



REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:
Investigación, desarrollo y práctica.

IMPLEMENTACIÓN DE LA DESNITRIFICACIÓN BIOLÓGICA HETEROTRÓFICA PARA REMEDIAR AGUAS SUBTERRÁNEAS PARA CONSUMO HUMANO

Cristián Dotto¹
Fernando Scolari²
Leonardo Erijman^{1,3}
* Eva Figuerola³

IMPLEMENTATION OF HETEROTROPHIC BIOLOGICAL DENITRIFICATION FOR GROUNDWATER REMEDIATION FOR HUMAN CONSUMPTION

Recibido el 13 de abril de 2021. Aceptado el 14 de septiembre de 2021

Abstract

Nitrate pollution of drinking water sources is widespread in Buenos Aires Province. Its main causes are agriculture, livestock farming, or the poor design and operation of septic systems. High nitrate concentration in drinking water is detrimental for human health, for this reason, standards have been set for this ion. Biological denitrification, carried out ex-situ by bacteria indigenous to the aquifer, has been shown to be a suitable form of treatment for water for human consumption. The objective of the project described here was to establish the local conditions for the configuration of an heterotrophic biological denitrification pilot plant for groundwater in the province of Buenos Aires. For this purpose, laboratory tests were carried out in a batch and two continuous systems, including a 10X pre-scaling. The results obtained allowed the design and implementation of the proposed pilot plant, which is currently in the testing phase.

Keywords: biological denitrification, groundwater, nitrate.

¹ Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

² Agua y Saneamientos Argentinos (AySA), Buenos Aires, Argentina.

³ Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

* *Autor correspondiente:* Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional (IB3), Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes 2160 - Ciudad Universitaria - C1428EG, Buenos Aires, Argentina. Email: efiguerola@fbmc.fcen.uba.ar

Resumen

La presencia de nitratos en las fuentes de agua subterránea es común en la Provincia de Buenos Aires. Puede atribuirse a labores agrícola-ganaderas o al mal diseño o funcionamiento de los sistemas sépticos. La presencia de dicho ion es perjudicial para la salud, por lo que su concentración máxima en agua potable está regulada. La desnitrificación biológica, llevada a cabo en forma *ex-situ* por bacterias indígenas del acuífero ha demostrado ser una forma de tratamiento conveniente para el agua de consumo humano. El objetivo del proyecto descrito consistió en establecer las condiciones locales para la configuración de una planta piloto de desnitrificación biológica heterótrofa de agua subterránea en la provincia de Buenos Aires. Para esto se realizaron ensayos en laboratorio en sistemas discontinuos y continuos. Los resultados obtenidos permitieron el diseño y puesta en marcha de la planta piloto propuesta, la cual se encuentra en fase de prueba.

Palabras clave: agua subterránea, desnitrificación biológica, nitrato.

Introducción

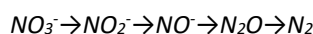
La contaminación con nitratos de las aguas subterráneas es un problema de impacto mundial (WHO, 2007; Lasagna *et al.*, 2016) que tiene su correlato en Argentina, especialmente en la región pampeana (Pessolano *et al.*, 2005; Leanza *et al.*, 2005). El nivel de contaminación se encuentra asociado a actividