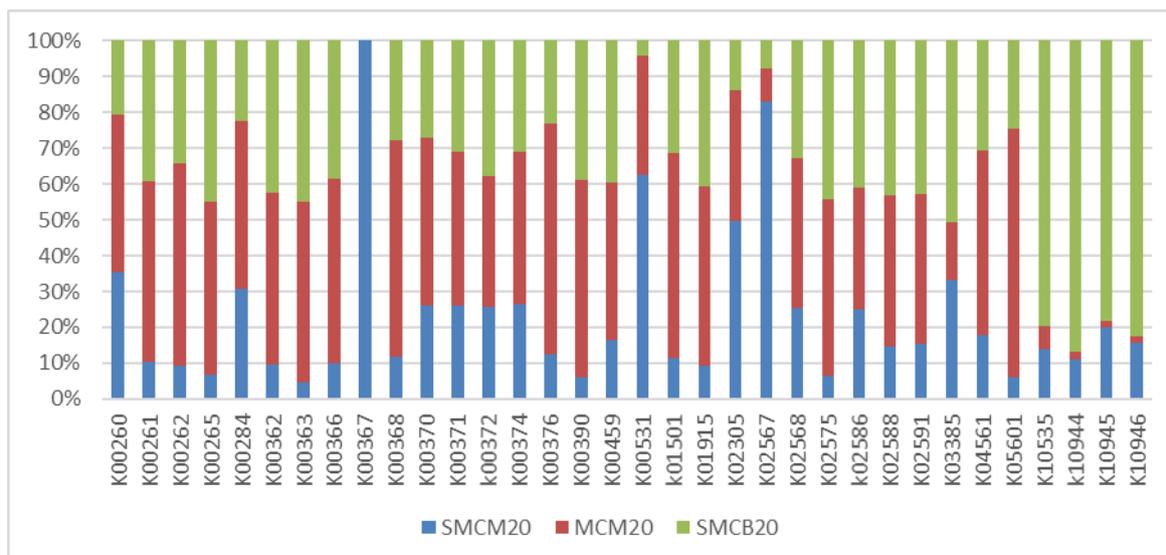


Figura 5.12: Abundancia relativa de los KO implicados en el ciclo del nitrógeno en la condición $SMCM_{20}$ (azul), MCM_{20} (morado) y $SMCB_{20}$ (verde).

Entre los KO relevantes en las tres condiciones, en el ciclo del nitrógeno, K00368 y K00363 representan la enzima nitrito reductasa y los siguientes KO: K00370, K00371, K00374, K02567 y K02568 corresponden a la enzima nitrato reductasa. Asimismo fue posible corroborar la existencia de una enzima que transporta nitrito/nitrato a través de la membrana que corresponde a la KO: K02575 (en especial en condición MCM_{20} y $SMCB_{20}$ pero muy pobre en $SMCM_{20}$). Por otro lado, K02567 representa la enzima nitrato reductasa periplásmica NapA (principalmente encontrada en condición $SMCM_{20}$), la cual posee participación en el proceso de desnitrificación, al igual que la enzima representada por los KO: K04561 y K00376, que corresponden a la reductasa óxido nítrico subunidad B y reductasa óxido nitroso respectivamente, las cuales fueron más abundantes en la condición MCM_{20} y en menor medida en las condiciones $SMCB_{20}$ y $SMCM_{20}$. Por otro lado, la enzima K00367 involucrada en la ruta metabólica de reducción asimilatoria de nitrato fue hallada únicamente en la condición $SMCM_{20}$. Las enzimas representadas por los siguientes KO: K10944, K10945, K10946, K10535, K00368, K04561, K02305, se han informado en el orden Nitrosomonadales. Si bien las mismas fueron halladas en las tres condiciones en estudio, se ha observado una mayor abundancia de K10944, K10945, K10946, K10535 en la condición $SMCB_{20}$. Cabe destacar que K10944 (monoxigenasa amonio subunidad A), K10945 (monoxigenasa amonio subunidad B) y K10946 (monoxigenasa amonio subunidad C) forman parte de las enzimas AMO encargadas de catalizar la oxidación de amonio a

Capítulo 5

hidroxilamina en el proceso de nitrificación. Por su parte K10535 corresponde a una enzima hidroxilamina deshidrogenasa perteneciente al grupo HAO (oxidoreductasa) encargada de catalizar la oxidación de hidroxilamina a nitrito en la nitrificación, mientras que las enzimas K00368, K04561, K02305 son enzimas reductasas que se encuentran involucradas en el proceso de desnitrificación. A través del análisis PYCRUst, la presencia de enzimas claves involucradas en el proceso de nitrificación, en la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀, así como la detección de nitrito y fundamentalmente nitrato, permitieron confirmar que este proceso tuvo lugar en el sistema. Según los estudios anteriormente expuestos respecto a SMCM₂₀, resultó ser la condición que presentó la remoción de nitrógeno más pobre; sin embargo, se han evidenciado mediante análisis bioinformático diferentes enzimas con la capacidad de oxidar amonio y nitrito. Además se ha estimado, mediante balance de masa, una generación apreciable de nitrógeno gaseoso por desnitrificación, lo cual implica generación previa de NO_x por actividad nitrificante. Es necesario mencionar como se ha comentado en el transcurso del trabajo de tesis que PYCRUst permite revelar las enzimas potenciales que podrían ser sintetizadas en la comunidad microbiana, pero no afirma que todas las halladas sean expresadas y por ende funcionales en los grupos de microorganismos. Sin embargo, nos permite confirmar la presencia y relevancia del proceso de nitrificación. En relación con las enzimas relacionadas con el ciclo del carbono (Figura 5.13) se halló la enzima ceramida glucosiltransferasa (K00720), en una considerable proporción en la condición SMCM₂₀, aunque también relevante en las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀. Es importante destacar que en las tres condiciones esta enzima, que interviene en la síntesis de lípidos, se encontró en más de cinco órdenes bacterianos y en más de 12 géneros. La enzima representada por la KO K00626, fue hallada en más de 7 órdenes en cada una de las condiciones estudiadas, se encuentra involucrada en el metabolismo de lípidos y proteínas como así también en la fijación de carbono en procariontes. K00010 fue otra de las enzimas relevantes en las tres condiciones, hallada en diferentes porcentajes en los siguientes órdenes: Rhizobiales, Actinomicetales y Burkholderiales. La misma se encuentra involucrada principalmente en la biosíntesis de metabolitos secundarios, como así también en el metabolismo de carbohidratos.

Capítulo 5

Las enzimas representadas por los KO K01902 y K01903 intervienen en el ciclo de fijación de carbono de procariontas, y fueron encontradas mediante el análisis bioinformático en las tres condiciones en diferentes proporciones y en diversos órdenes (más de cuatro en cada condición) y géneros (más de seis en cada condición). Como se destacó en el Capítulo 4, estas enzimas también se encuentran involucradas en el ciclo del ácido cítrico o tricarboxílico (TCA).

Entre otras de las enzimas detectadas en abundancia en las tres condiciones (siendo mayor en MCM₂₀ y SMCB₂₀) y que presentan participación activa en el ciclo TCA, fijación de carbono en procariontas y biosíntesis de metabolitos secundarios se encontraron las siguientes: K00239, K00240, K00241, K01595 y K01676. La K00024 además de estar involucrada en las rutas metabólicas recientemente mencionadas participa en la oxidación de compuestos carbonados secundarios.

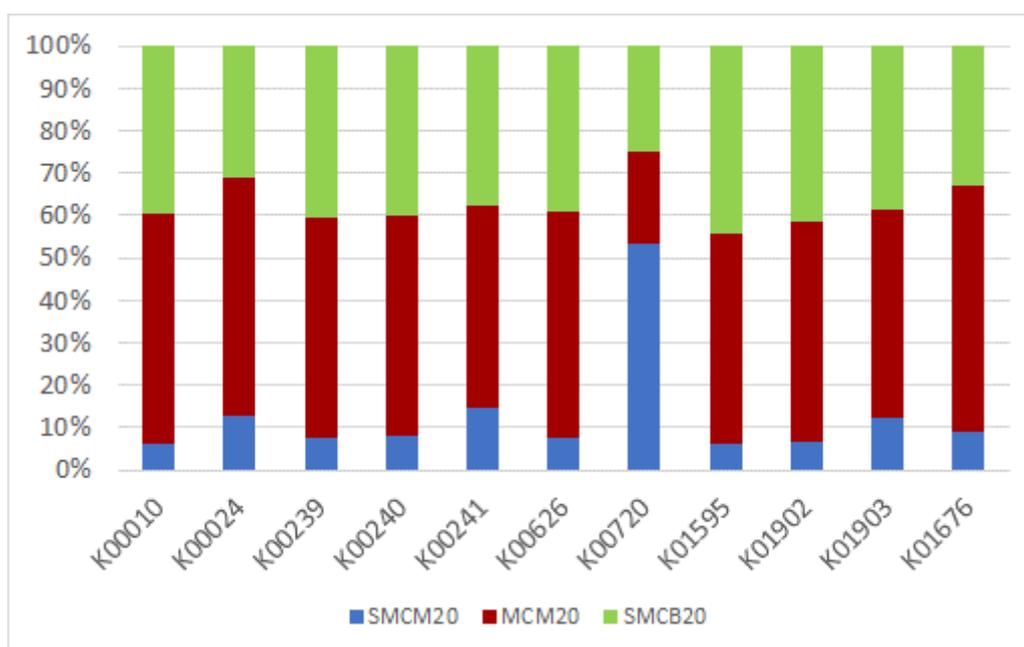


Figura 5.13: Abundancia relativa de los KO implicados en el ciclo del carbono en la condición SMCM₂₀, MCM₂₀ y SMCB₂₀

5.5.4 Caracterización de los procesos biológicos

En base al análisis de KO junto con los resultados presentados en secciones previas (Figuras 5.4, 5.5, 5.6, Tablas 5.5 y 5.6) se determinaron los procesos metabólicos potenciales de las 3 comunidades microbianas.

Capítulo 5

Debe considerarse que todos los sistemas estudiados (condiciones SMCM₂₀, MCM₂₀ y SMCB₂₀) se operaron bajo condiciones de exceso de OD y macronutrientes (N y P), por lo tanto, la competencia entre nitrificantes autótrofos, heterótrofos no nitrificantes (heterótrofos ordinarios) y heterótrofos nitrificantes se dio principalmente por la presencia de los micronutrientes. Sin embargo, también pudo ocurrir competencia por espacio, así como por OD y macronutrientes dependiendo de las condiciones operativas y actividad metabólica de los microorganismos. Otro aspecto relevante es el grado de exposición de los microorganismos al amoníaco libre (FA), el cual es dependiente del tamaño granular, así como la sensibilidad intrínseca de las bacterias autótrofas y heterótrofas frente a dicho compuesto tóxico.

Todas las condiciones estudiadas estuvieron pobremente representadas por la presencia de BOA (<0.9%). Sin embargo, más allá de este porcentaje pequeño, se hallaron diferencias entre las tres condiciones (Tabla 5.7).

Las condiciones SMCM₂₀ y MCM₂₀ difieren únicamente en la presencia de micronutrientes. En SMCM₂₀, los micronutrientes aportados por el suero de queso conducen a una competencia entre las BOA, BON y microorganismos heterótrofos. Los micronutrientes se encuentran en un pequeño porcentaje, por lo cual la disponibilidad es muy baja, llevando a que los procesos metabólicos sean relativamente lentos. Asimismo, esto produce una baja actividad respiratoria, por ende, bajas tasas de crecimiento, favoreciendo el crecimiento de bacterias de crecimiento lento (principalmente microorganismos heterótrofos). Como resultado se genera una mayor síntesis de polisacáridos extracelulares y por ende mayores tamaños de gránulos. Cabe considerar que muchos metales pueden actuar como cofactores enzimáticos que pueden acelerar diferentes reacciones metabólicas (Lopina, 2017). Si bien las BOA son bacterias de lento crecimiento que pudieron estar protegidas en el interior de los gránulos grandes frente a FA en esta condición, sólo representaron el 0.85% de la comunidad microbiana, lo cual pudo ser debido a la fuerte competencia por los micronutrientes, escasos en este estudio. En MCM₂₀, la adición de micronutrientes por un lado aceleró el metabolismo bacteriano y además redujo los fenómenos de competencia por micronutrientes. Esto permitió que se favorezca el crecimiento de bacterias de rápido crecimiento, reduciendo la formación de sustancias poliméricas extracelulares y en consecuencia el tamaño granular. En estas condiciones, si bien se reduce la competencia por micronutrientes (debido al exceso de estos), la abundancia relativa de las BOA disminuyó 10 veces. Esto podría deberse a

Capítulo 5

diferentes fenómenos. Uno de ellos implica que las BOA se encuentren más expuestas a FA por estar agrupadas en gránulos pequeños (10 veces más chicos en comparación con la condición SMCM₂₀); por otro lado, las BOA podrían ser desplazadas por competencia por espacio en gránulos de pequeño tamaño, fenómeno que es más relevante y fuerte en presencia de bacterias de rápido crecimiento que agotan rápidamente los nutrientes y OD en la superficie de los gránulos y microambientes intra-granulares, intensificando de esta forma la competencia por dichos factores de crecimiento entre BOA y heterótrofos.

Cabe destacar que en la condición SMCM₂₀, las BOA estarían protegidas en los gránulos de mayor tamaño (3 mm aproximadamente), quedando menos expuestas a la toxicidad causada por FA.

Al comparar la condición SMCM₂₀ y SMCB₂₀, donde esta última contiene menor carga orgánica, se reduce la competencia entre microorganismos por los diferentes factores de crecimiento (macro y micronutrientes y OD) y espacio. La condición SMCB₂₀ poseía la mitad de la carga orgánica, lo cual conlleva a que se genere la mitad de biomasa heterótrofa, implicando una reducción en la competencia por dichos factores de crecimiento y espacio principalmente entre microorganismos autótrofos y heterótrofos. En la condición SMCB₂₀, si bien hubo una reducción en la competencia microbiana respecto a SMCM₂₀, no se vio favorecido el crecimiento de BOA, ya que este grupo microbiano presentó una abundancia relativa de aproximadamente 30% más baja que en SMCM₂₀. Este efecto posiblemente sea debido a que fue más relevante la toxicidad de FA en los gránulos pequeños formados en esta condición, lo cual llevó a que la abundancia relativa baje ligeramente. En esta condición (SMCB₂₀) es muy probable que los micronutrientes del suero hayan estado más biodisponibles, considerando que prácticamente la totalidad del suero de queso se encontraba en forma soluble (sección 5.5.1.2); por lo tanto la combinación entre los fenómenos reducción de competencia y mayor biodisponibilidad de micronutrientes hayan favorecido el crecimiento de bacterias de rápido crecimiento, generando menor SPE y en definitiva menor tamaño granular. En consecuencia, en SMCB₂₀, al igual que en MCM₂₀, las BOA están más expuestas a FA en gránulos pequeños respecto a SMCM₂₀.

La abundancia relativa de BOA no permite explicar las diferencias observadas en las capacidades de nitrificación de las tres condiciones experimentales estudiadas. El incremento de la actividad nitrificante en condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀ fue debido a la proliferación de heterótrofos nitrificantes. Cabe destacar que la nitrificación heterótrofa es

Capítulo 5

un proceso energéticamente desfavorable, que no sería favorecido en situaciones de fuerte competencia microbiana. La reducción de la competencia por adición de micronutrientes y reducción de la carga orgánica, en condiciones MCM_{20} y $SMCB_{20}$ respectivamente, pudieron favorecer el proceso de nitrificación heterótrofa. Por último, podría suceder que en gránulos más pequeños, los microorganismos se encuentren más expuestos a FA, lo cual conduciría a que se incremente la abundancia de heterótrofos con capacidad de eliminar amonio por nitrificación, actuando como mecanismo de detoxificación.

De esta forma se puede concluir inicialmente que la adición de micronutrientes favorecería principalmente a los nitrificantes heterótrofos, mejorando el proceso de nitrificación y de esta manera disminuyendo la toxicidad de FA, lo cual favorecería además la remoción de DQO por la actividad heterótrofa.

Por otro lado, la presencia de BOA autótrofos y ausencia de BON en condición $SMCM_{20}$ nos indica que hubo nitrificación parcial. Sin embargo, la ausencia de acumulación de nitrito puede implicar dos posibilidades: una de ellas la posible desnitrificación o bien la oxidación mediante la presencia de nitrificantes heterótrofos, seguida de un proceso de desnitrificación posterior e inmediato.

Observando la predicción obtenida y representada en la Figura 5.14 se puede apreciar que los procesos relacionados con la nitrificación son menores en la condición $SMCM_{20}$. Este resultado es esperable ya que en la Figura 5.4 no se observa la producción de nitrato y nitrito en esta condición. Por otro lado, la condición $SMCB_{20}$ presentó menores valores que la condición MCM_{20} , lo cual puede ser debido a una menor disponibilidad de micronutrientes en la condición $SMCB_{20}$. En estas condiciones, donde se observó nitrificación eficiente (MCM_{20} y $SMCB_{20}$), la nitrificación autótrofa convencional por bacterias oxidantes de amonio (BOA) y bacterias oxidantes de nitrito (BON) estuvo pobremente representada según lo determinado por el análisis microbiano llevado a cabo. Particularmente se observó muy baja abundancia relativa de BOA en la condición MCM_{20} y de BON en ambas condiciones (Tabla 5.7). Esto condujo a suponer que la oxidación de amonio hasta nitrato, principalmente en la condición MCM_{20} , se atribuyó casi exclusivamente al proceso de nitrificación por microorganismos nitrificantes heterótrofos. En relación a este análisis debe destacarse que al menos dos géneros (*Niabella* y *Diaphorobacter*), con capacidad nitrificante potencial, presentaron abundancia significativa en ambas condiciones (MCM_{20} y $SMCB_{20}$). *Niabella* es un género que tiene una participación muy activa en el proceso de remoción de nitrógeno, destacándose

Capítulo 5

particularmente su acción en la reducción asimilatoria de nitrato y en la oxidación de amonio. Este género estuvo representado por el K000366 en estos sistemas según el análisis predicho por PYCRUst. K00366 representa una enzima reductasa nitrito, que no se limita únicamente al género *Niabella* sino que también puede estar presente en otros géneros. Como se comentó en el Capítulo 4, sección 4.7, *Diaphorobacter* es considerado un género con capacidad potencial de NHDA como así también involucrado en la síntesis de PHB.

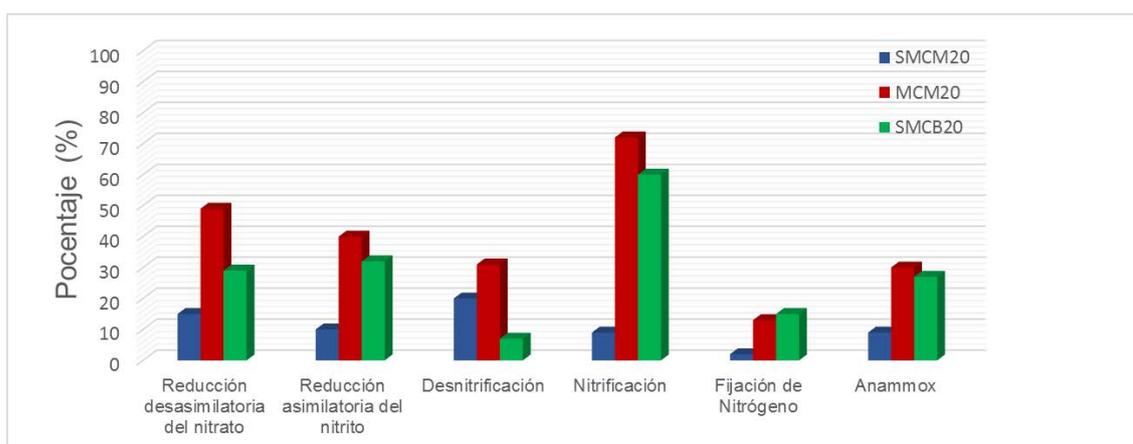


Figura 5.14: Abundancia de las bacterias funcionales en los procesos de remoción de nitrógeno detectados en las condiciones SMCM₂₀, MCM₂₀ y SMCB₂₀

En la Figura 5.14 también se puede observar que las bacterias que pueden llevar a cabo el proceso Anammox se hallaron con mayor abundancia en las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀, lo cual coincide con la formación y detección de nitrito en estos sistemas, en contraste con la condición SMCM₂₀ donde este compuesto nitrogenado casi no fue detectado en el reactor. Tanto la reducción asimilatoria de nitrato como la desasimilatoria de nitrato también estuvieron presentes en los tres sistemas, siendo más relevante en la condición MCM₂₀, resultado que se relaciona con la predicción obtenida para esta condición, la cual presenta mayor abundancia de microorganismos encargados de remover nitrógeno por diferentes procesos. Respecto al proceso de desnitrificación, se ha observado que el mismo tuvo lugar en los tres sistemas estudiados. Este proceso pudo verse favorecido por la elevada concentración de OD y la baja relación de DQO/NO₃⁻-N (Cap. 4, sección 4.7), particularmente en las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀, favoreciendo a los microorganismos nitrificantes aeróbicos. Esto llevaría a pensar que este proceso sería

Capítulo 5

el principal responsable de la reducción de nitrato y/o nitrito para dichas condiciones. Tal como se observa en la Tabla 5.5 y 5.6, fue más relevante en la condición MCM₂₀ respecto a la condición SMCB₂₀, lo cual coincide con la menor producción en esta última condición de reservas de carbono intracelulares utilizadas por los microorganismos para desnitrificar.

La fuente de carbono utilizada, suero de queso, contenía alto contenido de lactosa hidrolizada y fue almacenada principalmente como glucógeno (reserva de carbono intracelular) en la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀, siendo la acumulación de PHA pobre. Tal como se mencionó recientemente, la acumulación de glucógeno fue mayor en la condición MCM₂₀ respecto a la SMCB₂₀, lo cual coincide nuevamente con lo esperado, ya que la primera condición mencionada tenía el doble de la carga orgánica que la condición SMCB₂₀. Estos resultados fueron traducidos en lo observado para el proceso de nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS), el cual fue relevante en la condición MCM₂₀, donde las reservas intracelulares se utilizaron como fuente de carbono para la desnitrificación aeróbica, y en conclusión para lograr una mejora en la remoción de nitrógeno inorgánico. Respecto a la condición SMCB₂₀ se observó que la desnitrificación fue pobre, lo que podría deberse a la carga orgánica relativamente baja, conduciendo a una baja remoción de nitrógeno inorgánico (Tabla 5.5).

Las bacterias pertenecientes al filo Planctomycetes podrían haber contribuido a la remoción de amonio, ya que representaron aproximadamente el 5% del total de la comunidad microbiana en las condiciones MCM₂₀ y SMCB₂₀. Los géneros más representativos de este filo fueron *Singulisphaera* y *Aquisphaera*. Según se ha informado *Singulisphaera* es uno de los géneros más importantes en el proceso ANAMMOX (Tian y col, 2015; Kulichevskaya y col, 2011). *Aquisphaera* se encuentra involucrada en diferentes vías de remoción de amonio, entre las que se destacan: la reducción desasimilatoria de nitrato catalizando la reducción de nitrito a amonio, la reducción asimilatoria de nitrato (involucrada en la conversión de nitrato a nitrito), en la desnitrificación (catalizando la formación de óxido nitroso a partir de óxido nítrico) y en la nitrificación mediante la formación de nitrito (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Otro género involucrado en la ruta ANAMMOX fue *Candidatus kuenenia*, el cual fue muy abundante en la condición MCM₂₀, aunque menor en las otras dos condiciones estudiadas.

Al comparar la condición SMCM₂₀ con las restantes se pudo observar que el orden planctomycetes así como los nitrificantes heterótrofos se hallaron en menores porcentajes.

Capítulo 5

Por ejemplo, *Singulisphaera* y *Aquisphaera* fueron muy poco relevantes en la condición SMCM₂₀.

Otro de los géneros destacados fue *Zoogloea*, el cual se caracteriza por estar involucrado principalmente en los procesos de remoción de nitrógeno mediante el proceso de desnitrificación aeróbica. Sin embargo, cabe destacar que *Zoogloea* presenta también función activa en la reducción desasimilatoria de nitrato.

Es preciso mencionar que se identificaron numerosos géneros en las condiciones estudiadas, de los cuales no se ha encontrado bibliografía que esté directamente relacionada con el proceso de nitrificación-desnitrificación o fijación de nitrógeno.

Muchos microorganismos con capacidad de nitrificación heterotrófica y desnitrificación aeróbica (NHDA) han sido seleccionados y aplicados a sistemas biológicos de eliminación de nitrógeno que exhiben un mayor rendimiento de eliminación de nitrógeno (Yao y col 2013). Sin embargo, se requiere un mayor número de estudios para la implementación confiable del proceso NDS, basado en nitrificación heterotrófica y desnitrificación aeróbica, para la eliminación biológica de nitrógeno.

5.5.5 Alternativas para mejorar la remoción de nitrógeno inorgánico o el proceso de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS)

Concluido el estudio de las tres condiciones previas se propuso evaluar otros parámetros con el fin de optimizar el proceso de remoción de N inorgánico ya sea mejorando la remoción de amonio, mediante nitrificación o crecimiento heterótrofo, y/o el proceso NDS. Para ello se estudiaron tres nuevas condiciones experimentales MCM₁₀, MCA₂₀ y MCANB₂₀ (Tabla 5.2 y 5.3).

Cada condición propuesta se llevó a cabo con un objetivo determinado. En la condición MCM₁₀ se redujo el TRC a 10 días con el fin de tener biomasa con mayor actividad metabólica y así favorecer la cinética de los procesos de nitrificación y desnitrificación y mejorar de esta forma la remoción de nitrógeno inorgánico (amonio + formas oxidadas de nitrógeno). Esto se basó en que la velocidad de crecimiento microbiano es inversamente proporcional al TRC, entonces a menor TRC se aceleran todos los procesos metabólicos incluyendo respiración y crecimiento. En base a este análisis, se supuso que a menor TRC, aumentaría la velocidad de nitrificación y quedaría más tiempo disponible para que tenga lugar el proceso de desnitrificación, conduciendo a

Capítulo 5

una mejora de la eficiencia de remoción de nitrógeno inorgánico. En la condición MCA₂₀, se mantuvo el TRC a 20 días, al igual que las condiciones SMCM₂₀, MCM₂₀ y SMCB₂₀, y se incrementó la carga orgánica con el objetivo de aumentar la DQO y la relación DQO:NTK. Este estudio fue propuesto considerando que este aumento podría favorecer el crecimiento de los microorganismos heterótrofos y en consecuencia la remoción de amonio asociado al crecimiento y la disponibilidad de DQO para que se produzca una eficiente desnitrificación ya sea mediante la fuente de carbono exógeno o bien mediante las reservas de carbono almacenadas. Esto permitiría en consecuencia mejorar la remoción de las formas oxidadas de nitrógeno. Finalmente, se evaluó una última condición MCANB₂₀, donde a diferencia de la condición MCA₂₀, se redujo la carga de nitrógeno implicando un incremento adicional de la relación de DQO:NTK y una reducción de la carga tóxica de amonio.

5.5.5.1 Estabilidad de las condiciones: MCM₁₀, MCA₂₀ y MCANB₂₀

La biomasa granular estabilizada en la condición MCM₂₀ (la cual fue la mejor condición en relación a la remoción de nitrógeno inorgánico) fue la que se utilizó como inóculo en las condiciones MCM₁₀, MCA₂₀, y MCANB₂₀. Las condiciones MCM₁₀ y MCA₂₀ presentaron gránulos con morfología similar a la observada en la condición MCM₂₀, con una forma esférica casi regular, mientras que la condición MCANB₂₀ permitió la formación de gránulos de mayor tamaño. El tamaño promedio del gránulo de cada una de estas condiciones se puede observar en la Tabla 5.8. Asimismo, las tres condiciones presentaron muy buenas propiedades de sedimentación con un índice de sedimentabilidad volumétrico (ISV) por debajo de los 30 mL.g ST⁻¹ (Tabla 5.8).

Tabla 5.8: Concentración de la biomasa expresada como ST (g.L⁻¹), tamaño granular e ISV para las condiciones MCM₁₀, MCA₂₀ y MCANB₂₀.

<i>SBR</i> _{SQ}	Condición MCM₁₀	Condición MCA₂₀	Condición MCANB₂₀
ST (g.L⁻¹)	2.6 (0.3)	2.5 (0.41)	3.1 (0.9)
Tamaño granular (mm)	0.28	0.28	0.7
ISV (mL. g ST)⁻¹	19	18	29

Capítulo 5

En relación a la concentración de biomasa, expresada como ST y expuestas en la Tabla 5.8, cabe destacar que se mantuvo constante a lo largo de los TRC transcurridos para cada una de las condiciones ensayadas.

Para poder estimar en estas condiciones la cantidad de N utilizado por los microorganismos para crecimiento, nitrificación y desnitrificación se llevó a cabo un balance de masa. El nitrógeno gaseoso (N_G , mg N.L⁻¹) generado por desnitrificación fue estimado mediante la siguiente expresión:

$$N_G = \Delta(NTK) - \Delta(NO_X - N) - \Delta(NTK_X) \quad (5.13)$$

donde $\Delta(NTK)$ es la cantidad de NTK removido ($\Delta(NTK) = \Delta(NH_3-N) + \Delta(N_{ORG})$, mg N.L⁻¹), $\Delta(NO_X-N)$ corresponde a las formas oxidadas de N generado por nitrificación ($\Delta(NO_X-N) = \Delta(NO_2^- - N) + \Delta(NO_3^- - N)$, mg N.L⁻¹) y $\Delta(NTK_X)$ es la cantidad de NTK usado para crecimiento microbiano (mg N.L⁻¹) a lo largo de cada ciclo operativo. $\Delta(N_{ORG})$ fue estimado como $0.22 \cdot \Delta(NH_3-N)$ como fue determinado en la sección 5.5.1.3.2 del presente capítulo. $\Delta(NTK_X)$ es equivalente a la cantidad de N de biomasa removido del reactor, bajo condiciones estables, mediante la purga de la biomasa. De esta forma, $\Delta(NTK_X)$ (mgN.L⁻¹) fue estimada como sigue:

$$\Delta(NTK_X) = \left(\frac{1}{a} y_{N/X} + b X_A V_P \right) / V \quad (5.14)$$

donde X_A es la concentración de biomasa activa (mg X_A.L⁻¹), la cual es determinada a partir de la diferencia entre SSV (mg SSV.L⁻¹) y la cantidad total de reservas de glucógeno (mg glucosa.L⁻¹) al final de la fase de reacción, a es el parámetro que corresponde a 24.6 mg X_A.C-mmol⁻¹ asumiendo la fórmula elemental de biomasa (CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}), $y_{N/X}$ es el coeficiente estequiométrico que relaciona el contenido de N y C de la biomasa (0.2 mmol N.C-mmol X⁻¹, para CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}), el parámetro b corresponde a 14 mg N.mmol N⁻¹, V_P es el volumen de purga de biomasa (L) por cada ciclo operativo y V es el volumen de trabajo del reactor (1 L).

Cabe destacar que la cantidad de reservas de carbono intracelular al final de la fase de reacción aeróbica puede considerarse despreciable ya que el glucógeno generado en

Capítulo 5

fase “feast” es degradado en fase “famine” como se ha explicado y detallado en la sección 5.5.1.2 (Figuras 5.5 y 5.6).

Por otra parte, el %NDS fue calculado según la ecuación 5.12, con la salvedad que la cantidad de NTK oxidado por actividad nitrificante ($\Delta(\text{NTK})_{\text{OX}}$) ha sido obtenido mediante la siguiente ecuación: $\Delta(\text{NTK}) - \Delta(\text{NTK}_x) = \Delta(\text{NTK})_{\text{OX}}$.

En la figura 5.15 y 5.16 (A y B) se observan los perfiles de remoción y generación de los diferentes compuestos nitrogenados, como así también de carbono orgánico expresado como DQOs para las condiciones MCM_{10} y MCA_{20} .

A partir de las consideraciones recientemente expuestas se han podido realizar los balances correspondientes. Inicialmente al comparar MCM_{20} , la cual había sido hasta el momento la condición que había presentado mayor eficiencia en remoción conjunta de nitrógeno y carbono, con MCM_{10} (Figura 5.15 A y B), las cuales diferían únicamente en el TRC empleado, se observó que las remociones mediante NDS no diferían considerablemente. Sin embargo, MCM_{20} presentó mayor eficiencia en la remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$ y NTK observada en el ciclo. No obstante, la remoción de nitrógeno inorgánico fue ligeramente mayor en MCM_{10} (Tabla 5.5 y 5.9).

Al comparar las condiciones MCM_{20} y MCA_{20} , las cuales diferían únicamente en la carga orgánica, se observó que la condición MCA_{20} presentó mejores eficiencias de remoción de nitrógeno inorgánico y NDS, probablemente debido a que el aumento de la carga orgánica favoreció la actividad desnitrificante impulsada por la oxidación de las reservas intracelulares. En relación a la remoción de NTK, se ha observado que la condición MCM_{20} presentó una eficiencia superior a la condición MCA_{20} , debido posiblemente a que esta última presentó una carga volumétrica de N orgánica superior asociada a la mayor carga de suero (Tabla 5.5 y 5.9). Sin embargo, en esta condición (MCA_{20}) se observó una mejora significativa en la remoción de NTK respecto a la condición MCM_{10} (Tabla 5.9).

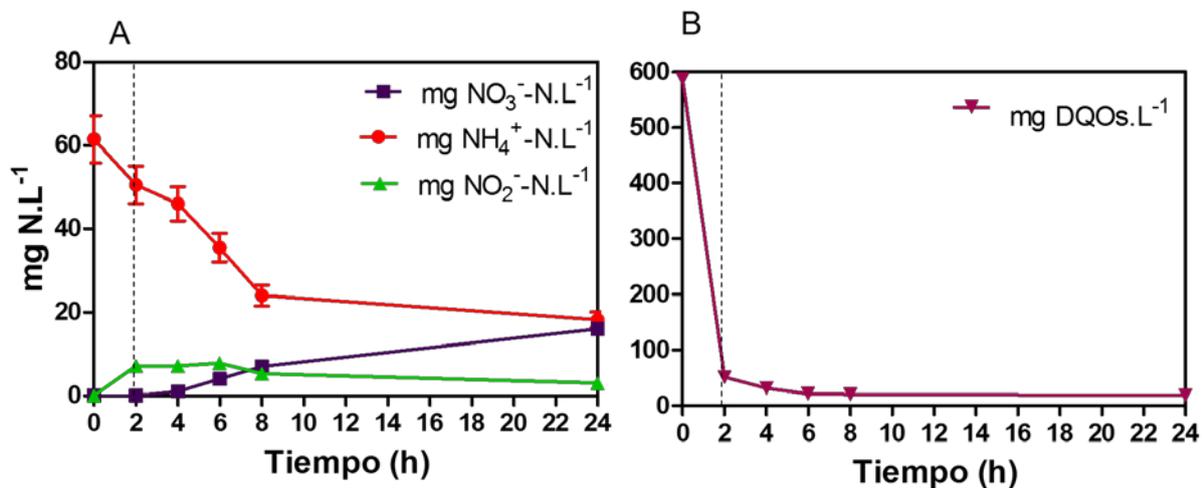


Figura: 5.15: Cambios en las concentraciones de las diferentes formas de nitrógeno inorgánico (A) y de carbono orgánico (B, suero de queso, DQOs), a lo largo de un ciclo operativo del reactor en condiciones de estado estable de la condición MCM_{10} . DQOs (\blacktriangledown), NH_4^+-N (\bullet), $NO_3^- -N$ (\blacksquare), $NO_2^- -N$ (\blacktriangle)

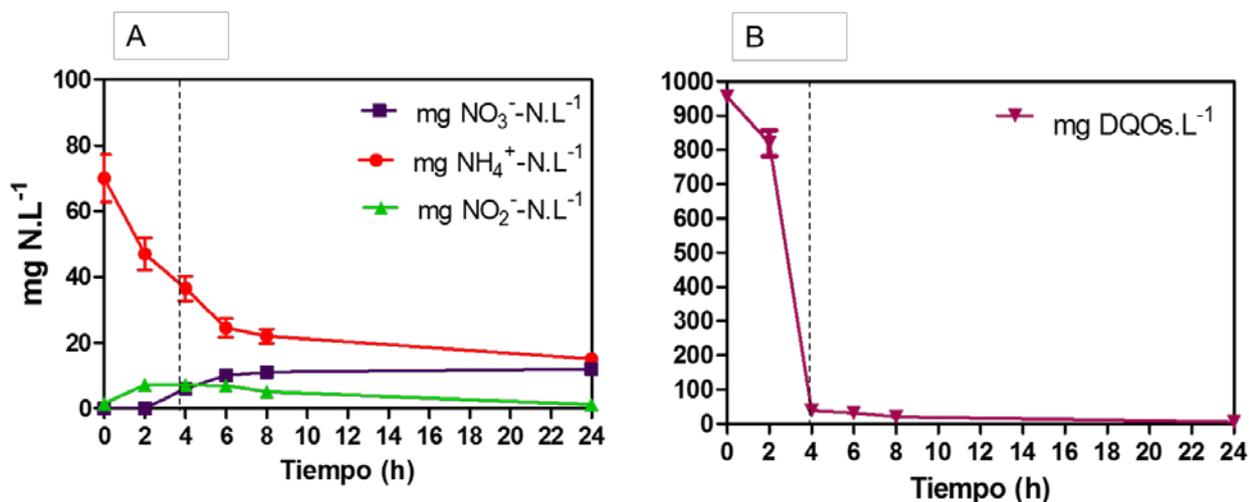


Figura.5.16: Cambios en las concentraciones de carbono orgánico (suero de queso, DQOs) y las diferentes formas de nitrógeno inorgánico a lo largo de un ciclo operativo del reactor en condiciones de estado estable de la condición MCA_{20} . DQOs, (\blacktriangledown), NH_4^+-N (\bullet), $NO_3^- -N$ (\blacksquare), $NO_2^- -N$ (\blacktriangle).

Capítulo 5

Tabla: 5.9: Eficiencia de la remoción de las diferentes formas de nitrógeno para las condiciones MCM₁₀, MCA₂₀, y MCANB₂₀. Estudio estadístico *p< 0.05 y **p> 0.05 (Test de normalidad, Shapiro-Wilk p<0.05)

	Parámetros	Condición MCM ₁₀	Condición MCA ₂₀	Condición MCANB ₂₀
Ciclo total	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N	67 (7.2)**	74 (8.8)**	98 (8.7)*
	% Remoción de NTK	67 (6.4)*	78 (6.2)*	100*
	% Remoción de N inorgánico	54 (4.5)**	55 (4.1)**	76 (8.0)*
	% Remoción de NTK (nitrificación)	81 (5.9)**	68 (7.1)*	73 (9.4)**
	% Remoción de NTK (Crecimiento heterótrofo)	19 (1.1)*	32 (3.2)**	27 (2.9)**
	%NDS	52 (5.7)**	60 (7.1)**	68 (8.3)*
	N _G (mg.L ⁻¹)	23 (1.7)*	37 (3.9)**	32 (4.3)**
	%N desnitrificado	32 (3.3)*	53 (3.9)*	40 (4.5)*

Debido a que con estas nuevas condiciones no se obtuvo una mejora simultánea en la remoción de NTK y nitrógeno inorgánico, se necesitó impulsar la búsqueda de una nueva alternativa para obtener una condición que mejore las remociones obtenidas hasta el momento. A partir de esto se propone una nueva alternativa de estudio con una relación DQO:NTK mayor que las estudiadas a la que se le denominó MCANB₂₀. Esta nueva condición contenía la misma carga orgánica que MCA₂₀ pero menor carga de nitrógeno, y se obtuvo reduciendo la carga volumétrica de nitrógeno amoniacal como se presentó en Tabla 5.2.

Se puede observar en la Figura 5.17 A, que los resultados obtenidos con esta última condición MCANB₂₀ lograron ser mucho más exitosos. Se obtuvo una remoción muy elevada de nitrógeno amoniacal (98%) y una remoción completa de NTK (100%), con una eficiencia significativa en la remoción de nitrógeno inorgánico (76%, Tabla 5.9). Asimismo, se logró una remoción del carbono orgánico (DQOs) considerable durante el período “feast” completándose la misma a las 8 horas de comenzado el ciclo (Figura 5.17 B). Cabe destacar que las remociones de carbono orgánico medido como DQOs fueron completas (100%) en todas las condiciones estudiadas (Figura 5.4, 5.5, 5.6, 5.15, 5.16 y 5.17).

Capítulo 5

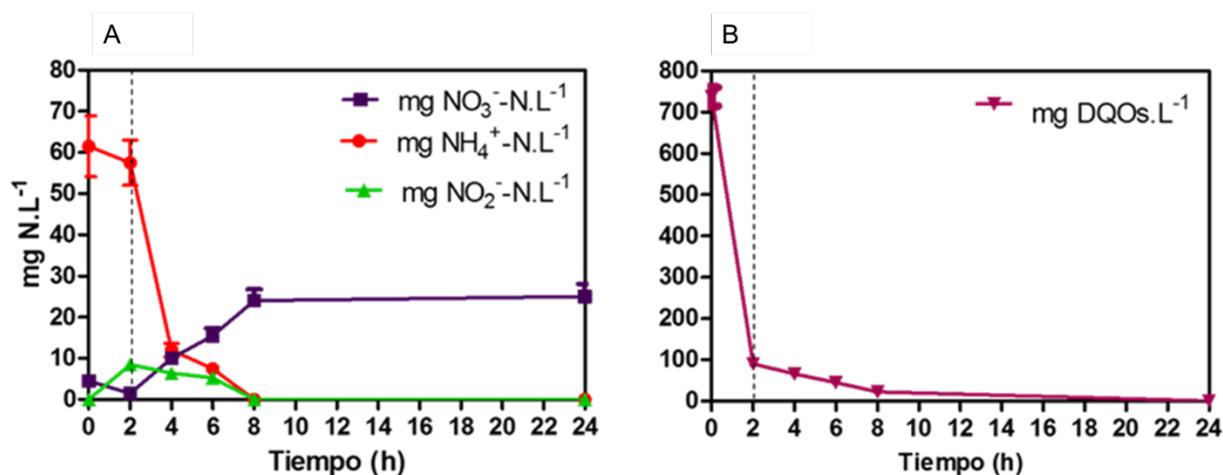


Figura 5.17: Cambios en las concentraciones de carbono orgánico (suero de queso, DQOs), y las diferentes formas de nitrógeno inorgánico a lo largo de un ciclo operativo de los reactores en condiciones de estado estable de la condición MCANB₂₀. DQOs, (▼), NH₄⁺-N (●), NO₃⁻-N (■), NO₂⁻-N (▲)

5.5.6 Análisis del efecto de la relación DQO/NTK sobre la eficiencia de remoción de amonio, NTK y nitrógeno inorgánico

En la Figura 5.18 se puede observar que a medida que se incrementa la relación DQO:NTK estudiada para las diferentes condiciones, aumenta la eficiencia de la remoción de nitrógeno inorgánico (Ni). Asimismo, puede observarse que el porcentaje de NDS también incrementa en función de la relación DQO:NTK. Cabe destacar que estos resultados se atribuyen al mayor crecimiento/actividad de la biomasa desnitrificante que tiene lugar a medida que aumenta la relación DQO:NTK.

La última condición estudiada (MCANB₂₀), con adición de micronutrientes, relación elevada de DQO:NTK (100:7.33) y TRC de 20 días, resultó la mejor condición experimental en términos de la capacidad de remoción conjunta de nitrógeno y carbono.

Estos estudios permitieron observar que la adición de nitrógeno amoniacal a efluentes basados en suero de queso, deficientes en NTK, junto a la adición de micronutrientes permitió favorecer el crecimiento de microorganismos nitrificantes. Además, se ha observado que elevadas relaciones de DQO:NTK favorecen la actividad desnitrificante.

Capítulo 5

La contribución de estas condiciones es lo que condujo a una elevada eficiencia de remoción de N. La combinación de estas condiciones experimentales constituye una buena alternativa para lograr eficiencias elevadas en la remoción de nitrógeno y carbono en este tipo de aguas residuales.

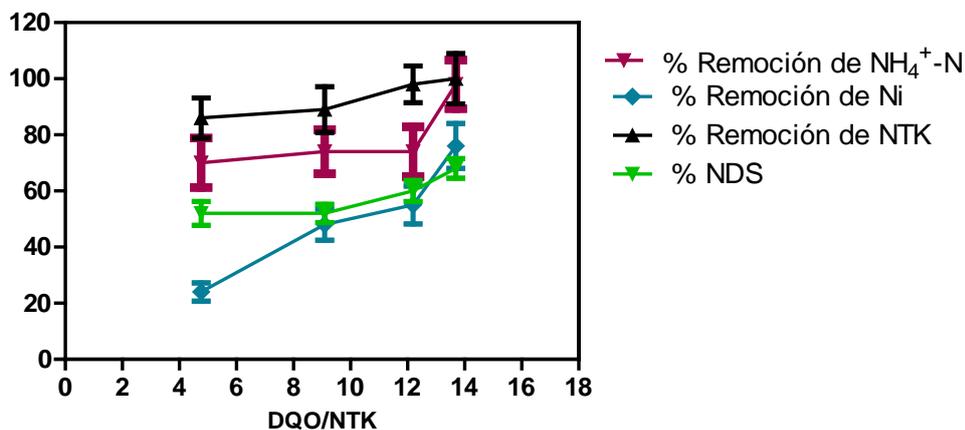


Figura 5.18: Relación DQO:NTK en función de la remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, Ni, NTK y NDS

En relación a la figura 5.18 cabe destacar que para la relación DQO: NTK= 8.6 (Condiciones SMCM₂₀, MCM₂₀ y MCM₁₀) se incluyó aquella condición con mayor remoción de NTK y amonio (MCM₂₀).

5.6 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

Los efluentes lácteos se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno para ser tratados mediante métodos biológicos. En este trabajo de tesis un efluente sintético modelo de la industria láctea, basado en suero de queso en polvo como fuente de carbono y energía, se complementó con amoníaco para estudiar diferentes condiciones experimentales definidas por la relación DQO:NTK junto a la presencia y/o ausencia de micronutrientes con el objetivo de hallar los mejores escenarios para el tratamiento biológico en la remoción conjunta de nitrógeno y carbono orgánico.

Capítulo 5

Se ha demostrado la eficiente eliminación simultánea de carbono orgánico y nitrógeno total Kjeldahl (NTK) en reactores discontinuos secuenciales (SBR) granulares aerobios, a escala de laboratorio, alimentados con las aguas residuales lácteas modificadas. Se ha observado que en todas las condiciones estudiadas tuvieron lugar los procesos de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS) y completa remoción de carbono orgánico.

La adición de micronutrientes favoreció la comunidad de microorganismos nitrificantes de acuerdo a los resultados obtenidos de remoción de amonio y NTK. El incremento en la relación DQO:NTK permitió un aumento de la actividad desnitrificante, lo cual se vio reflejado en el aumento de la remoción de nitrógeno inorgánico.

Conforme a dichos resultados se observó que una relación de DQO:NTK de 100:7.33, junto a la adición de micronutrientes, fue la alternativa más eficaz que permitió obtener elevadas remociones de nitrógeno amoniacal (98%), NTK (100%), Ni (76%) y carbono (100%).

Por otro lado, la secuenciación de última generación (NGS) a partir de la extracción de ADN de la comunidad microbiana permitió caracterizar la composición de las comunidades bacterianas presentes. Se ha observado que existía una diversidad microbiana significativa en el sistema mediante el plateau de las curvas de rarefacción obtenidas y el índice de diversidad determinado. Asimismo, se han logrado obtener órdenes y géneros más representativos y abundantes del sistema. Las predicciones por PYCRUst permitieron obtener los KO más abundantes del sistema y permitieron relacionarlos con los géneros presentes, lo que posibilitó poder asociarlos con sus rutas metabólicas del ciclo del carbono y nitrógeno.

Este estudio permitió identificar que los principales grupos microbianos responsables de la remoción de nitrógeno y carbono pertenecían a nitrificantes heterotróficos y desnitrificantes aeróbicos.

Se identificó que el proceso de nitrificación implicó principalmente la oxidación de amonio y probablemente nitrógeno orgánico hasta nitrato, siendo principalmente atribuido a bacterias heterotróficas involucradas en la remoción de nitrógeno, las cuales fueron halladas en elevadas proporciones como *Niabella*, *Flavobacterium*, *Lysobacter*, *Dyadobacter* o *Mesorhizobium*. Por otro lado, se han identificado cepas con capacidad desnitrificante aeróbica potencial entre las que se destacan: *Hydrogenophaga*, *Pseudorhodoferax*, *Simplicispira* y *Diaphorobacter*.

Capítulo 5

El presente capítulo propone una alternativa eficiente para el tratamiento biológico de aguas residuales lácteas que utilizan reactores discontinuos secuenciales granulares aerobios (SBR) suplementados con efluentes ricos en amonio.

5.7 TABLAS SUPLEMENTARIAS SBR_{SQ}

A continuación, se presenta el material suplementario con las Tablas a nivel de filo, clase, orden y género de las condiciones SMCM₂₀, MCM₂₀ y SMCB₂₀, donde se expone el promedio del duplicado realizado para cada una de las condiciones y de los niveles filogenéticos estudiados. Se encuentran resaltados en color celeste los géneros, así como las diferentes categorías taxonómicas, más abundantes.

Tabla S1. Abundancia relativa bacteriana a nivel de filo en la condición SMCM₂₀

TAXÓN	Condición SMCM ₂₀
<i>actinobacteria</i>	6486
<i>planctomycetes</i>	791
<i>firmicutes</i>	17
<i>acidobacteria</i>	98
<i>chlorobi</i>	1.5
<i>verrucomicrobia</i>	14
<i>candidatus saccharibacteria</i>	417.5
<i>proteobacteria</i>	30590.5
<i>bacteroidetes</i>	7330.5
<i>chloroflexi</i>	2656.5
<i>chlamydiae</i>	1676
<i>deinococcus_thermus</i>	3

Tabla S2. Abundancia relativa bacteriana a nivel de Clase en la condición SMCM₂₀

TAXÓN	Condición SMCM ₂₀
<i>acidobacteriia</i>	98
<i>actinobacteria</i>	6486
<i>gammaproteobacteria</i>	10872
<i>thermomicrobia</i>	2657
<i>flavobacteriia</i>	3351
<i>chlorobia</i>	2
<i>cytophagia</i>	231
<i>deinococci</i>	3

Capítulo 5

<i>sphingobacteriia</i>	3749
<i>candidatus saccharibacteria</i>	418
<i>planctomycetia</i>	791
<i>bacilli</i>	17
<i>alphaproteobacteria</i>	13090
<i>opitutae</i>	4
<i>chlamydiai</i>	1676
<i>verrucomicrobiae</i>	10
<i>betaproteobacteria</i>	6620
<i>epsilonproteobacteria</i>	9

Tabla S3. Abundancia relativa bacteriana a nivel de Orden en la condición SMCM₂₀

TAXÓN	Condición SMCM ₂₀
<i>planctomycetales</i>	492.5
<i>candidatus brocadiales</i>	298.5
<i>candidatus saccharibacteria</i>	417.5
<i>cytophagales</i>	231
<i>opituales</i>	4
<i>sphaerobacterales</i>	1.5
<i>thermomicrobiales</i>	2655
<i>actinomycetales</i>	6484.5
<i>flavobacterales</i>	3351
<i>sphingobacterales</i>	3748.5
<i>chlamydiales</i>	1676
<i>acidimicrobiales</i>	1.5
<i>campylobacterales</i>	9
<i>chlorobiales</i>	1.5
<i>alteromonadales</i>	14
<i>chromatiales</i>	6.5
<i>aeromonadales</i>	1.5
<i>acidobacterales</i>	98
<i>pseudomonadales</i>	68.5

Capítulo 5

<i>rhizobiales</i>	8192.5
<i>rhodospirillales</i>	16.5
<i>caulobacterales</i>	17
<i>xanthomonadales</i>	10687.5
<i>rhodocyclales</i>	13.5
<i>lactobacillales</i>	17
<i>legionellales</i>	94
<i>rickettsiales</i>	13.5
<i>holosporales</i>	1.5
<i>burkholderiales</i>	6175
<i>verrucomicrobiales</i>	10
<i>nitrosomonadales</i>	431
<i>sphingomonadales</i>	2161
<i>deinococcales</i>	3
<i>rhodobacterales</i>	2688

Tabla S4. Abundancia relativa bacteriana a nivel de género en la condición SMCM₂₀

TAXÓN	Condición SMCM ₂₀	TAXÓN	Condición SMCM ₂₀
<i>caulobacter</i>	13.5	<i>singulisphaera</i>	404.5
<i>diaphorobacter</i>	5508	<i>arcobacter</i>	9
<i>cupriavidus</i>	7	<i>carnobacterium</i>	17
<i>burkholderia</i>	2.5	<i>candidatus protochlamydia</i>	1524.5
<i>xylophilus</i>	40.5	<i>sphingopyxis</i>	2028.5
<i>deinococcus</i>	3	<i>aquisphaera</i>	72.5
<i>flavobacterium</i>	3346	<i>roseomonas</i>	5
<i>thermomonas</i>	2.5	<i>chitinophaga</i>	651
<i>legionella</i>	94	<i>rhodocyclus</i>	13.5
<i>candidatus metachlamydia</i>	131.5	<i>chryseobacterium</i>	5
<i>pseudoxanthomonas</i>	12.5	<i>comamonas</i>	2.5
<i>achromobacter</i>	1.5	<i>sphingobium</i>	79.5
<i>candidatus kuenenia</i>	298.5	<i>pseudomonas</i>	50.5
<i>parachlamydia</i>	17.5	<i>gordonia</i>	5
<i>flavitalea</i>	17.5	<i>nordella</i>	4

Capítulo 5

<i>alicycliphilus</i>	91	<i>chlamydia</i>	2.5
<i>sphingobacterium</i>	5.5	<i>candidatus odysella</i>	4.5
<i>terrimonas</i>	159	<i>afipia</i>	299.5
<i>nitrosococcus</i>	6.5	<i>pseudolabrys</i>	58.5
<i>niastella</i>	6	<i>lysobacter</i>	57
<i>shewanella</i>	14	<i>pirellula</i>	2.5
<i>derxia</i>	62	<i>spirosoma</i>	212.5
<i>pedobacter</i>	477	<i>rhodoplanes</i>	16.5
<i>ferruginibacter</i>	18	<i>arthrobacter</i>	119
<i>brevundimonas</i>	3.5	<i>microbacterium</i>	3125.5
<i>methylosinus</i>	44.5	<i>chlorobium</i>	1.5
<i>mesorhizobium</i>	1341	<i>bosea</i>	3029
<i>oligotropha</i>	323.5	<i>steroidobacter</i>	2
<i>fulvimonas</i>	1.5	<i>kaistia</i>	106
<i>xanthomonas</i>	2	<i>leifsonia</i>	178
<i>filimonas</i>	16.5	<i>candidatus saccharimonas</i>	417.5
<i>shinella</i>	416.5	<i>niabella</i>	923
<i>rhizobium</i>	166.5	<i>stenotrophomonas</i>	28
<i>rhodanobacter</i>	10113.5	<i>acidovorax</i>	49.5
<i>dyadobacter</i>	4	<i>acinetobacter</i>	7
<i>ilumatobacter</i>	1.5	<i>simplicispira</i>	356.5
<i>nitrosomonas</i>	53	<i>flaviumibacter</i>	1.5
<i>tsukamurella</i>	3.5	<i>sphaerobacter</i>	1.5
<i>opitutus</i>	4	<i>rhodobacter</i>	77.5
<i>caedibacter</i>	9	<i>prosthecobacter</i>	10
<i>flavisolibacter</i>	1473.5	<i>sphingomonas</i>	53
<i>ralstonia</i>	4.5	<i>devosia</i>	381
<i>tetracoccus</i>	77	<i>mycobacterium</i>	4
<i>luteimonas</i>	467	<i>alkanindiges</i>	11
<i>acidobacterium</i>	98	<i>aeromonas</i>	1.5
<i>janthinobacterium</i>	39.5	<i>dokdonella</i>	1.5
<i>hydrogenophaga</i>	8	<i>nitrosovibrio</i>	5
<i>planctomyces</i>	1.5	<i>thermomicrobium</i>	2655
<i>isosphaera</i>	11.5	<i>nakamurella</i>	2540
<i>saccharibacter</i>	11.5	<i>bradyrhizobium</i>	1965
<i>nitrosospira</i>	373	<i>pseudonocardia</i>	509.5

Capítulo 5

<i>amaricoccus</i>	2533.5	<i>hyphomicrobium</i>	39
<i>Aquincola</i>	2	<i>candidatus nucleicultrix</i>	1.5
<i>flexibacter</i>	14.5	<i>rhodopseudomonas</i>	2

Tabla S5. Abundancia relativa bacteriana a nivel de filós en la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀

TAXÓN	Condición MCM ₂₀	Condición SMCB ₂₀
<i>Acidobacteria</i>	96	2690
<i>Actinobacteria</i>	21822	24966
<i>Arthropoda</i>	0	23
<i>Ascomycota</i>	25	0
<i>Bacteroidetes</i>	72451	95817
<i>Candidatus saccharibacteria</i>	0	6
<i>Chlamydiae</i>	16	7
<i>Chlorobi</i>	1092	18
<i>Chloroflexi</i>	9010	349
<i>Cyanobacteria</i>	28	0
<i>Deinococcus_thermus</i>	530	6
<i>Eukaryota</i>	7	26
<i>Fibrobacteres</i>	36	0
<i>Firmicutes</i>	25	15
<i>Gemmatimonadetes</i>	99	7
<i>Nitrospirae</i>	0	1
<i>Planctomycetes</i>	9624	11314
<i>Proteobacteria</i>	65948	44982
<i>Verrucomicrobia</i>	4709	3795

Tabla S6. Abundancia relativa bacteriana en función de clase en la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀

TAXÓN	Condición MCM ₂₀	Condición SMCB ₂₀
<i>acidobacteriia</i>	96	2690
<i>actinobacteria</i>	21822	24966
<i>alphaproteobacteria</i>	13180	9253
<i>bacilli</i>	25	15
<i>bacteroidetes</i>	16	1

Capítulo 5

<i>bacteroidia</i>	19	152
<i>betaproteobacteria</i>	27825	18355
<i>caldilineae</i>	7	0
<i>candidatus saccharibacteria</i>	0	6
<i>chlamydia</i>	16	7
<i>chlorobia</i>	1092	18
<i>chloroflexia</i>	16	205
<i>clostridia</i>	0	0
<i>cyanobacteria</i>	28	0
<i>cytophagia</i>	19701	61593
<i>deinococci</i>	530	6
<i>deltaproteobacteria</i>	177	1010
<i>fibrobacteria</i>	36	0
<i>flavobacteria</i>	1199	5060

Tabla S7. Abundancia relativa bacteriana a nivel de orden en la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀

TAXÓN	Condición MCM ₂₀	Condición SMCB ₂₀
<i>Acidimicrobiales</i>	13	1
<i>Acidobacteriales</i>	96	2690
<i>Actinomycetales</i>	21809	24965
<i>Aeromonadales</i>	0	3
<i>Alphaproteobacteria</i>	16	3
<i>Alteromonadales</i>	101	2
<i>Bacillales</i>	1	0
<i>Bacteroidales</i>	19	152
<i>Bacteroidetes order ii. Incertae sedis</i>	16	1
<i>Bdellovibrionales</i>	154	56
<i>Burkholderiales</i>	25918	16184
<i>Caldilineales</i>	7	0
<i>Candidatus brocadiales</i>	1527	24
<i>Candidatus saccharibacteria</i>	0	6
<i>Caulobacterales</i>	148	89
<i>Chattonellales</i>	3	0
<i>Chlamydiales</i>	16	7
<i>Chlorobiales</i>	1092	18
<i>Chloroflexales</i>	16	205
<i>Chromatiales</i>	22	31
<i>Clostridiales</i>	0	0

Capítulo 5

<i>Coleoptera</i>	0	23
<i>Cytophagales</i>	19701	61593
<i>Deinococcales</i>	530	6
<i>Desulfuromonadales</i>	1	0
<i>Enterobacteriales</i>	12	2
<i>Eurotiales</i>	25	0
<i>Fibrobacterales</i>	36	0
<i>Flavobacteriales</i>	1199	5060
<i>Gemmatimonadales</i>	99	7
<i>Holosporales</i>	2	0
<i>Hydrogenophilales</i>	0	1
<i>Lactobacillales</i>	24	15
<i>Legionellales</i>	14	70
<i>Longamoebia</i>	4	19
<i>Myxococcales</i>	22	954
<i>Neisseriales</i>	0	0
<i>Nitrosomonadales</i>	95	1093
<i>Nitrospirales</i>	0	1
<i>Oceanospirillales</i>	12	3
<i>Oligoflexales</i>	0	0
<i>Opitutales</i>	425	129
<i>Oscillatoriales</i>	0	0
<i>Peronosporales</i>	0	7
<i>Phycisphaerales</i>	8	2
<i>Planctomycetales</i>	8089	11288
<i>Pseudomonadales</i>	287	867
<i>Rhizobiales</i>	8950	2946
<i>Rhodobacterales</i>	2436	3280
<i>Rhodocyclales</i>	1812	1077
<i>Rhodospirillales</i>	332	203
<i>Rickettsiales</i>	12	71
<i>Solirubrobacterales</i>	0	0
<i>Sphaerobacterales</i>	21	2
<i>Sphingobacteriales</i>	51516	29011
<i>Sphingomonadales</i>	2035	2661
<i>Syneschococcales</i>	28	0
<i>Thermomicrobiales</i>	8966	142
<i>Thiotrichales</i>	2	1
<i>Verrucomicrobiales</i>	4284	3666
<i>Xanthomonadale</i>	24316	15385

Tabla S8. Abundancia relativa bacteriana a nivel de género en la condición MCM₂₀ y SMCB₂₀

TAXÓN	Condición MCM ₂₀	Condición SMCB ₂₀
<i>acanthamoeba</i>	4	19
<i>acetobacter</i>	5	0
<i>acidisphaera</i>	88	21
<i>aciditerrimonas</i>	4	0
<i>acidobacterium</i>	96	2690
<i>acidovorax</i>	296	1614
<i>acinetobacter</i>	228	550
<i>actinomycetospora</i>	6	0
<i>adhaeribacter</i>	0	7
<i>aeromicrobium</i>	1	1
<i>aeromonas</i>	0	3
<i>alkanindiges</i>	0	14
<i>amaricoccus</i>	26	46
<i>anaeromyxobacter</i>	0	0
<i>aquibacter</i>	0	0
<i>aquimonas</i>	4434	85
<i>aquincola</i>	10	104
<i>aquisphaera</i>	6892	5726
<i>arenimonas</i>	0	0
<i>arthrobacter</i>	459	8495
<i>aspergillus</i>	25	0
<i>bacteroides</i>	19	152
<i>bartonella</i>	0	0
<i>bdellovibrio</i>	154	56
<i>bosea</i>	1233	1203
<i>bradyrhizobium</i>	64	262
<i>brevundimonas</i>	38	9
<i>burkholderia</i>	1	1
<i>byssovorax</i>	8	265
<i>caedibacter</i>	12	69
<i>caldilinea</i>	7	0
<i>candidatus alysiosphaera</i>	13	3

Capítulo 5

<i>candidatus aquirestis</i>	3	0
<i>candidatus kueningenia</i>	1527	24
<i>candidatus metachlamydia</i>	16	2
<i>candidatus nucleicultrix</i>	2	0
<i>candidatus protochlamydia</i>	0	5
<i>candidatus saccharimonas</i>	0	6
<i>carnobacterium</i>	2	1
<i>caulobacter</i>	9	47
<i>cellulomonas</i>	5	85
<i>cellulosimicrobium</i>	1891	141
<i>chitinophaga</i>	4032	6264
<i>chlorobium</i>	1092	18
<i>chloroflexus</i>	16	205
<i>chondromyces</i>	4	112
<i>chromohalobacter</i>	12	3
<i>chryseobacterium</i>	72	102
<i>citricella</i>	77	2933
<i>cloacibacterium</i>	0	22
<i>comamonas</i>	26	0
<i>conexibacter</i>	0	0
<i>crocinitomix</i>	30	34
<i>curvibacter</i>	27	578
<i>cyanotheca</i>	0	0
<i>cystobacter</i>	0	23
<i>cytophaga</i>	0	0
<i>dechloromonas</i>	213	171
<i>defluviicoccus</i>	0	0
<i>deinococcus</i>	530	6
<i>demequina</i>	4	3
<i>derxia</i>	139	64
<i>desulfuromusa</i>	1	0
<i>devosia</i>	1875	71
<i>diaphorobacter</i>	6600	1714
<i>dokdonella</i>	3008	2865
<i>dyadobacter</i>	3808	9983
<i>emticia</i>	14812	220
<i>epilithonimonas</i>	0	0

Capítulo 5

<i>erythrobacter</i>	3	1
<i>fibrobacter</i>	36	0
<i>filimonas</i>	72	3
<i>flaviumibacter</i>	13	53
<i>flavisolibacter</i>	12	46
<i>flavitalea</i>	45	350
<i>flavobacterium</i>	193	4712
<i>flexibacter</i>	241	6755
<i>fluviicola</i>	25	24
<i>fluviimonas</i>	3	0
<i>formosa</i>	0	0
<i>fusibacter</i>	0	0
<i>gaetbulibacter</i>	8	0
<i>gelidibacter</i>	0	0
<i>geminicoccus</i>	3	0
<i>gemmata</i>	11	11
<i>gemmatimonas</i>	99	7
<i>gemmaobacter</i>	2	3
<i>geobacter</i>	0	0
<i>gordonia</i>	20	0
<i>haliscomenobacter</i>	12	14
<i>heterosigma</i>	3	0
<i>hydrogenophaga</i>	15292	656
<i>hymenobacter</i>	0	1
<i>hyphomicrobium</i>	292	22
<i>ideonella</i>	0	1
<i>ilumatobacter</i>	9	1
<i>isosphaera</i>	284	2892
<i>janthinobacterium</i>	4	163
<i>kaistia</i>	1	1
<i>kaistobacter</i>	57	21
<i>labilithrix</i>	10	551
<i>lacibacter</i>	1	1
<i>lactococcus</i>	15	11
<i>leadbetterella</i>	195	6
<i>lechevalieria</i>	56	52
<i>legionella</i>	14	70

Capítulo 5

<i>leptolyngbya</i>	28	0
<i>leptothrix</i>	2	72
<i>leucobacter</i>	25	38
<i>leuconostoc</i>	4	0
<i>lewinella</i>	128	156
<i>luteimonas</i>	13149	2747
<i>luteolibacter</i>	3834	44
<i>lysobacter</i>	432	7540
<i>mariniflexile</i>	868	162
<i>marinobacter</i>	101	2
<i>mesorhizobium</i>	2901	788
<i>methylibium</i>	25	8
<i>methylobacterium</i>	1	3
<i>methylocystis</i>	5	5
<i>methylosinus</i>	37	4
<i>microbacterium</i>	3249	13430
<i>mucilaginibacter</i>	0	0
<i>nakamurella</i>	528	793
<i>niabella</i>	35329	17570
<i>niastella</i>	137	494
<i>nitrobacter</i>	46	76
<i>nitrosococcus</i>	22	31
<i>nitrosomonas</i>	65	72
<i>nitrospira</i>	30	1021
<i>nitrosovibrio</i>	0	0
<i>nitrospira</i>	0	1
<i>nordella</i>	2	5
<i>novosphingobium</i>	74	66
<i>ohtaekwangia</i>	1	6
<i>oligoflexus</i>	0	0
<i>opitutus</i>	425	129
<i>owenweeksia</i>	0	2
<i>paenibacillus</i>	1	0
<i>paracoccus</i>	2	2
<i>pararhodobacter</i>	15	11
<i>parasegetibacter</i>	0	6
<i>pedobacter</i>	391	719

Capítulo 5

<i>peredibacter</i>	0	0
<i>persicobacter</i>	0	5
<i>phaeobacter</i>	3	13
<i>phaselicystis</i>	0	3
<i>phenylobacterium</i>	33	16
<i>phycisphaera</i>	8	2
<i>phyllobacterium</i>	339	29
<i>phytophthora</i>	0	7
<i>pirellula</i>	41	3
<i>planctomyces</i>	21	850
<i>prostheco bacter</i>	396	3620
<i>proteiniclasticum</i>	0	0
<i>pseudolabrys</i>	133	206
<i>pseudomonas</i>	59	303
<i>pseudonocardia</i>	15546	1920
<i>pseudorhodofera x</i>	2722	383
<i>pseudoxanthobacter</i>	4	0
<i>pseudoxanthomonas</i>	364	836
<i>pterostichus</i>	0	23
<i>ralstonia</i>	1	10
<i>raoultella</i>	12	2
<i>reyranella</i>	5	1
<i>rhizobium</i>	254	137
<i>rhodanobacter</i>	582	847
<i>rhodobacter</i>	1504	155
<i>rhodococcus</i>	1	1
<i>rhodocyclus</i>	0	1
<i>rhodofera x</i>	11	18
<i>rhodoplanes</i>	20	7
<i>rhodopseudomonas</i>	0	10
<i>rhodotherrnus</i>	16	1
<i>rhodovastum</i>	0	1
<i>rickettsia</i>	0	2
<i>roseimicrobium</i>	20	0
<i>roseobacter</i>	9	0
<i>roseomonas</i>	222	77
<i>rubellimicrobium</i>	3	65

Capítulo 5

<i>saccharibacter</i>	12	103
<i>salinirepens</i>	0	0
<i>sediminibacterium</i>	1	3
<i>shinella</i>	1743	117
<i>silanimonas</i>	1	0
<i>simplicispira</i>	240	9747
<i>singulisphaera</i>	840	1806
<i>solitalea</i>	7	106
<i>sphaerobacter</i>	21	2
<i>sphingobacterium</i>	247	188
<i>sphingobium</i>	17	15
<i>sphingomonas</i>	297	73
<i>sphingopyxis</i>	1571	2481
<i>sphingosinicella</i>	16	4
<i>spirosoma</i>	637	44610
<i>sporocytophaga</i>	4	0
<i>stenotrophomonas</i>	10	74
<i>steroidobacter</i>	2234	56
<i>streptococcus</i>	3	3
<i>sulfuritalea</i>	2	0
<i>tepidimonas</i>	6	0
<i>terrimonas</i>	11086	3038
<i>tessaracoccus</i>	0	2
<i>tetracoccus</i>	44	52
<i>thauera</i>	98	76
<i>thermomicrobium</i>	8966	142
<i>thermomonas</i>	2	1
<i>thiobacillus</i>	0	1
<i>thiothrix</i>	2	1
<i>tsukamurella</i>	18	4
<i>variovorax</i>	66	83
<i>verrucomicrobium</i>	34	2
<i>vitellibacter</i>	3	2
<i>vitreoscilla</i>	0	0
<i>winogradskyella</i>	0	0
<i>woodsholea</i>	68	17
<i>xanthomonas</i>	100	334

Capítulo 5

<i>xenophilus</i>	0	17
<i>xylophilus</i>	450	951
<i>zoogloea</i>	1499	829

CAPÍTULO 6

TRATAMIENTO DE EFLUENTES FENÓLICOS EN EL SBR GRANULAR AERÓBICO

CAPÍTULO 6: TRATAMIENTO DE EFLUENTES FENÓLICOS EN EL SBR GRANULAR AERÓBICO

6.1 REMOCIÓN SIMULTÁNEA DE NITRÓGENO Y FENOL

Los compuestos amonio y fenólicos en elevadas concentraciones se encuentran comúnmente en las aguas residuales derivadas de varios procesos industriales importantes como la producción de coque, fabricación de productos petroquímicos, refinamiento de petróleo y lixiviados de vertederos. Estas aguas residuales generan un gran impacto ambiental debido a su alta complejidad y toxicidad (Jin y col, 2012; Feng y col, 2015; Amor y col, 2005; Adav y col, 2009).

Cabe destacar que la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA) ha establecido un estándar de calidad de agua para fenol menor que 1 ppb en agua superficial (Kazemi y col, 2014), mientras que los niveles de toxicidad generalmente están en el rango de 9-25 mg.L⁻¹ tanto para humanos como para la vida acuática (Kulkarni y col, 2013).

Numerosos estudios de laboratorio han informado (Zhang y col, 1998; Li y col, 2003; Kim y col, 2008b; Lai y col, 2009) la utilidad de los procesos biológicos para remover el nitrógeno y compuestos fenólicos contenidos en las aguas residuales. Sin embargo, es ampliamente aceptado que los compuestos fenólicos son reconocidos como inhibidores del metabolismo microbiano en la nitrificación (Kim y col, 2008; Lauchnor y Semprini, 2013).

No obstante, el método tradicional para eliminar fenol, amonio y nitrógeno total presenta algunas desventajas. Este tratamiento requiere del uso de más de un tanque secuencial. Uno de ellos con presencia de aireación requerido para la eliminación de fenol, seguido de otro tanque, también en condiciones aeróbicas necesario para la nitrificación y la adición de un tercer tanque, que presente condiciones anaeróbicas requerido para la desnitrificación. Es por este motivo que es deseable la eliminación simultánea de compuestos fenólicos y nitrógeno desde el punto de la ingeniería, lo que ofrecería mayores beneficios a partir de un menor requerimiento del área de instalación, disminución del tiempo de retención hidráulica y un costo económico menor. Cabe destacar además, que se han realizado grandes esfuerzos para lograr la oxidación simultánea de compuestos fenólicos y amonio en un único tanque aerobio, con el objetivo de evitar la inhibición por parte de los fenoles de los microorganismos nitrificantes (Yamagishi y col, 2001; Vazquez y col, 2006b; Texier y Gomez, 2007; Jemaat y col, 2013; Jemaat y col, 2014). Una de estas alternativas consistió en el estudio llevado a cabo por Liu y col. (2005) quienes desarrollaron un sistema compuesto por biomasa granular y observaron la presencia de

Capítulo 6

microorganismos heterótrofos con capacidad de degradar fenoles en la capa externa del gránulo y bacterias oxidantes de amonio (BOA) en la capa interna del mismo. Esto permitía que los microorganismos heterótrofos protejan a los oxidantes de amonio de la toxicidad causada por el fenol.

Para superar la complejidad operativa de los sistemas recientemente descritos se ha observado que los procesos de nitrificación y desnitrificación simultánea (NDS), mediante la utilización de un único reactor aeróbico, brindan una alternativa prometedora para remover simultáneamente fenoles y compuestos nitrogenados.

Se ha demostrado que ciertos grupos de bacterias heterotróficas como *Thiosphaera pantotropha* (Robertson y col, 1988), *Alcalíenos faecalis* (Papen y col, 1989), *Bacillus* (Gokce y col, 1989), *Pseudomonas putida* (Kim y col, 2008a), *Pseudomonas stutzeri* (Zhang y col, 2011), *Hydrogenophaga* (Chu y Wang, 2013) y *Achromobacter* (Chen y Ni, 2011) tienen acción nitrificante-desnitrificante aeróbica, convirtiendo el amonio en nitrógeno gaseoso en presencia de oxígeno y compuestos fenólicos.

Sin embargo, aún hay muy pocos estudios acerca de este tratamiento simultáneo a partir de cepas heterótrofas con capacidad de NDS (Feng y col, 2015); entre algunos de ellos se destaca el trabajo realizado por Fen y col (2015) que han logrado la remoción conjunta de nitrógeno y fenol utilizando un reactor que contenía una celda microbiana de doble cámara (aeróbica-anaeróbica) separadas por una membrana de intercambio catódico. Fen y col. (2015) demostraron la posible nitrificación-desnitrificación simultánea incluso a concentraciones de fenol de hasta 600 mg L⁻¹, con una carga de nitrógeno de 230 NH₄⁺-N mg L⁻¹.

Por su parte, Wosman y col. (2016) estudiaron el desarrollo de gránulos aeróbicos, como una forma atractiva de agregado microbiano, capaz de degradar más de un contaminante orgánico tóxico. Ellos han informado que es necesaria una estrategia adecuada para aclimatar el lodo inóculo a los compuestos tóxicos con el fin de lograr una granulación exitosa. Experimentaron dos estrategias distintas, por un lado, utilizaron fuentes de carbono mixtas (acetato y fenol) y por el otro fenol como única fuente de carbono. Posteriormente analizaron sus efectos sobre el rendimiento del reactor, las características de la biomasa, la comunidad microbiana y el proceso de granulación. Observaron que el lodo alimentado con fenol exhibía una aclimatación más rápida y una aparición más temprana de los gránulos, pero una diversidad microbiana y una estabilidad del reactor menor. Por otro lado, el uso de una mezcla de dos fuentes de carbono (acetato

Capítulo 6

y fenol) en la etapa de aclimatación, con una relación DQO:N (10:1), permitió una degradación de fenol y granulación más lentas, pero la formación de gránulos aeróbicos fuertes y estables. La concentración de fenol para lograr la aclimatación en los reactores se incrementó desde 50 mg.L⁻¹ a 250 mg.L⁻¹; luego se redujo gradualmente el tiempo de sedimentación, desde 30 minutos a 2 minutos, para favorecer la granulación; posteriormente se incrementó el fenol a 500 mg.L⁻¹.

6.2 OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

Objetivo general

Estudiar la factibilidad de remoción simultánea de fenol y nitrógeno en un sistema granular aeróbico. Para ello se utilizó nuevamente un SBR alimentado con elevada relación altura/diámetro (2.7), bajo régimen “feast/famine”. Inicialmente se operó con una fuente de C mixta (acetato/fenol) y luego con una fuente de carbono simple (fenol). Se espera que bajo las condiciones de trabajo escogidas y optimizadas en el capítulo 3 (régimen “feast/famine”, condiciones completamente aeróbicas OD de 7.5 mg O₂.L⁻¹, caudal de aire superficial elevado de 0.6 cm.seg⁻¹ y control de pH en un valor constante de 7.5) resulte una remoción adecuada de nitrógeno y fenol sin provocar inhibición del fenol al metabolismo de los microorganismos nitrificantes y/o desnitrificantes.

Objetivos específicos

- Estudiar la toxicidad de diferentes concentraciones de fenol mediante la implementación de ensayos respirométricos en batch en la biomasa granulada aclimatada a una fuente de carbono simple fácilmente degradable (acetato de sodio).
- Hallar una concentración de trabajo de fenol que permita aclimatar a la biomasa del SBR, adaptada al consumo de acetato, al agente tóxico evitando la inhibición del metabolismo de los microorganismos nitrificantes.
- Estudiar la aclimatación en el SBR de los microorganismos adaptados al acetato de sodio a la nueva fuente de carbono y energía (FCE) mediante la determinación de los parámetros que indican la estabilidad del sistema: ST, propiedades de sedimentación (ISV), tamaño granular promedio, velocidades de consumo de NH₃-N, DQOs, y Fenol.

Capítulo 6

- Estudiar la eficiencia conjunta de remoción del nitrógeno y fenol mediante la incorporación de este tóxico al sistema como fuente de carbono mixta (acetato-fenol) y fuente de carbono única (sólo fenol).

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1 Efluente fenólico sintético y condiciones de operación del SBR

En este estudio se utilizó el SBR descrito en la sección 2.2 (denominado SBR_{FENOL-AC}). Se han informado diferentes estrategias para adaptar el lodo activado a una sustancia tóxica pero biodegradable. Una de ellas consiste en proporcionar un tóxico como única fuente de carbono y energía (como por ejemplo fenol), aumentando gradualmente la concentración. La otra estrategia propone utilizar una sustancia fácilmente biodegradable como la glucosa o acetato de sodio y reemplazar la misma gradualmente por el compuesto tóxico. No obstante, estas dos estrategias pueden tener varios impactos. Bajaj y col. (2015) han informado que utilizando la primera estrategia, es posible que un aumento demasiado dramático pueda conducir a una completa inhibición microbiana. Por otro lado, incluir un sustrato fácilmente biodegradable puede llevar a aumentar rápidamente la comunidad microbiana durante las primeras etapas de aclimatación, proporcionando una mejor resistencia contra la toxicidad. Sin embargo, también podría obstaculizar el proceso de aclimatación, ya que el lodo degrada preferentemente este tipo de sustrato, sin desarrollar actividad metabólica hacia las sustancias tóxicas.

En base a las ventajas/desventajas descritas acerca de la estrategia de aclimatación basada en la alimentación con una única fuente de carbono o bien con una fuente de carbono mixta tal como se explicó previamente, en este trabajo de tesis se utilizó un inóculo inicial de biomasa granulada aclimatada previamente con acetato de sodio y se adiciono al efluente sintético fenol obteniendo una fuente de carbono mixta acetato/fenol. Una vez adaptado los gránulos a esta nueva fuente de carbono, se completó el estudio manteniendo fenol como única fuente de carbono. El SBR fue operado con una carga volumétrica de nitrógeno amoniacal de $90 \text{ mg N} \cdot (\text{L} \cdot \text{día})^{-1}$ y una relación DQO:N:P de 100:15:2 tal como se describe en el capítulo 3. Cabe destacar que se utilizó esta condición ya que en dicho capítulo se ha observado que una carga de amonio de $90 \text{ mg N} \cdot (\text{L} \cdot \text{día})^{-1}$ permitió lograr mayores velocidades de remoción de nitrógeno amoniacal respecto a una carga menor ($60 \text{ mg N} \cdot (\text{L} \cdot \text{día})^{-1}$). Asimismo tal como se trabajo con el SBR_{ACET}, el pH fue estabilizado mediante un controlador de pH (sección 3.7.2).

Capítulo 6

Previamente al estudio del proceso de aclimatación al fenol en el SBR se evaluó mediante ensayos en batch (descritos a continuación), el rango de concentración de fenol tolerado por el consorcio microbiano y posteriormente una vez detectado dicho rango (no tóxico) se adicionó el tóxico (fenol).

6.3.2 Ensayo de toxicidad de fenol mediante respirometría

Para determinar la toxicidad del fenol sobre los microorganismos aclimatados a acetato, se llevaron a cabo estudios de respirometría mediante ensayos batch (ver capítulo 2, sección 2.9).

Inicialmente se tomó un volumen de 200 mL del SBR_{ACET} al comienzo del ciclo en fase “feast” (biomasa granular aclimatada con acetato de sodio como fuente de carbono y energía) y se dejó sedimentar la biomasa en una probeta de 250 mL, descartándose el sobrenadante. La biomasa sedimentada fue luego centrifugada en centrífuga Rolco a 3000 R.P.M durante 10 min a fin de eliminar el efluente tratado (sobrenadante). Posteriormente se resuspendió el pellet en agua corriente y se volvió a centrifugar (3000 R.P.M, 10 minutos). Este lavado se realizó dos veces. La biomasa (pellet resultante) lavada se colocó en un vaso de precipitado (reactor batch) de 250 mL y se le adicionó 200 mL del medio de cultivo descrito en la Tabla 6.1. En el reactor batch se encendió la agitación (200 R.P.M) y la aireación y se trabajó con OD de $7 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ y pH 7.5. Se estudiaron 4 condiciones experimentales, determinadas y diferenciadas por la concentración inicial de fenol, y se incluyó un ensayo control. Se adicionó a cada reactor batch un pulso de acetato de sodio (CH_3COONa , 1.4 M) y un pulso de fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, 0.53 M) (Tabla 6.2). Cabe destacar que la concentración inicial de CH_3COONa fue igual en todos los casos y se trabajó con un volumen final de 210 mL. Las concentraciones iniciales de fenol y acetato en los reactores batch, correspondientes a los diferentes ensayos experimentales y ensayo control, se presentan en la Tabla 6.3.

Capítulo 6

Tabla 6.1: Medio de cultivo utilizado para determinar la toxicidad del fenol sobre los microorganismos. Las soluciones M₁ y M₂ son las mismas que se describieron en el capítulo 2 (Sección 2.2).

Medio de Cultivo	(g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4230
KH ₂ SO ₄	0.0650
K ₂ HPO ₄	0.0514
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2700
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0427
M ₁	1 mL
M ₂	1 mL

Tabla 6.2: Pulsos de acetato de sodio y fenol para los diferentes ensayos realizados

Pulsos	ENSAYO 1 mL	ENSAYO 2 mL	ENSAYO 3 mL	ENSAYO 4 mL	Control mL
C ₆ H ₅ OH (mL)	0.45	1.05	2.1	4.2	0
CH ₃ COONa (mL)	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6
Agua (mL)	3.95	3.35	2.3	0.2	4.4

Tabla 6.3 Concentraciones de acetato de sodio y fenol para los diferentes ensayos realizados

	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3	ENSAYO 4	Control
C ₆ H ₅ OH (g.L ⁻¹)	0.1	0.25	0.5	1	0
CH ₃ COONa (g.L ⁻¹)	3.076	3.076	3.076	3.076	3.076

Se consideró como tiempo inicial (0 hs) del ensayo, el momento en que se adicionó acetato de sodio y fenol. El ensayo tuvo una duración de 8 horas. La aireación fue detenida a cada hora y se registraron las lecturas de OD (mg.L⁻¹) mediante el uso de un electrodo de medición de OD en función del tiempo (capítulo 2, sección 2.9). Asimismo, a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 y 8 hs) se tomaron muestras y se realizaron las medidas cuantitativas, en cada batch, de consumo de NH₃-N, fenol y DQOs y acumulación de NO₃⁻-N y NO₂⁻-N.

El control no contaba con la adición del pulso de fenol, con el fin de determinar la actividad respiratoria del consorcio microbiano, la cual se utilizó como referencia para estimar el efecto tóxico de las diferentes concentraciones de fenol. No obstante, se

Capítulo 6

evaluaron los mismos parámetros a excepción de las mediciones de fenol. Cada ensayo batch se realizó por duplicado.

Por un lado las medidas registradas de $\text{NH}_3\text{-N}$ a cada tiempo (0, 2, 4, 6 y 8 hs) fueron utilizadas para estimar la velocidad de consumo de amonio $r\text{NH}_3\text{-N}$ ($\text{mg NH}_3\text{-N} \cdot (\text{L h})^{-1}$) en cada reactor batch operado a una diferente concentración de fenol. Estos resultados permitieron estimar la inhibición de consumo de amonio a causa del tóxico. Se calculó la inhibición porcentual de la velocidad de consumo de amonio ($\%I_{r\text{NH}_3\text{-N}}$), para cada concentración inicial de fenol, a partir de la ecuación 6.1:

$$\% I_{r\text{NH}_3 - \text{N}} = 100 \cdot \frac{(r\text{NH}_3 - N_{\text{control}}) - (r\text{NH}_3 - N_{\text{Fenol}})}{(r\text{NH}_3 - N_{\text{control}})} \quad (6.1)$$

Donde $r\text{NH}_3\text{-N}_{\text{control}}$ corresponde a la velocidad de consumo de amonio del control y $r\text{NH}_3\text{-N}_{\text{fenol}}$ a la velocidad de consumo de amonio a cada concentración de fenol estudiada. Este estudio permitió determinar la máxima concentración de fenol no tóxica para los microorganismos

Por otro lado, los ensayos respirométricos permitieron determinar la velocidad de consumo de oxígeno (OUR, $\text{mg O}_2 \cdot (\text{L.h})^{-1}$) a cada hora para los diferentes ensayos batch, a partir de las medidas de OD ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) registradas en función del tiempo (1-2 min). Posteriormente estas velocidades (OUR) fueron utilizadas para obtener la inhibición porcentual de la velocidad de consumo de oxígeno por fenol ($\%I_{\text{OUR}}$) en cada concentración ensayada:

$$\% I_{\text{OUR}} = 100 \cdot \frac{(\text{OUR}_{\text{control}}) - (\text{OUR}_{\text{Fenol}})}{(\text{OUR}_{\text{control}})} \quad (6.2)$$

Donde $\text{OUR}_{\text{control}}$ corresponde a la velocidad de consumo de oxígeno del ensayo control y $\text{OUR}_{\text{fenol}}$ a la velocidad de consumo de oxígeno para cada concentración de fenol estudiada.

Por último, se estimó la velocidad de consumo de fenol, r_{Fenol} ($\text{mg Fenol} \cdot (\text{L.h})^{-1}$), para cada concentración inicial del compuesto tóxico (diferentes ensayos batch), a partir de las medidas cuantitativas de fenol obtenidas a los diferentes tiempos.

Capítulo 6

6.3.3 Aclimatación de los microorganismos al fenol y efecto del incremento de la carga de fenol

Una vez determinada una concentración de fenol óptima para la aclimatación y no tóxica para los microorganismos, el $SBR_{FENOL-AC}$ fue alimentado con un efluente sintético de fuente de carbono mixto a base de fenol y acetato de sodio.

Las condiciones de operación del $SBR_{FENOL-AC}$ (pH 7.5, OD 7.5 $mg.L^{-1}$, TRC 20 días, TRH 2.79 días, caudal de aire volumétrico 2.3 L aire ($L_{reactor.min}^{-1}$) y caudal superficial 0.6 $cm.seg^{-1}$) fueron los mismos que los utilizados en el capítulo 3 descritos para el SRB_{ACET} (sección 2.2.1 del capítulo 2).

El reactor se controló periódicamente con mediciones de sólidos totales (ST), propiedades de sedimentación (ISV), tamaño granular, velocidad de consumo de la demanda química de oxígeno soluble (DQOs), de nitrógeno amoniacal y remociones de fenol.

Luego que se llevaron a cabo los estudios con una concentración óptima que permitía lograr la aclimatación de la biomasa al fenol y funcionamiento estable del SBR a lo largo de los ciclos, la concentración de fenol fue incrementada. Esta condición fue denominada como SBR_{FENOL} .

Luego de lograr la aclimatación de los gránulos al fenol, se evaluó el desempeño del reactor mediante la estimación de parámetros cinéticos de consumo de amonio y DQOs, acumulación de nitrito y nitrato, así como la eficiencia de remoción de amonio y N inorgánico durante 5 TRC. Para ello se determinaron las velocidades de consumo de NH_3-N , DQO_S , y las velocidades de acumulación de NO_3^-N y NO_2^-N (sección 2.8). Se determinaron los porcentajes de remoción de nitrógeno amoniacal (E.C 2.9) y nitrógeno inorgánico (E.C 2.10) como se indicó en la sección 2.7, NH_3-N consumido por asimilación (Ec. 5.14) y N_G (Ec. 5.13) tal como se ha indicado en la sección 5.5.5.1 y NDS (E.C 5.12) correspondiente a la sección 5.5.1.4, con la salvedad que en ese sistema no hay nitrógeno orgánico proveniente de la fuente de carbono por lo tanto el nitrógeno oxidado utilizado para calcular el %NDS corresponde únicamente al nitrógeno amoniacal proveniente del efluente sintético utilizado. Estas determinaciones se llevaron a cabo en ciclos operativos a diferentes TRC.

La estabilidad del SBR, frente a las concentraciones de fenol ensayadas, se alcanzó cuando la velocidad específica de consumo de DQOs, NH_3-N y fenol, el ISV, tamaño granular y los ST ($g.L^{-1}$) eran constantes al menos durante tres TRC. Cabe

Capítulo 6

destacar que en las mediciones de DQOs están consideradas ambas fuentes de carbono y energía (fenol y acetato de sodio), considerando una relación de: g DQO/g fenol de 2.388 y g DQO/g acetato de sodio de 0.766.

6.4 DETERMINACIÓN DE FENOL

La concentración de fenol (C_6H_5OH) fue medida colorimétricamente por el método 4- amino-antipirina (Peter y col., 1973). En solución alcalina los compuestos fenólicos meta, orto y algunos para sustituidos reaccionan con 4- amino-antipirina en presencia de ferricianida generando un producto rojizo, cuya absorbancia es medida a 510 nm. La absorbancia se relaciona linealmente con la concentración de fenol para concentraciones menores a 10 mg.L^{-1} de fenol. La curva de calibración se determinó periódicamente utilizando soluciones de fenol de concentraciones conocidas (Sigma Aldrich, 98% pureza) en un rango de concentración de 1 a 8 mg.L^{-1} de fenol (Figura. 6.1). Para determinar fenol, se tomaron 5 mL de muestra del licor de mezcla (de los ensayos en batch, $SBR_{FENOL-AC}$ y SBR_{FENOL}), la cual se centrifugó en centrífuga Rolco a 2000 R.P.M durante un tiempo de 10 minutos. Se descartó el pellet y al sobrenadante se le adicionó 1 mL de solución de 4- amino-antipirina (20.8 mM) en carbonato de sodio (0.25 M) y 1 mL de solución de ferricianida (83.4 mM) en carbonato de sodio (1 M). Transcurrido un tiempo de contacto de 10 minutos se midió la absorbancia a 510 nm con un espectrofotómetro HACH DR/2000. El blanco se preparó sustituyendo el volumen de muestra con agua destilada.

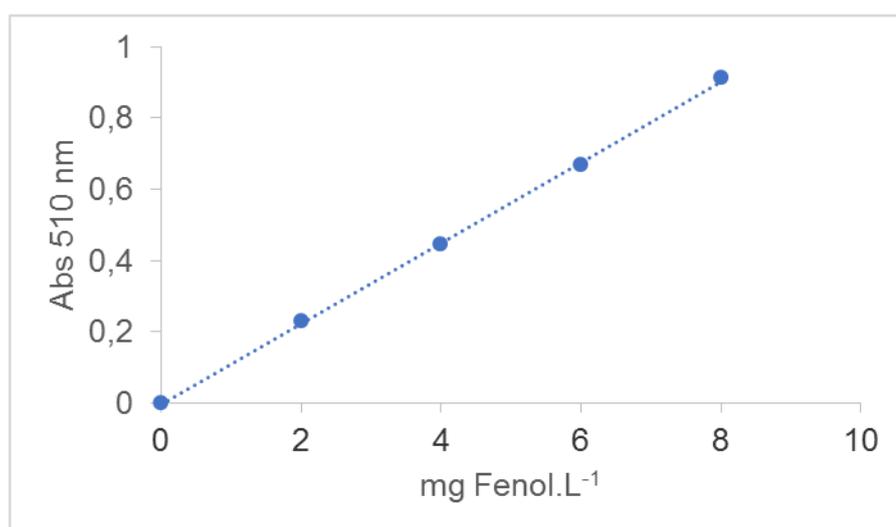


Figura 6.1: Curva de calibración: Absorbancia en función de la concentración de fenol

$$(y = 0.1133x - 0.0024, R^2 = 0.9996)$$

El porcentaje del fenol removido se determinó mediante la siguiente expresión:

$$\% Fenol_r = \left(\frac{(Fenol)_0 - (Fenol)_F}{(Fenol)_0} \right) \cdot 100 \quad (6.3)$$

donde $(Fenol)_0$ y $(Fenol)_F$ corresponden a las concentraciones del fenol ($mg Fenol.L^{-1}$) al comienzo y al final del batch y del ciclo operativo del SBR, respectivamente.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Efectos tóxicos del Fenol sobre la biomasa granulada en reactores batch

A- Inhibición del consumo de amonio por toxicidad del fenol

En primer lugar se evaluó el efecto tóxico del fenol sobre el consumo microbiano de nitrógeno amoniacal como así también sobre la velocidad de consumo de fenol (r_{Fenol}) tal como se describió en la sección 6.3.2. Es importante destacar que todos los ensayos batch se llevaron a cabo con la misma concentración de biomasa ($1.3 g ST.L^{-1}$). En la Figura 6.2 se muestran las velocidades volumétricas de remoción de nitrógeno amoniacal y fenol obtenidas entre las 0 y 2 hs de rango de tiempo elegido a fin de evaluar la remoción de amonio y fenol en condiciones no limitadas en FCE, para las diferentes concentraciones de fenol ensayadas entre 100 y 1000 $mg fenol.L^{-1}$.

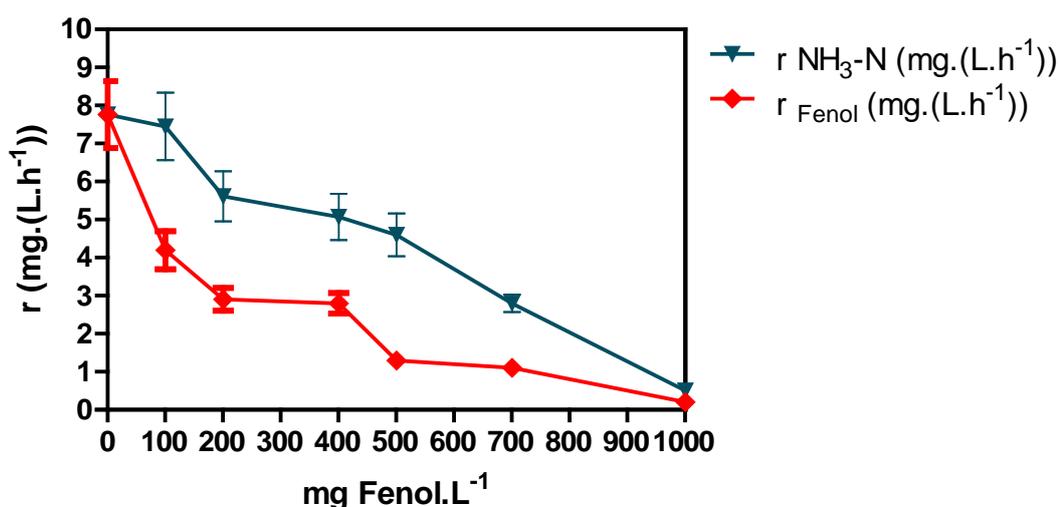


Figura 6.2: Velocidades volumétricas iniciales de remoción de NH_3-N y Fenol en función de las diferentes concentraciones de fenol ensayadas en batch.

Capítulo 6

Tal como se puede observar a medida que se incrementa la concentración de fenol las velocidades de remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$ disminuyen. Inicialmente a una concentración de $100 \text{ mg fenol.L}^{-1}$ disminuye aproximadamente un 40% la r_{Fenol} respecto al control, observándose que dicha concentración no afectaba a la $r_{\text{NH}_3\text{-N}}$. No obstante, no se observan diferencias considerables entre 200 y $400 \text{ mg fenol.L}^{-1}$. Sin embargo, al superar la concentración de 400 mg.L^{-1} , las velocidades de remoción de fenol y nitrógeno amoniacal disminuyen progresivamente, observándose este decaimiento con una tendencia más pronunciada para $r_{\text{NH}_3\text{-N}}$.

Es importante destacar que las velocidades fueron calculadas en las primeras 2 horas de estudio, ya que como se observa en la Figura 6.3 la fuente de carbono acetato, calculada como DQOs, es agotada prácticamente en este intervalo de tiempo. Considerando las relaciones DQO/masa (mg/mg) para las fuente de carbono (acetato y fenol), expuestas anteriormente, junto a las medidas colorimétricas obtenidas de DQOs a los diferentes tiempos, fue posible calcular por un lado la concentración de acetato de sodio consumida (mgDQOs.L^{-1}) en cada punto medido y por otro la concentración de fenol (mgDQOs.L^{-1}) (Figura 6.3).

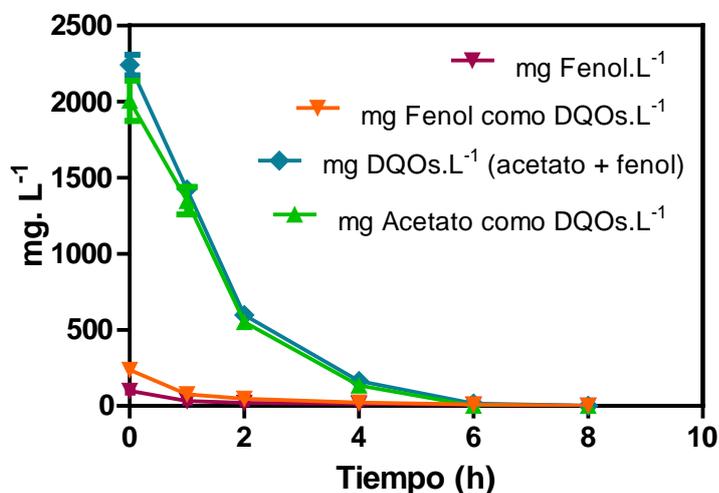


Figura 6.3: Perfiles de consumo de fenol, acetato y DQOs en ensayo batch para una concentración inicial de fenol de 100 mg.L^{-1} .

A partir de los resultados obtenidos con la ecuación 6.1 se graficó el $\%r_{\text{NH}_3\text{-N}}$ en función de la concentración de fenol (Figura 6.4). Estos porcentajes de remoción fueron

Capítulo 6

calculados con las velocidades obtenidas durante las primeras 2 horas de estudio tal como se explicó anteriormente.

Se puede observar que la inhibición del fenol sobre la velocidad de consumo de amonio comenzó a ser significativa (> al 50%) cuando la concentración era mayor a 500 mg.L⁻¹, y aún mayor con concentraciones entre 700 y 1000 mg fenol.L⁻¹. Se ha observado que concentraciones entre 100 y 200 mg fenol.L⁻¹ podrían ser toleradas por los microorganismos adaptados al acetato de sodio.

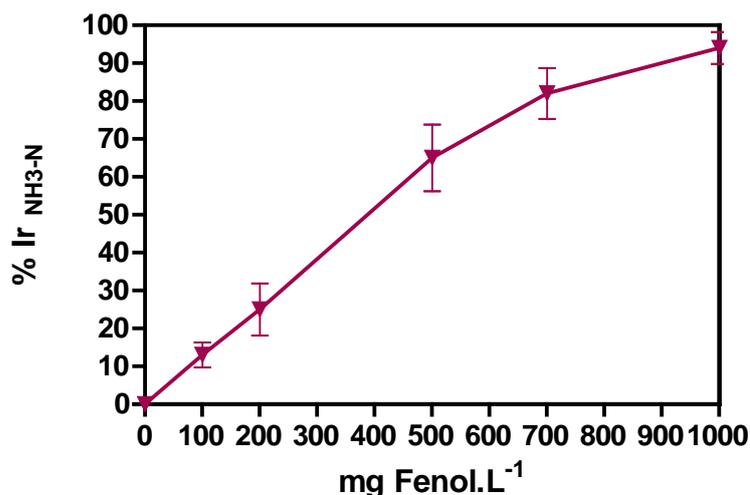


Figura 6.4: Inhibición de la velocidad de remoción de NH₃-N para las diferentes concentraciones de fenol (mg.L⁻¹)

Las velocidades iniciales de acumulación de NO₃⁻-N y NO₂⁻-N estimadas a partir de los ensayos batch están representadas en la Figura 6.5. Se observa que la velocidad de acumulación de nitrato disminuye a medida que aumenta la concentración inicial de fenol, de igual manera sucedía con la velocidad de acumulación de nitrito. Estos resultados inicialmente llevarían a pensar que podría estar sucediendo una inhibición por parte del tóxico del metabolismo de los microorganismos nitrificantes, ya que como se observa en la Figura 6.2, la velocidad de remoción de amonio también disminuye a medida que aumenta la concentración de fenol. No obstante, la disminución en la velocidad de acumulación de nitrito y nitrato a mayores concentraciones de fenol, podría ser también causada por ocurrencia de desnitrificación o cambios en la magnitud de este proceso así como por procesos de oxidación de nitrito a nitrato.

Cabe destacar que las velocidades de acumulación de nitrito y nitrato representan el balance entre los procesos de generación de ambos compuestos nitrogenados por

Capítulo 6

nitrificación y consumo por desnitrificación. Además, en el caso del nitrito también representa el consumo mediante el proceso de oxidación hasta nitrato; es por este motivo que las velocidades de acumulación presentadas en la Figura 6.5 no representan una estimación tan precisa o bien confiable de cómo afectan las diferentes concentraciones de fenol sobre los procesos de nitrificación (nitritación y nitratación).

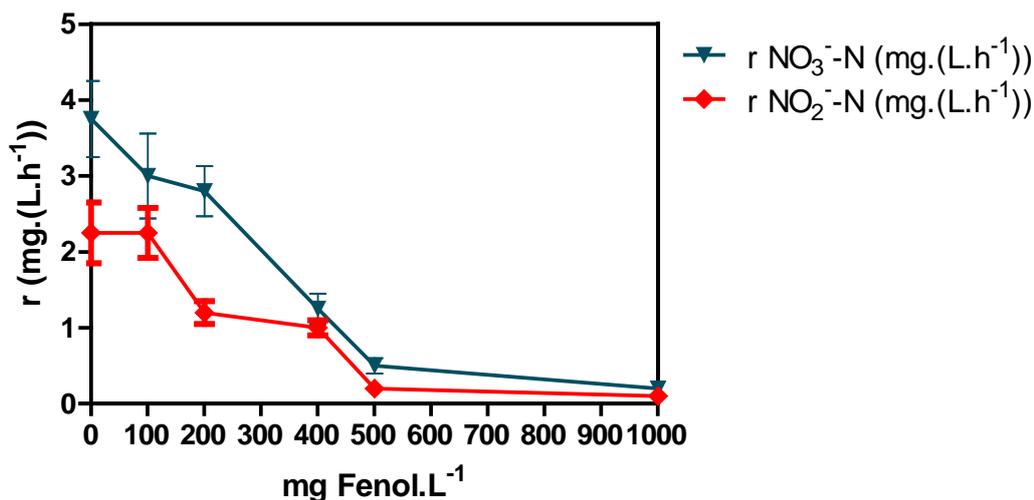


Figura 6.5: Velocidades de acumulación de NO₃⁻-N (mg. L⁻¹) y NO₂⁻-N (mg.L⁻¹) para las diferentes concentraciones de fenol (mg.L⁻¹). El control (0 mg.L⁻¹ de fenol) no contenía fenol.

B- Inhibición de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) por toxicidad del fenol

Además de evaluar la inhibición de la velocidad de consumo de amonio, también se estudió el efecto tóxico del fenol sobre el consumo de oxígeno (OUR) nuevamente durante las primeras 2 horas de estudio de cada ensayo batch. Se calculó la inhibición porcentual de la velocidad de consumo de oxígeno (%I_{OUR}) para cada concentración de fenol a partir de la ecuación 6.2. En la figura 6.6 se presenta el %I_{OUR} en función de la concentración de fenol. Se puede observar que a partir de concentraciones de 200 mg fenol.L⁻¹, la inhibición de la velocidad de consumo de OD comenzaba a ser significativa.

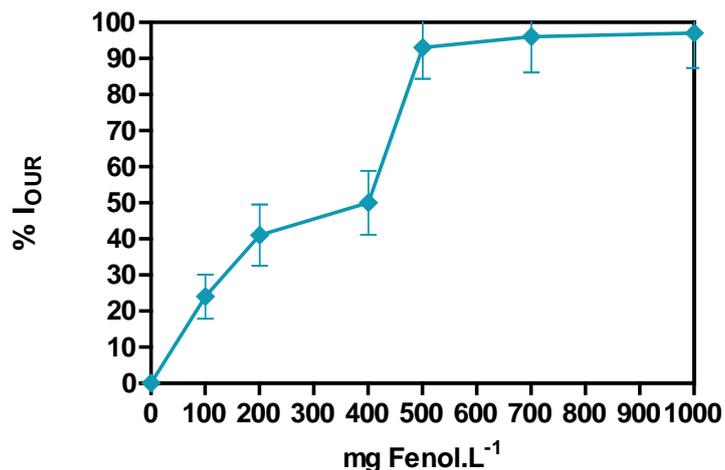


Figura 6.6: Efecto tóxico de fenol (mg.L^{-1}) sobre la velocidad de consumo de OD ($\text{mgO}_2.(\text{L.h})^{-1}$) en función de la concentración inicial de fenol en ensayo batch

Los estudios respirométricos llevados a cabo en batch nos permitieron estudiar diferentes aspectos en el sistema. En primer lugar, fue posible definir una concentración inicial de fenol de 100 mg.L^{-1} adecuada para adaptar el consorcio microbiano del SBR a una fuente de carbono mixta (acetato y fenol), por otro lado, permitieron conocer los porcentajes de inhibición respecto a la velocidad de oxidación de amonio como de OD para diferentes concentraciones de fenol, hallando los rangos tóxicos para el consorcio microbiano en estudio.

6.5.2 Aclimatación y eficiencia de remoción de nitrógeno, fenol y acetato de sodio en el SBR

El fenol fue incorporado al reactor operado con una carga de nitrógeno de $90 \text{ mg N.}(\text{L.día})^{-1}$, tal como se explicó en la sección 6.3.1. La carga de acetato de sodio inicial fue de $361 \text{ mg DQO.}(\text{L.día})^{-1}$ y la carga diaria de fenol expresada como DQO de $238.8 \text{ mg DQO.}(\text{L.día})^{-1}$, resultando una relación DQO:N de 100:15. El medio de cultivo que se utilizó se encuentra descrito en la Tabla 6.4 donde se exponen la concentración de los componentes utilizados. Cabe destacar que el fenol fue agregado al SBR mediante un pulso diario de 2.17 mL de una solución madre (solución Stock, $46 \text{ gr Fenol.L}^{-1}$) para tener la concentración inicial que no muestra una inhibición considerable sobre el consorcio microbiano nitrificante, mientras que el acetato de sodio se aplicó mediante un pulso de 2 mL de una solución stock de acetato ($235 \text{ g ACNa.L}^{-1}$) junto al medio de cultivo expuesto

Capítulo 6

en la tabla 6.4 para obtener una concentración final de 470 mg acetato de sodio.L⁻¹. La aclimatación de los microorganismos y posterior estabilidad del sistema se alcanzó rápidamente después de aproximadamente 40 días de operación. El tamaño promedio de los gránulos fue de 0.7 mm y el ISV se encontró entre 40 y 50 mL.g ST⁻¹. La concentración de biomasa alcanzada fue de 1.3 g ST.L⁻¹ (D.S= 0.2) y se mantuvo estable durante todo el estudio.

En este estudio, tal como se ha detallado durante todo el trabajo de tesis, los ciclos fueron divididos en dos períodos “feast” y “famine”, determinados por el agotamiento de la fuente de carbono y energía.

Tabla 6.4: Composición del medio de cultivo sintético con fenol utilizado en el SBR (La composición de M₁ y M₂ se encuentra detallada en el capítulo 2)

Efluente sintético	SBR (gr.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6060
KH ₂ PO ₄	0.0489
K ₂ HPO ₄	0.0395
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2700
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.0427
Solución M ₁	1 mL
Solución M ₂	1 mL

En la figura 6.7 A, se puede observar que durante el período “feast” la degradación de la FCE mixta es el proceso más relevante, permitiendo la acumulación de sustancias de reservas como el glucógeno con una velocidad de formación de 120 mg GLU.(L.h)⁻¹ (Tabla 6.5, SBR_{FENOL-AC}). Cabe destacar que el DQOs representó el consumo de ambas fuentes de carbono como se explicó en sección 6.3.3.

Asimismo, en este período se logró una remoción de fenol de 79% (Tabla 6.5). No obstante, además se observa un porcentaje considerable en la remoción del NH₃-N debido al comienzo de la nitrificación como así también al consumo de nitrógeno destinado a crecimiento de biomasa (Figura 6.7 B, Tabla 6.5). Durante estas primeras horas se observó un incremento ligero del nitrito, mientras que el nitrato remanente del ciclo anterior

Capítulo 6

disminuyó, teniendo lugar en esta fase el proceso de desnitrificación hasta agotar el NO_3^- -N presente.

Durante el período “famine” se puede observar que el proceso más relevante es la remoción de nitrógeno mediante nitrificación. Se evidenció un aumento progresivo de la concentración de NO_3^- -N hasta el final del ciclo operativo debido a la remoción de nitrógeno amoniacal por nitrificación. El NO_2^- -N disminuyó hasta valores no detectados por el método espectrofotométrico utilizado (Figura 6.7 B). Además, se puede observar el agotamiento de las reservas de carbono (glucógeno), debido a su consumo por microorganismos heterótrofos ordinarios y probablemente también por microorganismos desnitrificantes. Cabe destacar que durante esta fase se degrada completamente el fenol sin evidenciar una inhibición en el metabolismo de los microorganismos nitrificantes (Figura 6.7 A).

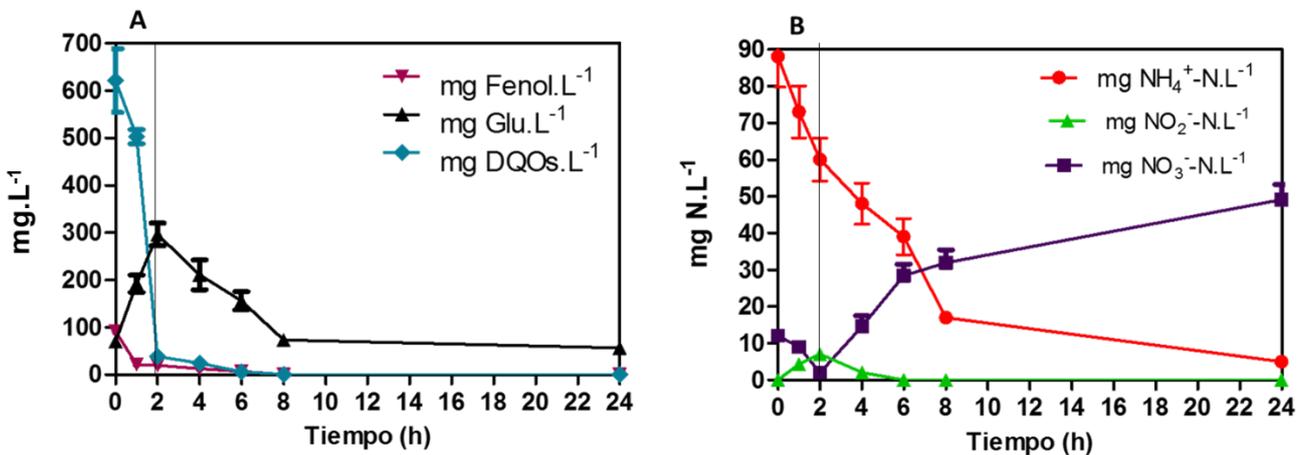


Figura 6.7: A) Perfiles de remoción de la fuente de carbono mixta (acetato y fenol), medido como DQOs y fenol y cambios en la concentración de glucógeno, B) Diferentes formas de nitrógeno inorgánico a lo largo de un ciclo operativo del SBR bajo condiciones de estabilidad.

DQO_S (◆), glucógeno (▲), Fenol (▼) NH₄⁺-N (●), NO₃⁻-N (■), NO₂⁻-N (▲)

El NH_3 -N asimilado en todo el ciclo operativo fue estimado mediante Ec. 5.14 como se describió previamente (Sección 6.3.3), resultando 12.7 mgN.L^{-1} , lo que representa un 14.1 % del amonio removido. El amonio restante (85.9%) fue removido por nitrificación.

Por último, se ha observado que la generación de nitrógeno gaseoso en el ciclo de es de aproximadamente el 28% del amonio removido, lo cual indica que la desnitrificación presenta un papel relevante en este sistema (Tabla 6.5, SBR_{FENOL-AC}).

Capítulo 6

A partir de los resultados obtenidos se incrementó la carga volumétrica de fenol desde 238.8 hasta 600 mg DQOs.(L.h)⁻¹ mediante el agregado de fenol como única fuente de carbono y energía al SBR aplicando un pulso de 5.5 mL diarios de la solución madre (46 gr.L⁻¹), pasando de un sistema con una fuente de carbono mixta (acetato y fenol) a un sistema con una única fuente de carbono (fenol) denominado SBR_{FENOL}.

Al aumentar la concentración de fenol el tamaño promedio de los gránulos se mantuvo en 0.7 mm y el ISV disminuyó a 25 mL.g ST⁻¹ indicando mejores propiedades de sedimentabilidad granular. La concentración de biomasa alcanzada fue de 1.8 g ST.L⁻¹ (D.S= 0.1).

Tabla 6.5: Eficiencia de la remoción de fenol y las diferentes formas de nitrógeno y parámetros cinéticos para las condiciones estudiadas

Ciclo operativo	Parámetros DQO: N:P	SBR _{FENOL-AC} (100:15:2)	SBR _{FENOL} (100:15:2)
Ciclo Total	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N	95 (2.3)**	92 (3.2)**
	% Remoción de N inorgánico	40 (3.1)*	21 (1.7)*
	% Remoción de Fenol	100	100
	% NDS	35 (2.8)*	9.1 (1.0)*
	NG (mg.L ⁻¹)	25 (1.9)*	9 (0.3)*
	% N gaseoso	28 (1.9)*	11 (0.5)*
Fase "Feast"	qDQOs (mg DQOs. (g ST.h) ⁻¹)	232 (8.5)*	111 (2.7)*
	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N	30 (2.8)**	22 (1.3)**
	% Remoción de Fenol	79 (4.1)**	80 (1.3)**
	rGlu _F (mg GLU. (L.h) ⁻¹)	120.1 (3.1)*	150 (3.9)*
	qGlu _F (mg GLU. (g ST.h) ⁻¹)	92 (3.1)*	83.2 (3.2)*
Fase "Famine"	q(NH ₃ -N) (mg NH ₃ -N.(g ST.h) ⁻¹)	5.1 (0.1)*	6.9 (2.2)*
	rGlu _D (mg GLU. (L.h) ⁻¹)	37 (2.8)*	50 (1.7)*
	qGlu _D (mg GLU. (g ST.h) ⁻¹)	28 (1.8)**	27 (1.1)**
	% Remoción de NH ₄ ⁺ -N	65 (5.2)**	72 (3.0)**
	% Remoción Fenol	21 (1.6)**	20 (1.0)**

En este estudio el período "feast" fue definido desde el inicio del ciclo hasta las primeras 4 horas, donde la remoción del fenol fue del 80% aproximadamente, mientras que el período "famine" se extendió desde las 4 horas hasta la finalización del ciclo (Figura 6.8 A).

Capítulo 6

Durante el período “feast” se observó que conforme se consume la fuente de carbono y energía, medida como DQOs, con una velocidad específica de 111 mg DQOs.(g ST.h)⁻¹, aumenta la producción de reservas intracelulares, medidas como glucógeno, con una velocidad de producción (qGlu_F) de 83.2 mg Glu.(g ST.h)⁻¹ (DS= 3.2) (Figura 6.8 A, Tabla 6.5 SBR_{FENOL}). Asimismo la remoción del NH₃-N fue muy baja (22%) en relación a lo que se ha observado en el período “famine” (72%) (Figura 6.8 B, Tabla 6.5). Probablemente durante el período “feast”, donde no se observa generación de NO₃⁻-N, esta remoción de NH₃-N pueda deberse a consumo por crecimiento o asimilación del nitrógeno por parte de la biomasa. No obstante, se observa generación de NO₂⁻-N, el cual muy probablemente pudo generarse por nitrificación del amonio. Sin embargo, no puede descartarse la generación de nitrito por desnitrificación parcial a partir de NO₃⁻-N remanente del ciclo anterior (Figura 6.8 B), si bien éste proceso sería menos probable en presencia de carbono orgánico externo.

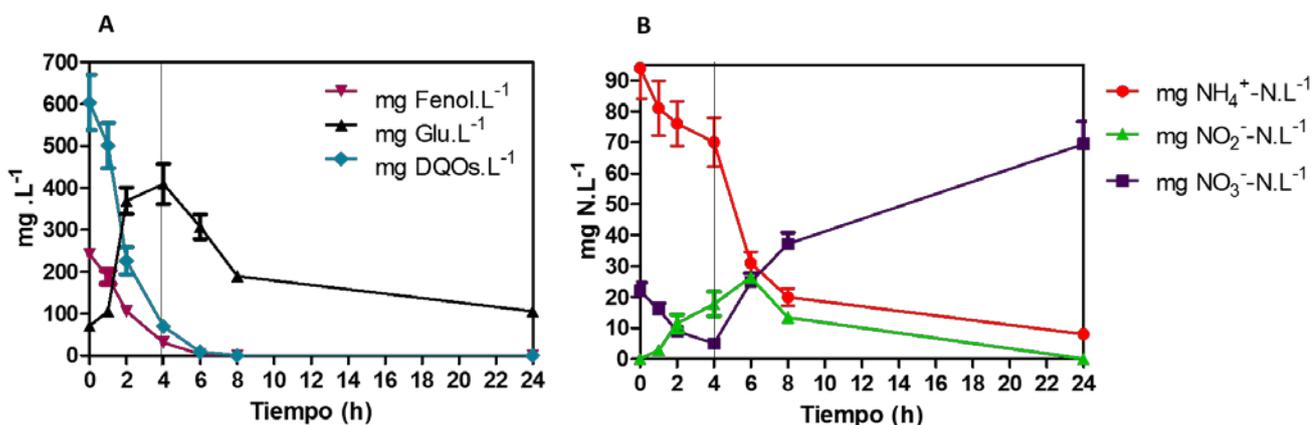


Figura 6.8: A) Perfiles de remoción de la fuente de carbono simple (fenol), medida como DQOs y fenol, y cambios en la concentración de glucógeno, B) Diferentes formas de nitrógeno inorgánico a lo largo de un ciclo operativo del SBR bajo condiciones de estabilidad. DQO (◆), glucógeno (▲), Fenol (▼) NH₄⁺-N (●), NO₃⁻-N (■), NO₂⁻-N (▲)

Durante el período “famine” se ha observado el agotamiento de la fuente de carbono externa, junto al consumo de glucógeno con una velocidad de degradación de (rGlu_D) de 50 mg Glu.(L.h)⁻¹ (DS= 1.7) (Figura 6.8 A). En este período, la nitrificación es sumamente evidente debido a la significativa acumulación observada de nitrato (Figura 6.8 B). Cabe destacar que el nitrógeno asimilado en todo el ciclo operativo fue de 15 mg N.L⁻¹

Capítulo 6

La remoción de fenol se vio reflejada en ambas fases, obteniéndose una remoción completa en el ciclo total. Cabe destacar que en ambas condiciones la carga de $\text{NH}_3\text{-N}$ es elevada, y esto puede generar FA en los sistemas, produciendo probablemente inhibición de las BON. Sin embargo, en el $\text{SBR}_{\text{FENOL}}$ en comparación con $\text{SBR}_{\text{FENOL-AC}}$ se puede observar una elevada acumulación de $\text{NO}_2^-\text{-N}$, lo que conduce a pensar que seguramente exista una inhibición de las BON, pero que la misma sea a causa del aumento de la carga de fenol en el sistema.

Por otro lado, no se hallaron diferencias significativas respecto a la remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$ observada para el ciclo total entre la condición con la fuente de carbono mixta (acetato y fenol) y la condición estudiada únicamente con fenol; para ambos sistemas la misma fue casi completa (>90%). Resultados similares se obtuvieron con la remoción del fenol donde se ha observado que el tóxico fue completamente degradado por la biomasa granulada en ambos sistemas, aunque cabe destacar que velocidad de degradación de la DQOs fue significativamente mayor cuando el sistema contenía la FCE mixta (Tabla 6.5).

Se hallaron diferencias respecto a la remoción de nitrógeno inorgánico y al porcentaje de NDS, donde fue mucho menos eficiente el sistema que contenía únicamente fenol. En este sistema se obtuvo una eficiencia de NDS de 9.1% y de aproximadamente la mitad de remoción de Ni (21%) en comparación con el sistema con la FCE mixta. (Tabla 6.5), indicando una menor desnitrificación, probablemente retrasada por la inhibición de las BON como se mencionó recientemente.

Se puede observar que en la condición $\text{SBR}_{\text{FENOL-AC}}$, con una FCE mixta (acetato + fenol) la velocidad con la cual se consume esta FCE en “feast” es mayor (agotamiento de la DQOs en aproximadamente 2 horas) que cuando la FCE es únicamente fenol (tabla 6.5). Asimismo se puede apreciar que en la condición $\text{SBR}_{\text{FENOL-AC}}$ la mayor parte del glucógeno (80-90%), en la fase “famine”, se consume de forma mas lenta (6 hs), en comparación con la condición $\text{SBR}_{\text{FENOL}}$ (con fenol como única FCE) donde el agotamiento del 80% de esta reserva de energía se produce en aproximadamente 4 horas (Figura 6.7 A y 6.8 A). Esto puede deberse a una mayor concentración de biomasa (1.8 g.ST.L^{-1}) en este último sistema.

La inhibición de las BON por fenol, desde el inicio del ciclo operativo hasta las 4-6 hs, en la condición $\text{SBR}_{\text{FENOL}}$ habría causado un retraso en el inicio de la actividad desnitrificante, respecto a $\text{SBR}_{\text{FENOL-AC}}$. Este fenómeno junto con el rápido consumo de las reservas de glucógeno en fase “famine” podría explicar la pobre eficiencia del proceso NDS

Capítulo 6

y en consecuencia la baja remoción de nitrógeno inorgánico obtenida en el reactor alimentado con fenol como única fuente de carbono y energía.

6.6 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En el presente capítulo se ha estudiado la factibilidad de remover nitrógeno y fenol en conjunto en un SBR granular aeróbico alimentado bajo régimen “feast/famine”, utilizando inicialmente un efluente sintético compuesto por una fuente de carbono mixta (acetato/fenol) y luego una fuente simple (fenol).

Se logró determinar, mediante ensayos batch, que una concentración de 100 mg fenol.L⁻¹ era óptima y viable para aclimatar la biomasa granular en el SBR, la cual estaba adaptada previamente a acetato de sodio, ya que dicha concentración no afectaba significativamente a la velocidad de remoción de amonio como tampoco a la velocidad de consumo de oxígeno disuelto. No obstante, si bien todas las concentraciones de fenol (100-1000 mg fenol.L⁻¹) causaban inhibición, concentraciones superiores a 400 mg fenol.L⁻¹ inhibían más del 50%.

Se logró rápida estabilidad del sistema (2 TRC) luego de la incorporación del fenol al SBR, estudiada mediante la determinación de los parámetros ISV (40-50 mL.(g ST)⁻¹), tamaño granular (0.7 mm) y velocidades de consumo de amonio (5.1 mg NH₃.N.(g ST.h)⁻¹) y DQOs (232 mg DQOs.(g ST.h)⁻¹). Se obtuvieron remociones completas de la fuente de carbono mixta (acetato/fenol) determinadas mediante las mediciones de DQOs y fenol, a partir de una carga orgánica total de DQOs de 600 mg DQO.(L.día)⁻¹, equivalente a una carga de acetato y fenol de 361.5 mg DQO.(L.día)⁻¹ y 238.8 mg DQO.(L.día)⁻¹ respectivamente.

Se logró remoción prácticamente completa del NH₃-N (95%), observándose este consumo tanto por los procesos de nitrificación (85.9%) y asimilación (14.1%), conforme a los balances de masa realizados. Por otro lado, se obtuvo un porcentaje de remoción de Ni (40%) significativo, observándose además que el proceso NDS representó 35%. Probablemente tanto la desnitrificación como la NDS se encuentren impulsadas por la utilización de reservas intracelulares de glucógeno generadas a partir de fenol (rGlu_D= 37 mg GLU.(L.h)⁻¹).

Se observó que la biomasa granular fue capaz de tolerar y remover con gran eficiencia el contaminante tóxico sin afectar la remoción de nitrógeno. Por medio de los balances de masa, se determinó que, en los ciclos operativos estables, hubo generación

Capítulo 6

de 25 mg.L^{-1} de nitrógeno gaseoso, lo cual representó aproximadamente un 28% del amonio removido destacando la relevancia del proceso de desnitrificación en la remoción de N inorgánico.

Por último se pudo observar que al aumentar la concentración de fenol a 250 mg.L^{-1} ($600 \text{ mg DQOs} \cdot (\text{L} \cdot \text{día})^{-1}$), siendo ésta la única fuente de carbono y energía, la remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$ por nitrificación fue significativamente elevada, la cual correspondió al 82% del amonio removido (crecimiento 18%), observándose remoción completa del fenol. Asimismo se han encontrado diferencias significativas respecto a la generación de nitrógeno gaseoso como también en la remoción de nitrógeno a partir de la menor eficiencia hallada en el proceso de NDS. El aumento en la concentración de fenol (250 mg.L^{-1}) probablemente se encuentre inhibiendo a las bacterias oxidantes de nitrito, lo cual se reflejó por la elevada acumulación de nitrito, retrasando la desnitrificación. Este fenómeno junto al rápido agotamiento de las reservas de glucógeno sería responsable de la pobre actividad desnitrificante y por lo tanto de la baja eficiencia de remoción de nitrógeno inorgánico.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES

Debido a los problemas ambientales que desde hace tiempo generan las descargas de aguas residuales, particularmente los efluentes ricos en compuestos nitrogenados, en diferentes cuerpos de agua, nuestro grupo de investigación se centró en realizar mediante este trabajo de tesis un profundo estudio de tres tipos de efluentes característicos de industrias, muy representativas tanto en nuestro país como a nivel mundial.

La particularidad de utilizar efluentes sintéticos modelo nos permitió optimizar mediante la modificación de diferentes parámetros operativos, sistemas biológicos económicos, eficientes y sencillos, como son los reactores discontinuos secuenciales (SBRs) con capacidad de remover de manera conjunta nitrógeno y carbono.

Como se ha presentado previamente en la tesis, los efluentes estudiados fueron clasificados según su composición en la fuente de carbono y energía (FCE) en tres modelos diferentes: uno de ellos muy característico de la industria láctea, cuya fuente de carbono provenía del suero de queso y los restantes característicos de industrias químicas donde se estudiaron fuentes de carbono simples, acetato de sodio y fenol (cada una de ellas como fuente única de carbono) y mixtas (combinación de acetato de sodio/fenol).

Se logró una exitosa puesta en marcha de reactores SBR aeróbicos tipo columna con flujo ascendente, elevada relación altura/diámetro (A/D), caudal superficial de aire de $0.6 \text{ cm} \cdot (\text{seg})^{-1}$ y $1.9 \text{ cm} \cdot (\text{seg})^{-1}$ y régimen de alimentación dinámica con disponibilidad de carbono e inanición, conocido como “feast/famine”, definido el final del período “feast” e inicio del “famine” por la remoción del 90% de la fuente de carbono para las aguas residuales sintéticas utilizadas.

Estas características de los SBRs nos permitieron asegurar un flujo circular tipo vórtex y homogéneo a lo largo del eje de los reactores y la posterior formación de gránulos debido al continuo rozamiento hidráulico a partir de un inóculo inicial de lodo activado aclimatado a acetato de sodio proveniente de un SBR automatizado. Se definió un tiempo de sedimentación de biomasa para todos los sistemas de 5 minutos, adecuado para la selección de lodos densos y gránulos.

Se definió la estabilidad de los sistemas biológicos de los SBRs mediante el estudio de diferentes parámetros: índice de sedimentabilidad volumétrica (ISV), tamaño promedio granular, sólidos totales (ST) del reactor y velocidades constantes de consumo de carbono orgánico y amonio.

Capítulo 7

Inicialmente el estudio llevado a cabo con un efluente sintético conteniendo una fuente de carbono fácilmente biodegradable como lo es el acetato de sodio, permitió estudiar el efecto de la carga de nitrógeno, NB: $60 \text{ mg N} \cdot (\text{L} \cdot \text{día})^{-1}$ y NA: $90 \text{ mg N} \cdot (\text{L} \cdot \text{día})^{-1}$, equivalente a una relación DQO:N de 100:10 y 100:15 respectivamente, sobre el proceso de remoción simultánea de nitrógeno y carbono orgánico. Ambas condiciones fueron operadas durante 4 TRC (tiempos de residencia celular) en condiciones estables: $\text{ISV} < 25 \text{ mL} \cdot (\text{g ST})^{-1}$, tamaño granular promedio (NB: 0.4 mm y NA: 1.2 mm), concentración de biomasa (NB: $1.9 \text{ g} \cdot \text{ST}^{-1}$ y NA: $2.3 \text{ g} \cdot \text{ST}^{-1}$), remociones completas de $\text{NH}_3\text{-N}$ y DQOs (100%).

El aumento de la carga de nitrógeno no tuvo influencia sobre la velocidad específica de consumo de acetato, remoción de amonio (100%) como tampoco en la remoción de nitrógeno inorgánico (50%). No obstante, se encontraron diferencias significativas en la velocidad específica de remoción de amonio en la fase “famine”, donde se observó que la misma se duplicaba cuando la relación DQO:N era de 100:15 favoreciendo a los microorganismos nitrificantes y observándose nitrificación desde el comienzo del ciclo. Estos resultados implican que la mayor carga volumétrica de nitrógeno favoreció a los microorganismos nitrificantes.

Se desarrolló un balance de masa general que permitió estimar el nitrógeno gaseoso generado por desnitrificación de cada sistema, teniendo en cuenta las diferentes formas de N ($\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_3^- \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$) en el influente y efluente del reactor y además determinando el N asimilado por bacterias heterótrofas mediante la estimación del N eliminado por la purga diaria de biomasa en el sistema estable. De acuerdo a este balance, el nitrógeno gaseoso eliminado por el proceso de desnitrificación representó 40-45% del amonio removido para ambas condiciones experimentales.

Asimismo, este estudio con una fuente de carbono simple y fácilmente degradable nos permitió desarrollar un balance exhaustivo de masa, basado en los siguientes parámetros cinéticos: velocidades de consumo de DQOs, $\text{NH}_3\text{-N}$ y oxígeno, velocidades de formación y degradación de reservas intracelulares de fuente de carbono y energía (glucógeno y PHA) y velocidades de formación de $\text{NO}_3^- \text{-N}$ y $\text{NO}_2^- \text{-N}$, así como coeficientes estequiométricos, tanto para el período “feast” como “famine”. A partir de dichos balances se determinó que el proceso biológico más relevante fue la nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS), el cual ocurrió principalmente en el período “famine” con desnitrificación impulsada por fuentes de carbono intracelulares. La nitrificación fue el proceso principal de

Capítulo 7

remoción de amonio en este sistema, observando en la condición NB una remoción del $\text{NH}_3\text{-N}$ del 72% por nitrificación y del 28% por crecimiento, mientras que en la condición NA la remoción fue del 73.7% por nitrificación y del 26.3% por crecimiento. La eficiencia de NDS para ambas condiciones fue del 54%, indicando que la mayor parte del nitrógeno estaba siendo desnitrificado.

Por otro lado se realizaron estudios de respirometría para determinar la actividad de los diferentes grupos metabólicos: bacterias oxidantes de amonio (BOA), bacterias oxidantes de nitrito (BON) y bacterias heterótrofas, realizados en presencia de alitiourea o clorato de sodio para inhibir selectivamente BOA y BON respectivamente. El posterior ajuste de los modelos de Aiba, para BOA y BON, y Monod, para heterótrofos, permitieron demostrar la tolerancia y actividad de cada grupo metabólico a diferentes concentraciones de sustratos: amonio, nitrito y acetato como fuente de carbono y energía respectivamente. A partir de los valores de la velocidad específica máxima de consumo de oxígeno (SOUR) de cada grupo metabólico ($\text{SOUR}_{\text{BOAm}}$, $\text{SOUR}_{\text{BONm}}$ y $\text{SOUR}_{\text{HETm}}$), determinados por los modelos propuestos, pudo estimarse la actividad respiratoria relativa de las bacterias nitrificantes (ANR) como el cociente entre SOUR máxima de nitrificantes ($\text{SOUR}_{\text{NITm}} = \text{SOUR}_{\text{BOAm}} + \text{SOUR}_{\text{BONm}}$) y SOUR máxima total ($\text{SOUR}_{\text{TOTm}}$). ANR reflejó un enriquecimiento de la comunidad nitrificante similar en ambas condiciones (60-65%).

El estudio de las relaciones entre los coeficientes cinéticos (K_s , constante de afinidad del sustrato, y K_{IA} , constante de inhibición), obtenidos por el ajuste del modelo de Aiba, permitió determinar la distribución probable de microorganismos (BOA y BON) en los gránulos. A partir del cociente entre los coeficientes de las condiciones NB y NA ($K_{s\text{NB}}/K_{s\text{NA}}$ y $K_{IA\text{NB}}/K_{IA\text{NA}}$) se encontró que para BON, K_{IA} fue casi el doble para NB, mientras que K_s fue aproximadamente 5 veces mayor para esta condición en comparación con NA, y para las BOA para ambos coeficientes se hallaron valores un poco menores al doble para NB en relación a NA.

Los coeficientes cinéticos incluyen tanto el consumo del sustrato como la transferencia de masa interna. Los resultados obtenidos conducen a pensar que la distribución de los microorganismos dentro del gránulo probablemente sea heterogénea con diferentes especies distribuidas en la parte interior y exterior del gránulo. Posiblemente en la condición NB, las BON se encuentren principalmente en las capas más internas de gránulos más densos, con menor exposición a FA, y no expuestas en la superficie.

Capítulo 7

Por otro lado, se desarrolló un estudio basado en la técnica de titulación, que permitiría monitorear los procesos biológicos más importantes, a partir de las correlaciones entre las velocidades de consumo y producción de H^+ totales (rHP_{TOTAL}) cuantificadas en el sistema en función del consumo de acetato (rHP_{ACET}) y la producción de H^+ por el proceso de nitrificación-desnitrificación (rHP_{N+D}) respectivamente. En fase “feast”, la velocidad de consumo de H^+ es una buena medida de la actividad heterotrófica de consumo de acetato, mientras que en fase “famine” la velocidad de producción de H^+ refleja la magnitud del proceso de NDS.

La comunidad microbiana de los SBRs, alimentados con el efluente basado en acetato de sodio y con el efluente lácteo modificado, fue analizada mediante la técnica de secuenciación de NGS a partir del ADN total extraído de la biomasa granular presente en cada reactor. El análisis de estos resultados mediante la utilización de herramientas bioinformáticas con el uso del software Microbiome Helper y servidores como QIIME1 y QIIME2 permitieron determinar la elevada diversidad de la comunidad microbiana en el sistema.

En el SBR alimentado con acetato de sodio, los microorganismos pertenecieron al dominio bacteria. Los filos más abundantes encontrados fueron Proteobacterias representando el 72% (órdenes: Rhodocyclales, Burkholderiales, Sphingomonadales y Xanthomonadales) y Bacteroidetes el 25% (órdenes: Sphingobacteriales y Flavobacteriales). Se utilizaron herramientas bioinformáticas para poder revelar los principales géneros asociadas a los procesos biológicos más significativos. La predicción obtenida por PICRUSt, utilizando la base de datos de Greengenes, permitió revelar KEGG ortólogos representados como KO y relacionar su abundancia con los procesos potenciales de remoción de nitrógeno basados en nitrificación y NDS. Dentro de los géneros más representativos encargados de la remoción de nitrógeno se destacaron *Diaphorobacter*, *Flavobacterium* y *Zoogloea*. El proceso de nitrificación heterótrofa-desnitrificación aeróbica (NHDA) fue el proceso más relevante de remoción de nitrógeno hallado en el sistema.

El reactor alimentado con el efluente sintético modelo de la industria láctea conteniendo suero de queso como fuente de carbono y energía y suplementado con una fuente de nitrógeno inorgánico, para estimular el crecimiento de microorganismos nitrificantes, permitió evaluar los efectos de la carga orgánica, la relación DQO:NTK y la presencia de micronutrientes en la capacidad de nitrificación y desnitrificación del SBR. Esta investigación fue posible a partir del estudio de diferentes condiciones experimentales

Capítulo 7

que fueron operadas en condiciones de estabilidad: $ISV < 50 \text{ mL} \cdot (\text{g ST})^{-1}$, tamaño granular promedio ($> 0.3 \text{ mm}$ según el sistema en estudio), concentraciones de ST del reactor estables durante los ciclos estudiados, remociones completas de $\text{NH}_3\text{-N}$ y DQOs (100%).

El estudio con este efluente permitió observar que la presencia de micronutrientes estimulaba el crecimiento de microorganismos nitrificantes, mientras que el aumento de la relación DQO:NTK lo hacía con el consorcio de bacterias desnitrificantes. Asimismo, el desarrollo de balances de masa a partir de las velocidades de consumo de DQOs, nitrógeno amoniacal, NTK y oxígeno, velocidades de acumulación y consumo de glucógeno, nitrito y nitrato, permitió cuantificar los procesos de nitrificación y desnitrificación a partir de las reservas intracelulares medidas como glucógeno y las eficiencias de remoción de amonio, NTK, nitrógeno inorgánico y orgánico. Se observó que las eficiencias más elevadas de remoción de NTK se lograban con una relación DQO:N de 100:7.33 y la presencia de micronutrientes en el sistema. En esta condición se obtuvieron remociones sumamente elevadas de nitrógeno amoniacal (98%), NTK (100%), Ni (76%) y carbono orgánico (100%). Cabe destacar que el proceso más relevante de remoción de nitrógeno fue NDS (68%). La remoción de NTK por nitrificación fue del 73%, observándose que el NTK restante (27%) fue removido por crecimiento heterótrofo, mientras que el porcentaje de emisión de nitrógeno gaseoso representó 40% del NTK removido.

Además, mediante ensayos respirométricos y balances de masa se logró hallar la velocidad de consumo de suero de queso particulado (consumo de carbono orgánico particulado y nitrógeno orgánico) para cada sistema, siendo la misma el 22% de la velocidad del consumo de suero de queso soluble.

El estudio de la comunidad microbiana en este sistema se llevó a cabo mediante el análisis de las curvas de rarefacción (observándose un plateau) y el índice de diversidad de Shannon (4.58). Los géneros nitrificantes heterótrofos encontrados en mayor abundancia en los sistemas fueron: *Niabella*, *Flavobacterium*, *Lysobacter*, *Dyadobacter* y las cepas con capacidad potencial desnitrificante aeróbica: *Hydrogenophaga*, *Pseudorhodofera*, *Simplicispira* y *Diaphorobacter*, el cual ha sido reconocido como NHDA. No obstante, cabe destacar que se ha encontrado escasa abundancia de BOA y BON.

Este estudio fue fundamental para relacionar eficientemente las vías metabólicas predichas mediante el análisis bioinformático con los procesos biológicos detectados en el reactor, donde se observó que la remoción biológica de nitrógeno involucró principalmente el proceso de NHDA, mediante la detoxificación a partir del amonio, produciéndose la

Capítulo 7

nitrificación a partir de la oxidación de amonio y probablemente nitrógeno orgánico hasta nitrato por bacterias heterótrofas y la desnitrificación a partir del consumo de las reservas intracelulares acumuladas en el sistema.

Por último, se estudió el efecto de la adición de fenol sobre el proceso de remoción conjunta de carbono y nitrógeno en el SBR. El fenol fue incorporado, al efluente sintético, como FCE mixta (fenol/acetato de sodio) y simple (fenol). Inicialmente mediante ensayos respirométricos se estudió la aclimatación de la biomasa (adaptada previamente al acetato de sodio) al fenol y se observó que $100 \text{ mg fenol.L}^{-1}$ resultó la concentración máxima que no afectaba significativamente la actividad respiratoria microbiana ($< 20\%$ de inhibición), observándose remociones completas de DQOs y fenol.

El SBR operado con una carga orgánica de $600 \text{ mg DQO.(L día)}^{-1}$ (acetato de sodio: $361 \text{ mg DQO.(L.día)}^{-1}$ y fenol: $238.8 \text{ mg DQO.(L.día)}^{-1}$), luego de 40 días (2 TRC), demostró condiciones de estabilidad frente al ISV ($< 50 \text{ mL.g ST}^{-1}$), ST del reactor (1.3 g.ST^{-1}), tamaño granular (0.7 mm) y remociones completas de DQOs medida como la fuente de carbono mixta (Acetato+Fenol).

A partir de los balances de masa propuestos se determinaron las eficiencias de remoción de amonio, fenol y nitrógeno inorgánico y se cuantificaron los procesos de nitrificación y desnitrificación. Se lograron remociones elevadas de nitrógeno y carbono por medio del consumo de $\text{NH}_3\text{-N}$ (95%), Ni (40%), DQOs (100%) y fenol (100%) para el agua residual que contenía la FCE mixta. La remoción de nitrógeno se atribuyó principalmente al proceso de NDS (35%). La desnitrificación implicó una generación de nitrógeno gaseoso del 28% impulsada seguramente por el consumo de las reservas de carbono medidas como glucógeno.

Por último, se ha observado que el aumento de la concentración de fenol en el sistema a 250 mg.L^{-1} ($600 \text{ mg DQO.(L día)}^{-1}$), siendo este tóxico la única fuente de carbono y energía, permitía remociones de $\text{NH}_3\text{-N}$ del 92% similar a los resultados obtenidos en el sistema con la FCE mixta. No obstante, se ha observado que la remoción de nitrógeno inorgánico (21%) y NDS (9.1%) fue menor en este sistema con fenol como única fuente de carbono, observándose acumulación de $\text{NO}_2^- \text{-N}$, probablemente debido a que el fenol sea inhibitorio de las BON. Esto probablemente retrasó el inicio del proceso de desnitrificación y debido al rápido agotamiento de las reservas de glucógeno implicó una menor eficiencia de remoción de nitrógeno inorgánico en comparación con la condición con la FCE mixta.

Capítulo 7

La nitrificación heterótrofa se considera un proceso energéticamente desfavorable, conforme a información bibliográfica. Sin embargo, se ha observado que en condiciones de baja competencia microbiana y elevada exposición a FA (amonio libre tóxico) se favorecería el crecimiento de microorganismos heterótrofos con capacidad de eliminar amonio por nitrificación, actuando como mecanismo de detoxificación.

El desarrollo de gránulos en condiciones de baja competencia microbiana (exceso de OD, N, P y micronutrientes) favoreció probablemente el desarrollo de una comunidad microbiana diversa (nitrificantes autótrofos y heterótrofos, desnitrificantes anóxicos y aeróbicos y bacterias NHDA), lo cual permitió lograr una remoción eficiente de carbono orgánico y nitrógeno para los diferentes efluentes estudiados.

BIBLIOGRAFÍA

- Ab Halim MH, Nor Anuar A, Azmi SI, Jamal NSA, Wahab NA, Ujang Z, Shraim A, Bob MM. (2015) Aerobic sludge granulation at high temperatures for domestic wastewater treatment. *Bioresour Technol.* 185:445–449.
- Adav S.S., Lee D.J., Show K.Y., Tay J.H. (2008) Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnology Advances* 26, 411-423.
- Adav SS, Chen MY, Lee DJ, Ren NQ. (2007a) Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*. *Biotechnol Bioeng*;96:844–52.
- Adav, S.S., Lee, D.J. (2008). Single-culture aerobic granules with *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78:551–557.
- Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J.Y., 2009. Biological nitrification-denitrification
- Ajaz, M., Noor, N., Rasool, S.A., Khan, S.A. (2004) Phenol resistant bacteria from soil: identification, characterization and genetical studies. *Pak J Bot* 36(2):415–424
- Alagha, O., Allazem, A., Bukhari, Alaadin A., Anil, I and Mu'azu, Nuhu.D. (2020). Suitability of SBR for Wastewater Treatment and Reuse: Pilot-Scale Reactor Operated in Different Anoxic Conditions. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 1617; doi:10.3390/ijerph17051617.
- Alayu, E., Yirgu, Z. (2018). Advanced technologies for the treatment of wastewaters from agro-processing industries and cogeneration of by-products: a case of slaughterhouse, dairy and beverage industries, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15 1581–1596, <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1522-9>.
- Alayu, E., Yirgu, Z. (2018). Advanced technologies for the treatment of wastewaters from agro-processing industries and cogeneration of by-products: a case of slaughterhouse, dairy and beverage industries, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15, 1581–1596, <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1522-9>.
- Amador; José, A., George W. (2018). *Characteristics of Wastewater*, Loomis <https://doi.org/10.2134/sbwtreatment.c3> :ASA, CSSA, and SSSA Books.
- Amor L., Eiroa M., Kennes C., Veiga M.C. (2005) Phenol biodegradation and its effect on the nitrification process. *Water Research* 39, 2915–2920.
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* 48(5):835–852.

Bibliografía

- Applegate, C.S.; Wilder, B.; DeShaw, J.R. (1980). Total Nitrogen Removal in a Multichemical Oxidation System. *J. Water Pollut. Control Fed.* 52, 568–577.
- Atieh, M.A. (2014) Removal of phenol from water different types of carbon—a comparative analysis. *APCBEE Procedia.* 2014. 10:136–141. doi:10.1016/j.apcbee.2014.10.031.
- Bajaj, M., Gallert, C., Winter, j. (2009) Treatment of phenolic wastewater in an anaerobic fixed bed reactor (AFBR)-recovery after shock loading, *J. Hazard. Mater.* 162,1330–1339.
- Bardi, L., Molino, E., Fabbian, R., Bertolone, E., Belviso, S., Ambrosoli, R. (2006). Bioremediation of Phenanthrene-Polluted Soils By. *Sci. Ref. Cosm.* 1–7
- Baruah JB. (2011). *Chemistry of phenolic compounds: State of the art.* New York: Nova Science. Publishers, Inc.
- Baskaran, V., Patil, P.K., Antony, M.L. (2020). Microbial community profiling of ammonia and nitrite oxidizing bacterial enrichments from brackishwater ecosystems for mitigating nitrogen species. *Sci Rep* 10, 5201, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62183-9>.
- Bédard, C., and R. Knowles. (1989). Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Rev.* 53:68–84.
- Bedoya. J.A.C. (2012). Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal. Valencia. Tesis doctoral. Universidad politécnica de valencia.
- Belser, L. W., and E. L. Mays. (1980). Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:505–510.
- Beun JJ, Hendriks A, Loosdrecht van MCM, Morgenroth E, Wilderer PA, Heijnen JJ. (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.*33:2283–2290.
- Beun, J.J, Heijnen, JJ, Van Loosdrecht M.C.M. (2001). N-removal in a granular sludge sequencing batch reactor. *Biotechnol Bioeng.* 75:82–92.

Bibliografia

- Beun, J.J., Hendriks, A., Loosdrecht Van, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J. (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 33:2283–2290.
- Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J., (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 33, 2283–2290.
- Bhatt, P., Kumar, M.S., Mudliar, S., Chakrabarti, T. (2007). Biodegradation of chlorinated compounds —a review. *Crit Rev Environ Eng Sci Technol* 2007;37(2):165–78.
- Blackburne, R. (2006). Nitrifying bacteria characterisation to identify and implement factors leading to nitrogen removal via nitrite in activated sludge processes. [PhD Thesis]: The University of Queensland.
- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z.G., Keller, J. (2007). Kinetic characterisation of an enriched *Nitrospira* culture with comparison to *Nitrobacter*. *Water Research* 41 (14), 3033e3042.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B., Witzel, K.P. (2000). Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 673-690.
- Britz, J.T., van Sch alwyk ,C., Hung, Y.T. (2006). Treatment of dairy processing wastewaters. In: Wang LK, Hung YT, Lo HH, Yapijakis C, editors. *Waste treatment in the food processing industry*. Boca Raton, FL, USA: CRC. pp.1–25.
- Bumbac, C., Ionescu, I.A., Tiron, O., Badescu, V.R., (2015). Continuous flow aerobic granular sludge reactor for dairy wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 71 (3), 440–445.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Holmes, S.P. (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 11:2639--43.
- Cammarota, M.C. Teixeira, G.A. Freire, D.M. (2001). Enzymatic pre hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents, *Biotechnology Lett.* 23 , 1591–1595, <https://doi.org/10.1023/A:1011973428489>.

Bibliografia

- Cammarota, M.C., Freire, D.M.G. (2006) A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresour Technol.* 97:2195–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.030>
- Cammarota, M.C., Teixeira, G.A., Freire, D.M (2001). Enzymatic pre hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents, *Biotechnology Lett.* 23 1591–1595, <https://doi.org/10.1023/A:1011973428489>.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A (2011), Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 Suppl 1:4516---22.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 Suppl 1:4516---22.
- Carrera, J., Jubany, I., Carvallo, L., Chamy, R., Lafuente, J. (2004). Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems. *Process Biochemistry*, 39(9), 1159–1165.
- Carvalho F, Prazeres AR, Rivas J (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci Tot Env.*;445-446: 385–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>.
- Carvalho, F., Prazeres, A.R., Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci Tot Env.* 2013;445-446: 385–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- Chen, Q., Ni, J. (2010). Heterotrophic nitrification–aerobic denitrification by novel isolated bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(9), 1305–1310. doi:10.1007/s10295-010-0911-6
- Chen, F.Y., Liu, Y.Q., Tay, J.H., Ning, P. (2015). Rapid formation of nitrifying granules treating high-strength ammonium wastewater in a sequencing batch reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4445–4452. doi:10.1007/s00253-

Bibliografía

- Chen, X., W. Wang, Ye F., Xiao, H. Z. (2014). Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification–aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresour. Technol.* 167, 456–461.
- Cheng, W., Chen, P., Yu, R., Ho, W. (2016). Treating ammonium-rich wastewater with sludge from water treatment plant to produce ammonium alum, *Sustain. Environ. Res.* 26, 63–69, <https://doi.org/10.1016/j.serj.2015.11.002>.
- Cherry, K.A., Shepherd, M., Withers, P.J.A., Mooney, S.J. (2008). Assessing the effectiveness of actions to mitigate nutrient loss from agriculture: A review of methods. *Science of the Total Environment* 406: 1-23.
- Choi, Y., Cha, Y., Kim, B. (2019). Characteristics of bacterial communities in biological filters of full-scale drinking water treatment plants, *J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 91–104. <https://doi.org/10.4014/jmb.1808.07068>.
- Chu, L., Wang, J. (2013). Denitrification performance and biofilm characteristics using biodegradable polymers PCL as carriers and carbon source. *Chemosphere* 91(9), 1310-1316.
- Ciudad, G., Werner, A., Bornhardt, C., Muñoz, C., Antileo, C. (2006) Differential kinetics of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification, *Process Biochem.* 41, 1764–1772. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.032>
- CODEX. (2006-2010) Norma del CODEX para sueros en polvo CODEX STAN 289-1995. Revisión 2003.
- Gokce, N., Hollocher, T.C., Bazylnski, D.A., Jannasch, H.W. (1989). Thermophilic *Bacillus* sp. that shows the denitrification phenotype of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(4), 1023-1025
- Coma, M., Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P.L., 2012. Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* 103, 101–108.
- Correa, C.Z., Marques Cardoso Prates, K.V., Fontes de Oliveira, E., Dias Lopes, D., Barana, A.C. (2018) Nitrification/denitrification of real municipal wastewater in an intermittently aerated structured bed reactor. *J Water Process Eng.* 23:134–141. [doi:10.1016/j.jwpe.2018.03.013](https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.03.013).

Bibliografía

- Corsino, S.F., di Biase, A., Devlin, T.R., Munz, G., Torregrossa, M., Oleszkiewicz, J.A., (2017). Effect of extended famine conditions on aerobic granular sludge stability in the treatment of brewery wastewater. *Bioresour. Technol.* 226, 150–157.
- Dandie, C.E., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Trevors, J.T., Goyer, C. (2007). Analysis of denitrification genes and comparison of nosZ, cnorB and 16S rDNA from culturable denitrifying bacteria in potato cropping systems. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 128–138
- Dapena A., Campos J.L., Mosquera A., Mendez R. (2006) Anammox process for nitrogen removal from anaerobically digested fish canning effluents. *Water Sci. Technol.* 53, 265–274.
- De Araujo, F., y Cozzi, F.M. (2016) .Desarrollo de una bebida ácida a base de proteína de suero en polvo. Trabajo final de grado. Universidad Argentina de la empresa, Argentina.
- de Kreuk, M.K.C.P., Hosseini, M., Xavier, J.B., Van Loosdrecht, M.C.M. (2007b) Kinetic model of a granular sludge SBR: influences on nutrient removal. *Biotechnol Bioeng* 97:801–815.
- De Kreuk, M.K., De Bruin, L.M.M., Van Loosdrecht, M.C.M., (2005^a). Aerobic granular sludge: from idea to pilot plant. In: Bathe, S., De Kreuk, M.K., Mc Swain, B.S., Schwarzenbeck, N. (Eds.), *Aerobic Granular Sludge*. IWA, London, UK, pp. 111-123.
- de Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M. (2005). Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnol Bioeng.* 90:761–769
- De Sanctis, M., Beccari, M., Di Iaconi, C., Majone, M., Rossetti, S., Tandoi, V. (2013). Study of performances, stability and microbial characterization of a Sequencing Batch Biofilter Granular Reactor working at low recirculation flow. *Bioresource Technology*, 129, 624–628.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M., Verstraete, W. (2001). Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ. Microbiol.* 3, 649–657. doi:10.1046/j.1462- 2920.2001.00236.x
- Demirel, B., Yenigun, O., Onay, T.T. (2005). Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *Process Biochem.* 40:2583–95.<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.015>

Bibliografía

- Devlin, T.R., di Biase, A., Kowalski, M., Oleszkiewicz, J.A., (2017) Granulation of activated sludge under low hydrodynamic shear and different wastewater characteristics. *Bioresour. Technol.* 224, 229–235.
- Dini-Andreote, F., Brossi, M. J. de L., van Elsas, J. D., Salles, J. F. (2016). Reconstructing the Genetic Potential of the Microbially-Mediated Nitrogen Cycle in a Salt Marsh Ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Duarte R., Meléndez L., Colmenarez K., Malandrino A., Matute S., Noguera R. (2014). Niveles de concentración de nitritos y nitratos en salchichas y jamones. *Revista del Colegio de médicos veterinarios del Estado Lara Año 4. N°2. Vol.8.*
- Dutta, A., Sarkar, S. (2015). Sequencing batch reactor for wastewater treatment: recent advances, *Curr Pollution Rep.* 1 177–190, <https://doi.org/10.1007/s40726-015-0016-y>.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves the sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, vol. 27(16): 2194-2200.
- Ekama, G.A. Dold, P.L. and G.V.R. Marais, (1986) Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge systems, *Water Sci. Technol.* 18 pp. 91–114.
- Ekama, G.A., Dold, P.L. and G.V.R. (1986) Marais, Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge systems, *Water Sci. Technol.* 18 pp. 91–114.
- Englande, A. J., Krenkel, P., Shamas, J. (2015). *Wastewater Treatment & Water Reclamation*☆. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.09508-7 url to share this paper: [sci-hub.tw/10.1016/B978-0-12-409548-9.09508-7](https://www.sci-hub.tw/10.1016/B978-0-12-409548-9.09508-7).
- Fadin JF (1980) Prueba de reducción del nitrato. En *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, pp.142-147. Buenos Aires, Ed. Panamericana
- Fang, H.H.P. and Yu, H.Q. (2001) Acidification of lactose in wastewater. *Journal of Environmental Engineering* 127, 825– 831

Bibliografía

- FAO (2011). The State of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, Londres, Reino Unido.
- Farizoglu, B., Keskinler, B., Yildiz, E., Nuhoglu, A. (2006). Simultaneous removal of C, N, P from cheese whey by jet loop membrane bioreactor (JLMBR). *J Hazard Mater.* 146:399–407. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.051>
- Federhen S. (2012) The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Res.* 40:D136–43.
- Feng, C., Huang, L., Yu, H., Yi, X., Wei, C. (2015). Simultaneous phenol removal, nitrification and denitrification using microbial fuel cell technology. *Water Res.* 76, 160–170. [10.1016/j.watres.2015.03.001](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.001)
- Féray, C., Montuelle, B. (2003). Chemical and microbial hypotheses explaining the effect of wastewater treatment plant discharges on the nitrifying communities in freshwater sediment. *Chemosphere*, 50(7), 919–928.
- Finster, K.W., Herbert, R.A., Lomstein, B.A. (2009) *Spirosoma spitsbergense* sp. nov. and *Spirosoma luteum* sp. nov., isolated from a high Arctic permafrost soil, and emended description of the genus *Spirosoma*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 839–844. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.002725-0>.
- Forero, Ortix y Ríos (2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. *Ciencia, tecnología y futuro*. Colombia.
- Franca, R.D.G., Pinheiro, H.M, van Loosdrecht, M.C.M, Lourenço N.D (2018) Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. *Biotechnol Adv* 36:228–246.
- Fux, C., Bohler, M., Huber, P.I. (2002). Brunner, H. Siegrist, Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant, *J. Biotechnol.* 99 295–306, [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00220-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00220-1).
- Gao. D., Liu. L, Liang. H, Wu W-M. (2011). Comparison of four enhancement strategies for aerobic granulation in sequencing batch reactors. *J Hazard Mater.* 186:320–327.

Bibliografia

- Gautam, Rajneesh- Islamuddin, Islamuddin, More, N.(2019) - SBR Technology and Role of Aerobic Granular Sludge in Biological Treatment of Wastewater, - International Journal of Scientific Research 3 (11)
- Gautam, Rajneesh- Islamuddin, Islamuddin, More, N.(2019). SBR Technology and Role of Aerobic Granular Sludge in Biological Treatment of Wastewater, - International Journal of Scientific Research, 3 (11).
- Gernaey, K., Petersen, B., Nopens, I, Comeau, Y., Vanrolleghem, P.A. (2002). Modelling aerobic carbon source degradation processes using titrimetric data and combined respirometric-titrimetric data: I. Experimental data and model structure. *Biotech. Bioeng.* 79, 741-753.
- Ghaly, A.E., Tango, M.S.A., Adams, M.A. (2003) Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition. *Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of Scientific Research and Development*. Manuscript FP 02 009.
- Ghanavati, H., Emtiazi, G., & Hassanshahian, M. (2008). Synergism effects of phenol-degrading yeast and ammonia-oxidizing bacteria for nitrification in coke wastewater of Esfahan Steel Company. *Waste Management & Research*, 26(2), 203–208. doi:10.1177/0734242x07079874
- Ginestet, P., Audic, J.M., Urbain, V., Block, J.C. (1998). Estimation of Nitrifying Bacterial Activities by Measuring Oxygen Uptake in the Presence of the Metabolic Inhibitors Allylthiourea and Azide. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2266–2268. doi:10.1128/aem.64.6.2266-2268.1998
- Gonzalez, M.A., Muñoz, P.B., Rodriguez, S.A., Maza, M.P., Mikola, A., Gonzalez, L.J, Vahala, R. (2017). Start-up and operation of an aerobic granular sludge system under low working temperature inoculated with cold-adapted activated sludge from Finland. *Bioresour Technol.* 239:180–189.
- Green, S.J., Prakash, O., Gihring, T.M., Akob, D.M, Jasrotia, P., Jardine, P.M., Watson, D.B., Brown, S.D., Palumbo, A.V., Kostka, J.E. (2010). Denitrifying bacteria from the terrestrial subsurface exposed to mixed waste contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3244–3254.

Bibliografía

- Guido, B., Silvia, B., Carlo, R., Laura, A. (2008). Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments, *J. Hazard. Mater.* 160 (2–3) 65–288.
- Guisasola, A., Vargas, M., Marcelino, M., Lafuente, J., Casas, C., Baeza, J.A. (2007). On-line monitoring of the enhanced biological phosphorus removal process using respirometry and titrimetry, *Biochemical Engineering Journal*, 35(3), 371–379.
- Guo, X., Kim, J.H., Behera, S.K. (2008). Influence of dissolved oxygen concentration and aeration time on nitrite accumulation in partial nitrification process. *Int J Environ Sci Technol.* 5:527–534. doi:10.1007/BF03326050
- Guo, F., Zhang, S.H., Yu, X., Wei, B. (2011) Variations of both bacterial community and extracellular polymers: the inducements of increase of cell hydrophobicity from biofloc to aerobic granule sludge. *Bioresour Technol.*;102:6421–6428.
- Hassan, A.N., Nelson, B.K (2012). Invited review: anaerobic fermentation of dairy food wastewater, *J. Dairy Sci.* 95, 6188–6203, <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5732>.
- Hassan, A.N., Nelson, B.K. (2012). Invited review: anaerobic fermentation of dairy food wastewater, *J. Dairy Sci.* 95.6188–6203, <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5732>.
- Hazen and Sawyer. (2011). Memoria técnica de la selección justificada de tres sistemas de tratamiento viables. Bogota. Retrieved from <https://www.car.gov.co/uploads/files/5aec91983d9dd.pdf> iagua.
- He, T. X., Zhen, L. L., Quan, S., Yi, X., Qing, Y., (2016). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion. *Bioresour. Technol.* 200, 493–499.
- He, T., Ye, Q., Sun, Q., Cai, X., Ni, J., Li, Z. and Xie, D. (2018) Removal of nitrate in simulated water at low temperature by a novel psychrotrophic and aerobic bacterium, *Pseudomonas taiwanensis* strain. *J Bio-Med Res Int* 2018, 1–9
- Henriot, O., Meunier, C., Henry, P., Mahillon, J. (2016). Improving phosphorus removal in aerobic granular sludge processes through selective microbial management. *Bioresour. Technol.* 211, 298–306.
- Henze M., Harremoës P., Jansen J. C., Arvin E. (1996). Basic biological processes. *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*, 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin.

Bibliografía

- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J. M. (2019). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*. doi:10.1016/j.ram.2019.06.003.
- Hiraishi, A., Khan, S. T. (2003) Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment. *Appl Microbiol and Biotechnol*. 61(2), 103-109.
- Hocaoglu, S. M., Insel, G., Cokgor, E. U., Orhon, D. (2011). Effect of low dissolved oxygen on simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor treating black water. *Bioresource Technology*, 102(6), 4333–4340. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.096
- Holmes, D. E., Dang, Y., Smith, J. A. (2018). Nitrogen cycling during wastewater treatment. *Advances in Applied Microbiology*. doi:10.1016/bs.aambs.2018.10.003
url to share this paper: sci-hub.tw/10.1016/bs.aambs.2018.10.003.
- Horn, M.A., Ihssen, J., Matthies, C., Schramm, A., Acker, G, Drake, H.L. (2005) *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1255–1265. doi:10.1099/ijs.0.63484-0.
- Hu. L., Wang. J., Wen, X., Qian, Y. (2005). The formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactor (SBR) by seeding anaerobic granules. *Process Biochem* 2005;40:5–11.
- Huang, H.K. and Tseng, S.K. (2001) Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 90–94
- Hugh, R., Leifson, E., (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. *J. Bacteriol* 24–26.
- Hulshoff Pol, L.W. (1989) The phenomenon of granulation of anaerobic sludge. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- Husain, I.A., Alkhatib, M., Jamm, M.S., Mirghani, M.E., Bin Zainudin, Z., and Hoda., A. (2014). Problems, control, and treatment of fat, oil, and grease (FOG): A review. *J. Oleo Sci*. 63:747– 752. doi:10.5650/jos.ess13182

Bibliografía

- Hussain, A., Dubey, S. K., Kumar, V. (2015). Kinetic study for aerobic treatment of phenolic wastewater. *Water Resources and Industry*, 11, 81–90. doi:10.1016/j.wri.2015.05.002.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2015). Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat *The Lancet Oncology*, Published online 26 October. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1).
- Janczukowicz, W., Zieliński, M., Dębowski, M. (2008). Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. *Bioresour Technol*. 99:4199–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.077>
- Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J. and Zhang, H. (2015) Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years. *Biotechnol Bioprocess Eng* 20, 643–651.
- Jemaat, Z., Suárez-Ojeda, M.E., Pérez, J., Carrera, J. (2014). Partial nitrification and o-cresol removal with aerobic granular biomass in a continuous airlift reactor. *Water Res*. 48, 540 354-362.
- Jemaat, Z., Suárez-Ojeda, M.E., Pérez, J., Carrera, J. (2013). Simultaneous nitrification and p-nitrophenol removal using aerobic granular biomass in a continuous airlift reactor. *Bioresour. Technol*. 150, 307-313.
- Jian, H.L., Tay, J.L, Tay, S.T.L (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 63:602-608.
- Jiang Y, Shang Y, Wang H, Yang K. (2016). Rapid formation and pollutant removal ability of aerobic granules in a sequencing batch airlift reactor at low temperature. *Environ Technol*. 37:3078–3085.
- Jin, X., Wang, F., Liu, G., & Liu, Y. (2012). Characteristics of denitrifying granular sludge grown on nitrite medium in an upflow sludge blanket (USB) reactor. *Water Science and Technology*, 65(8),
- Kafilzadeh, F., Farhangdoost, M.S., Tahery, Y. (2010) Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. *Afr J Biotechnol* 9(40):6721–6726

Bibliografia

- Karadag D, Koroğlu OE, Ozkaya B, Cakmakci M. (2015). A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. *Process Biochem.* 50:262–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.11.005>.
- Karadag, D., Koroğlu, O.E., Ozkaya, B., Cakmakci, M. (2015). A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. *Process Biochem.* 2015;50:262–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.11.005>
- Kazemi, P., Peydayesh, M., Bandegi, A., Mohammadi, T., Bakhtiari, O. (2014). Stability and extraction study of phenolic wastewater treatment by supported liquid membrane using tributyl phosphate and sesame oil as liquid membrane. *Chem Eng Res Des.* 92:375–83.
- Khan, S.T., Hiraishi, A. (2002). *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48, 299–308. <https://doi.org/10.2323/jgam.48.299>.
- Khan, S.T.H., Hiraishi, A. (2002). *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 48, 299–308. <https://doi.org/10.2323/jgam.48.299>.
- Khursheed, A.; Gaur, R.Z.; Sharma, M.K.; Tyagi, V.K.; Khan, A.A.; Kazmi, A.A. (2018) Dependence of enhanced biological nitrogen removal on carbon to nitrogen and rbCOD to sbCOD ratios during sewage treatment in sequencing batch reactor. *J. Clean Prod.* 171, 1244–1254.
- Kim D-J, Lee D-I, Keller J. (2006). Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresour Technol.* 97:459– 468. [doi:10.1016/j.biortech.2005.03.032](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.032)
- Kim, M., Jeong, S., Yoon, S.J., Cho, S.J., Kim, Y.H., Kim, M.J., Ryu, E.Y., Lee, S., (2008a). Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *J. Biosci. Bioeng.* 106(5), 498-502
- Kim, D., Hofstaedter, C. E., Zhao, C., Mattei, L., Tanes, C., Clarke, E., Conrad, M. (2017). Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome*, 5(1), 52.
- Kim, I.T., Lee, Y.E., Yoo, Y.S., Jeong, W., Yoon, Y.H., Shin, D.C., Jeong, Y. (2019). Development of a Combined Aerobic–Anoxic and Methane Oxidation Bioreactor

Bibliografia

- System Using Mixed Methanotrophs and Biogas for Wastewater Denitrification. *Water*, 11(7), 1377. doi:10.3390/w11071377 url to share this paper: sci-hub.tw/10.3390/w11071377
- Kim, M., Jeong, S.Y., Yoon, S.J., Cho, S.J., Kim, Y.H., Kim, M.J. and Lee, S.J. (2008) Aerobic denitrification of *Pseudomonas putida* AD-21 at different C/N ratios. *J Biosci Bioeng* 106, 498–502.
 - Kinh, C. T., Ahn, J., Suenaga, T., Sittivorakulpong, N., Noophan, P., Hori, T., Terada, A. (2016). Free nitrous acid and pH determine the predominant ammonia-oxidizing bacteria and amount of N₂O in a partial nitrifying reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1673–1683. doi:10.1007/s00253-016
 - Kocaturk, I., Erguder, T.H. (2015). Investigation of the use of aerobic granules for the treatment of sugar beet processing wastewater. *Environ. Technol.* 36, 2577–2587.
 - Kopylova E., Noé, L., Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28:3211–3217. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts611>.
 - Krishnani, K.K., Ayyappan, S. (2006). Heavy metals remediation of water using plants and lignocellulosic agrowastes. *Rev Environ Contam Toxicol.* 188:59-84. doi: 10.1007/978-0-387-32964-2_2. PMID: 17016916.
 - Kulkarni, S.J., Kaware, J.P. (2013). Review on research for removal of phenol from wastewater. *Int J Sci Res Publ.* 3:1–4.
 - Kushwaha, J.P., Srivastava, V.C., Mall. I.D. (2011). An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51 442–452, <https://doi.org/10.1080/10408391003663879>.
 - Lakha, S., Shannon, K.E., Henderson, S.L., Goyer, C., Trevors, J.T., Zebarth, B.J. and Burton, D.L. (2009) Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*. *Appl Environ Microbiol* 75, 3903–3911
 - Law, Y., Ye, L., Pan, Y., Yuan, Z. (2012). Nitrous oxide emissions from wastewater treatment processes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1593), 1265–1277. doi:10.1098/rstb.2011.0317 url to share this paper: sci-hub.tw/10.1098/rstb.2011.0317

Bibliografia

- Layer, M., Villodres, M. G., Hernandez, A., Reynaert, E., Morgenroth, E., & Derlon, N. (2020). Limited simultaneous nitrification-denitrification (SND) in aerobic granular sludge systems treating municipal wastewater: Mechanisms and practical implications. *Water Research X*, 100048. doi:10.1016/j.wroa.2020.100048
- Li Y, Liu Y, Shen L, Chen F. (2008). DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications. *Enzyme Microb Technol* 43(4–5):349–54.
- Li, D., Liang, X., Jin, Y., Wu, C. and Zhou, R. (2018) Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying-denitrifying bacterium, *Klebsiella* sp. TN-10. *Appl Biochem Biotechnol* 1–15
- Li, H., Zhou, B., Tian, Z. (2015). Efficient biological nitrogen removal by Johannesburg- Sulfur autotrophic denitrification from low COD / TN ratio municipal wastewater at low temperature, *Environ. Earth Sci.* (2015) 5027–5035, <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4231-z>.
- Lin, Y., de Kreuk, M., van Loosdrecht, M.C.M., Adin, A., (2010). Characterization of alginate- like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant. *Water Res.* 44 (11), 3355–3364.
- Liu Y, Tay JH. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res* 36(7):338–46.
- Liu, Q., Singh, V. P., Fu, Z., Wang, J., Hu, L. (2017). An anoxic-aerobic system for simultaneous biodegradation of phenol and ammonia in a sequencing batch reactor. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(12), 11789–11799. doi:10.1007/s11356-017-8840-9
- Liu, Y., Ngo, H.H., Guo, W, (2019). The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: a review. *Environ Int.* 123:10–19. doi:10.1016/j.envint.2018.11.039
- Liu, Y., Tay J.H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res*;36:1653–65 (24).
- Liu, Y., Tay, J. (2006). Variable aeration in sequencing batch reactor with aerobic granular sludge, *Journal of Biotechnology*. 124, 338–346.
- Liu, Y., Yang, S.F., Tay, J.H. (2004). Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. *J Biotechnol.* 108:161–169.

Bibliografía

- Liu, Y.Q., Tay J.H., Ivanov, V., Moy, B.Y.P., Yu. L., Tay S.T.L. (2005) Influence of phenol on nitrification by microbial granules. *Process Biochem.* 40, 3285–3289.
- Liu, Y., Tay. J.H. (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment, *Biotechnol. Adv.* 22 533–563. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.05.001>.
- Lochmatter, S., Holliger, C., (2014). Optimization of operation conditions for the startup of aerobic granular sludge reactors biologically removing carbon, nitrogen, and phosphorus. *Water Res.* 59, 58–70.
- Lopina, O. D. (2017). Enzyme Inhibitors and Activators. *Enzyme Inhibitors and Activators*. doi:10.5772/67248
- Lotito, A.M., De Sanctis, M., Di Iaconi, C., Bergna, G., (2014). Textile wastewater treatment: aerobic granular sludge vs activated sludge systems. *Water Res.* 54, 337–346.
- Ludzack, F.J.; Ettinger, M.B. (1961). Controlling Operation to Minimize Activated Sludge Effluent Nitrogen. *J. Water Pollut. Control Fed.* 34, 920–931.
- Luo, J., Hao, T., Wei, L., Mackey, H. R., Lin, Z., Chen, G.H. (2014). Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge. *Water Research*, 62, 127–135. doi:10.1016/j.watres.2014.05.037.
- Ma, J., Yang, Q., Wang, S., Wang, L., Takigawa, A., Peng, Y. (2010). Effect of free nitrous acid as inhibitors on nitrate reduction by a biological nutrient removal sludge. *Journal of Hazardous Materials* 175 (1e3), 518e523
- Mahugo, S. C., Sosa. F.Z., Torres, P. EM, Santana, R. JJ. (2009) Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules.* 14(1): 298–320. doi:10.3390/molecules14010298.
- Mahugo-Santana, C., Sosa Ferrera, Z., Torres Padrón, E.M., Santana Rodríguez, J.J. (2009). Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. *Molecules.* 14(1): 298–320. doi:10.3390/molecules14010298.
- Marrot, B., Barrios-Martinez, A., Moulin, P., Roche, N. (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor, *Biochem. Eng. J.* 30 (2) 174–183.

Bibliografía

- Maszenan, A. M., Liu, Y., Ng, W. J. (2011). Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. *Biotechnology Advances*, 29(1), 111–123.
- Maszenan, A.M., Liu. Y., Ng., WJ. (2011). Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. *Biotechnol Adv.* ;29:111–123.
- McSwain Sturm B.S., Irvine RL. (2008) Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. *Water Sci Technol.* ;58:81–787.
- McSwain, B., Irvine, R. (2008). Dissolved oxygen as a keyparameter to aerobic granule formation. *Water Sci. Technol.* 58(4), 781-787.
- Mercier, C., Boyer, F., Bonin, A., Coissac, E. (2013). SUMATRA and SUMACLUST: fast and exact comparison and clustering of sequences. Available: <https://git.metabarcoding.org/obitools/sumaclust>.
- Metcalf and Eddy, Inc. (1995). Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Volumen 2. Mc Graw-Hill.
- Metcalf and Eddy, Inc. (1995). Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Volumen 2. Mc Graw-Hill.
- Miao, L., Wang, S., Li, B., Cao, T., Zhang, F., Wang, Z., Peng. Y. (2016). Effect of carbon source type on intracellular stored polymers during endogenous denitritation (ED) treating land fi ll leachate, *Water Res.* 100, 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.010>.
- Michałowicz, J., Duda, W. (2007). Phenols – sources and toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3), 347-62.
- Motlagh, A. M., Goel, R. K. (2014). Sustainability of Activated Sludge Processes. *Water Reclamation and Sustainability*, 391–414. doi:10.1016/b978-0-12-411645-0.00016-x.
- Murray, K.T., Sheeba M., y Bodour, A. (2010). Review prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. En: *Environmental Pollution*. ol. 158, p. 3462-3471.
- Muthusamy, A. and Jayabalan, N. (2001). Effect of factory effluent on physiological and biochemical contents of *Gossypium hirsutum* L. *J. Enviorn. Biol.* 22(4): 237-242.

Bibliografia

- Muthusamy, A. and Jayabalan, N. (2001). Effect of factory effluent on physiological and biochemical contents of *Gossypium hirsutum* L. *J. Environ. Biol.* 22(4): 237-242.
- Nadais, M.H.G.A.G., Capela, M.I.A.P.F., Arroja, L.M.G.A., Hung, Y.T. (2010). Anaerobic treatment of milk processing wastewater. In: Wang LK, Tay JH, Tay STL, Hung YT, editors. *Handbook of environmental engineering*, vol. 11. Environmental bioengineering. New York, NY, USA: Humana Press, Springer. pp. 555–618. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-031-1_17
- Nancharaiah, Y. V., Kiran Kumar Reddy, G. (2018). Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresource Technology*, 247, 1128–1143. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.131.
- Nancharaiah, Y.V., Venkata Mohan, S., Lens, P.N., (2016). Recent advances in nutrient removal and recovery in biological and bioelectrochemical systems. *Bioresour. Technol.* 215, 173–185.
- Naushad, S., Adeolu, M. ., Wong, S., Sohail, M., Schellhorn, H.E., Gupta, R.S. (2015). A phylogenomic and molecular marker based taxonomic framework for the order Xanthomonadales: proposal to transfer the families Algiphilaceae and Solimonadaceae to the order Nevskiales ord. nov. and to create a new family within the order Xanthomonadales, the family Rhodanobacteraceae fam. nov., containing the genus *Rhodanobacter* and its closest relatives, *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 467–485. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0344-8>.
- Newton, W., Fisher, K. (2002). Nitrogen Fixation- A General Overview in *Nitrogen Fixation at the Millenium*. G. Jeffery Leigh, Editor. Elsevier Publications. P 1-32.
- Nkonge, C., Balance, M., (1982). A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in Micro-Kjeldahl digests. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 30, 416-420.
- Noorjahan, C.M., Dawood Sharief, S. and Nausheen Dawood Jr., (2004). Characterization of dairy effluent of Industrial Pollution Control 20 (1) pp. 131 -136
- Novinscak, A., Goyer, C., Zebarth, B.J. (2016). Novel p450nor gene detection assay used to characterize the prevalence and diversity of soil fungal denitrifiers. *Appl Environ Microbiol* 82: 4560-9.
- NSF International. (2017). NSF/ANSI 40: Residential onsite systems. NSF, Ann Arbor, MI.

Bibliografía

- Obaja, D., Mace, S. and Mata-Alvarez, J. (2005) Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. *Bioresour Technol* 96, 7–14
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., Reis, M.A.M. (2007). Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res.* 41, 2271–2300
- O'Flaherty, V., Lens, P.N.L., de Beer, D. and Colleran, E. (1997) Effect of feed composition and upflow velocity on aggregate characteristics in anaerobic upflow reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47, 102– 107.
- Ontiveros, G.A., Alberto. L., Campanella, E.A. (2010). Evaluación del Comportamiento de PPCP's en Dos Procesos: Ludzack-Ettinger y Ludzack-Ettinger Modificado; AIDIS Argentina; Ingeniería Sanitaria y Ambiental; 107; 32-35.
- Orhon D., Artan N. (1994) Modelling of activated sludge systems. Technomic Publishing Company, Inc., USA.
- Orozco, A (2005). Bioingeniería de aguas residuales. Teoría y diseño
- Page, A.J., Cummins, C.A, Hunt, M., Wong V.K., Reuter, S, Holden M.T, Fookes M, Falush, D., Keane, J.A., Parkhill, J. Roary: (2015): Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 31:3691---3, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.
- Papen, H., von Berg, R., Hinkel, I., Thoene, B., Rennenberg H. (1989). Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO₂-, NO₃-, N₂O, and NO production in exponentially growing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(8), 2068-2072.
- Pat, A. M., Vargas, A., Buitrón, G. (2011). Practical automatic control of a sequencing batch reactor for toxic wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 63(4), 782–788. doi:10.2166/wst.2011.309.
- Peng, .Y, Zhu, G. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl Microbiol Biotechnol.* 006;73:15–26. doi:10.1007/ s00253-006-0534-z
- Peter, F., Jones, E. y Johnson, K. (1973). "Estimation of Phenols by the 4-Aminoantipyrine Method. II.Products from para-Substituted Alkylphenols." *Canadian Journal of Chemistry* 51: 3733-3738.

Bibliografía

- Petersen, J., Kemper, A., Gruber-Vodicka, H., Cardini, U., van der Geest, M., Kleiner, M., et al. (2016). Chemosynthetic symbionts of marine invertebrate animals are capable of nitrogen fixation. *Nature Microbiology*, 2, 16195. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.195>
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590..
- Plósz, B.G., Jobbágy, A., Grady Jr., C.P.L. (2003). Factors influencing deterioration of denitrification by oxygen entering an anoxic reactor through the surface. *Water Res.* 37, 853–863.
- Pradeep, N. V., Anupama, S., Navya, K., Shalini, H. N., Idris, M., Hampannavar, U. S. (2014). Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review. *Applied Water Science*, 5(2), 105–112
- Prakash, O., Green, S.J., Jasrotia, P., Overholt, W.A., Canion, A., Watson, D.B., Brooks, S.C., Kostka, J.E. (2011). Description of *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated aquifer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi: 10.1099/ijs.0.035840-0.
- Prasad, S.B.C., Babu, R.S., Chakrapani, R., Ramachandra Rao, C.S.V. (2010) Kinetics of high concentrated phenol biodegradation by *Acinetobacter baumannii*. *Int J Biotechnol Biochem* 6(4):609–615
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). Cheese whey management : a review, *J. Environ. Manage.* 110 48–68, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.
- Pronk M, de Kreuk MK, de Bruin B, Kamminga P, Kleerebezem R, van Loosdrecht MCM (2015). Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment. *Water Res* 84:207– 217
- Quasim, W., Mane, A.V. (2013). Characterization and treatment of selected food industrial effluents by coagulation and adsorption techniques. *Water Res Ind.* 4:1–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wri.2013.09.005>
- Radovic, L.R., Moreno-Castilla, C., Rivera-Utrilla, J., in: L.R. Radovic (Ed.). (2000). *Carbon Materials as Adsorbents in Aqueous Solutions Chemical and Physical Carbon*, vol. 27, Marcel Dekker, New York, pp. 224–22.

Bibliografía

- Rajta, A., Bhatia, R., Setia, H Pathania, P. (2019). Role of heterotrophic-aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/jam.14476.
- Ramírez, E. E. P., Asunción, M. de la L., Rivalcoba, V. S., Hernández, A. L. M., Santos, C. V. (2018). Removal of Phenolic Compounds from Water by Adsorption and Photocatalysis. *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*. doi:10.5772/66895.
- Ramos A.F., Gómez M.A., Hontoria E., González-López J. (2007) Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor. *Journal of Hazardous Materials* 142, 175–183.
- Raza, W., Lee, J., Raza, N., Luo, Y., Kim, K.-H., Yang, J. (2018). Removal of phenolic compounds from industrial waste water based on membrane-based technologies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. doi:10.1016/j.jiec.2018.11.024.
- Reckhow, D. A.; Linden, K. G.; Kim, J.; Shemer, H. y Makdissy, G. (2010). Effect of UV treatment on DBP formation. *J. Am. Water Works Assoc.* 102: 100-113.
- Renou, S., Givaudan, J.G., Poulain, S., Dirassouyan, F., Moulin, P. (2008). Landfill leachate treatment : Review and opportunity, *J. Hazard. Mater.* 150, 468–493, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.077>.
- Rezakazemi, M., Maghami, M., & Mohammadi, T. (2018). Wastewaters treatment containing phenol and ammonium using aerobic submerged membrane bioreactor. *Chemistry Central Journal*, 12(1). doi:10.1186/s13065-018-0450-1
- Robertson, L.A., Van Niel, E.W., Torremans, R.A. and Kuenen, J.G. (1988) Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl Environ Microbiol* 54, 2812–2818
- Rodas Hernández M. (2005) Determinación de la concentración de nitritos y nitratos en salchicha ofertada que se comercializa en los supermercados de la ciudad capital (tesis) Disponible en biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2382.pdf.
- Rodríguez-Gómez, L. E., Rodríguez-Sevilla, J., Hernández, A., Álvarez, M. (2019). Factors affecting nitrification with nitrite accumulation in treated wastewater by oxygen injection. *Environmental Technology*, 1–13.

Bibliografia

- Rosa, D.R., Duarte, I.C.S., Saavedra, N.K., Varesche, M.B., Zaiat, M., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G. (2009). Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis, *Bioresour. Technol.* 100, 6170–6176, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.089>.
- Rosenwinkel, K.H., Austermann-Haun, U., Meyer, H. (2005). Industrial wastewater sources and treatment strategies. In: Jördening HJ, Winter J, editors. *Environmental biotechnology: concepts and applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp. 69–70.
- Rosman, N. H., Nor Anuar, A., Chelliapan, S., Md Din, M. F., Ujang, Z. (2014). Characteristics and performance of aerobic granular sludge treating rubber wastewater at different hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 161, 155–161. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.047.
- Ruiz, G., Jeison, D., Chamy, R. (2003). Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Res.* 37:1371–1377. doi:10.1016/S0043-1354(02)00475-X
- Salari, M., Dehghani, M. H., Azari, A., Motevalli, M. D., Shabanloo, A., & Ali, I. (2019). High performance removal of phenol from aqueous solution by magnetic chitosan based on response surface methodology and genetic algorithm. *Journal of Molecular Liquids*. doi:10.1016/j.molliq.2019.04.065
- Santos, A., Yustos, P., Durban, B., Garcia-Ochoa, F. (2001). Catalytic wet oxidation of phenol: kinetics of the mineralization rate. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 40(13):2773–2781. doi:10.1021/ie001129k.
- Sarkar, B., Chakrabarti, P.P., Vij aykumar A., Kale, V. (2006). Wastewater treatment in dairy industries – possibility of reuse. *Desalination*. 195:141–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2005.11.015>.
- Sarkar, B., Chakrabarti, P.P., Vij aykumar, A., Kale, V. (2006). Wastewater treatment in dairy industries – possibility of reuse. *Desalination*. 195:141–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2005.11.015>
- Sarma, S.J., Tay, J.H., Chu, A.. (2017). Finding Knowledge Gaps in Aerobic Granulation Technology. *Trends Biotechnol.* 35 (1), 66–78.

Bibliografia

- Schlesinger, W.H. (2009). On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proceedings of National Academy of Sciences*, PNAS 106: 203-208
- Schweitzer, L., Noblet, J. (2018). Water Contamination and Pollution. *Green Chemistry*, 261–290. doi:10.1016/b978-0-12-809270-5.00011-x url to share this paper:sci-hub.tw/10.1016/B978-0-12-809270-5.00011-X.
- Senecah, L. S. (2004). "Greenpeace" Pollution A to Z. New York, The Gale Group Inc
- Seviour, T., Pijuan, M., Nicholson, T., Keller, J., Yuan, Z.G. (2009). Gel forming expolysaccharide explain basic differences between structures of aerobic granules and flocculent sludges. *Water Res* 2009;43(18):4469–78.
- Shannon, C. (1948). The mathematical theory of communication. En: *The mathematical theory of communication*. Shannon C.E. y Weaver W. (Ed). University of Illinois Press Urbana. p. 29-125.
- Silke Falk, Binbin Liu, Gesche Braker. (2010). Isolation, genetic and functional characterization of novel soil nirK-type denitrifiers. *Systematic and Applied Microbiology*. 33, 337-347
- Silke, F., Binbin, L., Gesche, B. (2010). Isolation, genetic and functional characterization of novel soil nirK-type denitrifiers. *Systematic and Applied Microbiology*. 33, 337-347.
- Singureanu, C., Woinaroschy, A. (2017). Contents nitrogen removal in wastewater treatment processes. *Jour Bulletin of Romanian Chemical Engineering Society*. Vol 4, 13:20
- Sirivedhin, T., Gray, K. A. (2006). Factors affecting denitrification rates in experimental wetlands: Field and laboratory studies. *Ecological Engineering*, 26(2), 167–181.
- Slavov, K.A. (2017). Dairy Wastewater Treatment Review, *Food Technol. Biotechnol.* 55 (1) 14–28 (2017). ISSN 1330-9862. doi: 10.17113/ft b.55.01.17.4520
- Sobiesiak, M. (2017). Chemical Structure of Phenols and Its Consequence for Sorption Processes. *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*. doi:10.5772/66537 url to share this paper: sci-hub.tw/10.5772/66537.
- Solomons, T.W.G. (2014). *Organic Chemistry*. 11th ed. New York: John Wiley and Sons Incorporated.

Bibliografia

- Speth, D.R., Hu, B., Bosch, N., Keltjens, J.T., Stunnenberg, H.G., Jetten, M.S.M. (2012). Comparative genomics of two independently enriched “*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*” anammox bacteria, *Front. Microbiol.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00307>.
- Srivastava, M., Kaushik, M. S., Singh, A., Singh, D., & Mishra, A. K. (2016). Molecular phylogeny of heterotrophic nitrifiers and aerobic denitrifiers and their potential role in ammonium removal. *Journal of Basic Microbiology*, 56(8), 907–921. doi:10.1002/jobm.201500689
- Stanford, G., Dzienia, S., Van der Pol, R., (1975). Effect of temperature on denitrification rate in soils. *J. Soil Sci. Soc. Am.* 39, 867–870
- Stein, Lisa (2011). Heterotrophic nitrification and nitrifier denitrification 95-114. 10.1128/9781555817145.ch5. *Journal Nitrification*.
- Suja, E., Nancharaiah, Y.V., Krishna Mohan, T.V., Venugopalan, V.P., (2015). Denitrification accelerates granular sludge formation in sequencing batch reactors. *Bioresour. Technol.* 196, 28–34.
- Surmacz-Gorska, J. K., Gernaey, C., Demuyne, P., Vanrolleghem, and W. Verstraete. (1995). Nitrification process control in activated sludge using oxygen uptake rate measurements. *Environ. Technol.* 16:569–577.
- Sutton, Mark A., Howarth, C.M., Erisman, J.W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., Van Grinsven, H and Grizzetti, B. (2011). Assessing our nitrogen inheritance. The European Nitrogen Assessment, Published by Cambridge University Press.
- Szabó E, Liébana R, Hermansson M, Modin O, Persson F, Wilén B-M (2017) Microbial population dynamics and ecosystem functions of anoxic/aerobic granular sludge in sequencing batch reactors operated at different organic loading rates. *Front Microbiol* 8
- Takenaka, S., Zhou, Q., Kuntiya, A., Seesuriyachan, P., Murakami, S. and Aoki, K. (2007) Isolation and characterization of thermotolerant bacterium utilizing ammonium and nitrate ions under aerobic conditions. *Biotechnol Lett* 29, 385–390
- Tan, N.C.G., Kampschreur, M.J., Wanders, W., van der Pol, W.L.J., van de Vossenberg, J., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., Jetten, M.S.M., (2008). Physiological and phylogenetic study of an ammonium-oxidizing culture at high nitrite concentrations. *Systematic and Applied Microbiology* 31 (2), 114e125

Bibliografia

- Tan, X., Yang, Y.L., Li, X., Zhou, Z.W., Liu, C.J., Liu, Y.W., Fan, X.Y. (2020). Intensified nitrogen removal by heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria in two pilot-scale tidal flow constructed wetlands: influence of influent C/N ratios and tidal strategies. *Bioresource Technology*, 122803.
- Tanyolaç D., Salih B., Tanyolaç A. (2001) Inhibition kinetics of a commercial mixed culture by ammonium sulfate. *Biochem Eng J* 7:177–82.
- Tay JH, Ivanov V, Pan S, Tay STL. (2002). Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Lett Appl Microbiol.* 34(4):254–7
- Tay JH, Pan S, He YX, Tay STL. Effect of organic loading rate on aerobic granulation: Part II. Characteristics of aerobic granules. *J Environ Eng* 2004a;130:1102–9.
- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y. (2001). The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*, 33(3), 222–226. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00986.x.
- Tchobanoglous, G. Burton, F.L. Stensel . H.D, (2003) Anaerobic suspended and attached growth biological treatment processes, Metcalf and Eddy Inc., Wastewater Engineering Treatment and Reuse, fourth edition, McGraw-Hill, New York, pp. 983–1034.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D. (2003). Anaerobic suspended and attached growth biological treatment processes, Metcalf and Eddy Inc., Wastewater Engineering Treatment and Reuse, fourth edition, McGraw-Hill, New York. pp. 983–1034.
- Terzyk, A.P. (2007). The impact of carbon surface chemical composition on the adsorption of phenol determined at the real oxic and anoxic conditions, *Appl. Surf. Sci.* 253 (13) 5752–5755.
- Texier, A.C., Gomez, J. (2007). Simultaneous nitrification and p-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Res.* 41(2), 315-322.
- Third. K. (2003) Oxygen Management for Optimization of Nitrogen Removal in a Sequencing Batch Reactor. Tesis, School of Biological Sciences and Biotechnology, Murdoch University, Wertern Australia.
- Tiedje, J.M., Sextstone, A.J., Myrold, D.D., Robinson, J.A., (1982). Denitrification: ecological niches, competition and survival. *Antonie Leeuwen* 48, 569–583.

Bibliografía

- Tjihuis, L., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1994) Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 595– 608.
- Tilley, E., Ulrich, L., Luethi, C., Reymond, P., Zurbrugg, C. (2014): *Compendium of Sanitation Systems and Technologies*. 2nd Revised Edition. Duebendorf, Switzerland: Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag).
- Tora, J.A., Lafuente, J., Baeza, J.A., Carrera, J. (2010). Combined effect of inorganic carbon limitation and inhibition by free ammonia and free nitrous acid on ammonia oxidizing bacteria. *Bioresource Technology* 101 (15), 6051e6058.
- Unión Europea y la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (2007).
- USEPA. (1999). *Wastewater Technology Fact Sheet Sequencing Batch Reactors*. Office of Water. Washington DC. EPA 832-F-99-073.
- USEPA. U.S. Environmental Protection Agency. 2002. *Onsite wastewater treatment systems manual*. EPA/625/R-00/008. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C.
- Vadivelu, V. M., Keller, J., Yuan, Z. (2006). Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(5)
- Van den Heuvel, R.N., van der Biezen, E., Jetten, M.S., Hefting, M.M., Kartal, B. (2010). Denitrification at pH 4 by a soil-derived *Rhodanobacter*-dominated community. *Environ. Microbiol.* 12:3264–3271.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Ho, D.P., Batstone D.J., Tyson, G.W. (2014) Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Curr Opin Biotechnol* 27:55–64.
- Vázquez, I., Rodríguez, J., Marañón, E., Castrillón, L., Fernández, Y. (2006b). Simultaneous removal of phenol, ammonium and thiocyanate from coke wastewater by aerobic biodegradation. *J. Hazard. Mater.* 137(3),1773-1780
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., Lyberatos, G (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour Technol.* 100:3713–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.025>

Bibliografia

- Venkateswar Reddy, M., Nikhil, G.N., Venkata Mohan, S., Swamy, Y.V., Sarma, P. N., (2012). *Pseudomonas otitidis* as a potential biocatalyst for polyhydroxyalkanoates (PHA) synthesis using synthetic wastewater and acidogenic effluents. *Bioresour. Technol.* 123, 471–479.
- Verawaty M, Tait S, Pijuan M, Yuan Z, Bond PL. (2013) Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Res.* 47(14):5338–5349.
- Villegas LGC, Mashhadi N, Chen M, Mukherjee D, Taylor KE, Biswas NA. (2016). Short review of techniques for phenol removal from wastewater. *Current Pollution Reports.*1–11. doi:10.1007/s40726-016-0035-3.
- Wagner M. y Loy A. (2002) Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218-227.
- Wan, X., Xiao, P., Zhang, D., Lu, P., Yao, Z. He, Q. (2016). The kinetics for ammonium and nitrite oxidation under the effect of hydroxylamine. *Water Science and Technology* 73 (5), 1067–1073
- Wang, J., Li, W.W., Yue, Z.B., Yu, H.Q. (2014a). Cultivation of aerobic granules for polyhydroxybutyrate production from wastewater. *Bioresour. Technol.* 159,442–445.
- Wang, L.; Xu, J.M.; Ma, S.S.; Zhao, B.; Zhang, Z.H.; Zhou, X.M.; Zhang, H.W. (2015). Biological nitrogen removal in a modified anoxic/oxic process for piggery wastewater treatment. *Desalin. Water Treat.* 57, 11266–11274
- Wang, P., Peng, Y., Cheng, Z., Ren, N. (2014b). Understanding the role of extracellular polymeric substances in an enhanced biological phosphorus removal granular sludge system. *Bioresour. Technol.* 169, 307–312.
- Wang, Z.W., Liu, Y., Tay, J.H. (2006). The role of SBR mixed liquor volume exchange ratio in aerobic granulation. *Chemosphere*, 62(5), 767–771. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.081 url to share this paper sci-hub.tw/10.1016/j.chemosphere.2005.04.08.
- Weber, S.D., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fried, J. (2007) Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. *Appl Environ Microbiol.* ;73:6233–6240.

Bibliografía

- Wei D, Shi L, Yan T, Zhang G, Wang Y, Du B. (2014). Aerobic granules formation and simultaneous nitrogen and phosphorus removal treating high strength ammonia wastewater in sequencing batch reactor. *Bioresour Technol.* 171:211–216.
- Wilén, B.M., Liébana, R., Persson, F., Modin, O., Hermansson, M. (2018). The mechanisms of granulation of activated sludge in wastewater treatment, its optimization, and impact on effluent quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5005–5020. doi:10.1007/s00253-018-8990-9
- Winkler, M. K. H., Kleerebezem, R., Khunjar, W. O., de Bruin, B., & van Loosdrecht, M. C. M. (2012). Evaluating the solid retention time of bacteria in flocculent and granular sludge. *Water Research*, 46(16), 4973–4980. doi:10.1016/j.watres.2012.06.027.
- Winkler, M., Coats, E.R., Brinkman, C.K., (2011). Advancing post-anoxic denitrification for biological nutrient removal. *Water Res.* 45, 6119–6130.
- Winkler, M.K.H., Le, Q.H., Volcke, E.I.P., (2015). Influence of partial denitrification and mixotrophic growth of NOB on microbial distribution in aerobic granular sludge. *Environ. Sci. Technol.* 49 (18), 11003–11010.
- with alternating oxic and anoxic operations using aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (6), 1181–1189.
- Wosman, A., Lu, Y., Sun, S., Liu, X., Wan, C., Zhang, Y., Tay, J. (2016). Effect of operational strategies on activated sludge's acclimation to phenol, subsequent aerobic granulation, and accumulation of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Hazardous Materials*, 317, 221–228. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.05.074
- Xu, C., Han, H., Jia, S., & Zhao, Q. (2016). Influence of phenol on ammonia removal in an intermittent aeration bioreactor treating biologically pretreated coal gasification wastewater. *Journal of Environmental Sciences*, 43, 99–105. doi:10.1016/j.jes.2015.08.013
- Yadu, A., Sahariah, B.P, Anandkumar, J. (2018). Influence of COD/ ammonia ratio on simultaneous removal of NH₄⁺-N and COD in surface water using moving bed batch reactor. *J Water Process Eng.* 22:66–72. doi:10.1016/j.jwpe. 2018.01.007
- Yamagishi, T., Leite, J., Ueda, S., Yamaguchi, F., Suwa, Y. (2001). Simultaneous removal of phenol and ammonia by an activated sludge process with cross-flow filtration. *Water Res.* 35(13), 629 3089-3096.

Bibliografia

- Yang, G., Xu, Q., Wang, D., Tang, L., Xia, J., Wang, Q., Zeng, G., Yang, Q., Li, X. (2018). Free ammonia-based sludge treatment reduces sludge production in the wastewater treatment process. *Chemosphere* 205, 484–492.
- Yang, W., Vollertsen, J., Hvitved-Jacobsen, T. (2003). Nitrite accumulation in the treatment of wastewaters with high ammonia concentration. *Water Science and Technology* 48 (3), 135e141.
- Yao, S., Ni, J., Ma, T., Li, C. (2013). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2, *Bioresour. Technol.* 139 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.189>.
- Ye, Q., Li, K., Li, Z., Xu, Y., He, T., Tang, W., Xiang, S. (2017). Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Performance of Strain Y-12 under Low Temperature and High Concentration of Inorganic Nitrogen Conditions. *Water*, 9(11), 835. doi:10.3390/w9110835
- Yu, Y., Wu, B., Jiang, L., Zhang, X.-X., Ren, H.-Q., Li, M. (2019). Comparative analysis of toxicity reduction of wastewater in twelve industrial park wastewater treatment plants based on battery of toxicity assays. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-40154-z url to share this paper:
- Zeng, R. J., Yuan, Z., Keller, J. (2004). Improved understanding of the interactions and complexities of biological nitrogen and phosphorus removal processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 3(3), 265-272. <http://doi.org/10.1007/s11157-004-7459-8>
- Zhang, L., Yang, J., Furukawa, K. (2010). Stable and high-rate nitrogen removal from reject water by partial nitrification and subsequent anammox. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110 (4), 441e448
- Zhang, J., Wu, P., Hao, B., Yu, Z. (2011). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour. Technol.* 102(21), 9866-9869.
- Zhang, S., Sun, X., Fan, Y., Qiu, T., Gao, M., Wang, X. (2017). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Diaphorobacter polyhydroxybutyrativorans* SL-205 using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as the sole carbon source, *Bioresour. Technol.* 241, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.185>

Bibliografia

- Zhang, W., Yan, C., Shen, J., Wei, R., Gao, Y., Miao, A. and Yang, L. (2019b) Characterization of aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas mendocina* strain GL6 and its potential application in wastewater treatment plant effluent. *Int J Environ Res Public Health* 16, 364
- Zheng, Y.M., Yu, H.Q. (2007). Determination of the pore size distribution and porosity of aerobic granules using size-exclusion chromatography. *Water Res.* 41:39–46.
- Zheng, Y.M., Yu, H.Q., Sheng, G.P. (2005). Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochem* ;40:645–50.
- Zhou, Y., Oehmen, A., Lim, M., Vadivelu, V., Ng, W. J. (2011). The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water Research*, 45(15), 4672–4682.
- Zhu, L., Yu, Y., Dai, X., Xu, X., Qi, H. (2013). Optimization of selective sludge discharge mode for enhancing the stability of aerobic granular sludge process. *Chemical Engineering Journal*, 217, 442–446. doi:10.1016/j.cej.2012.11.132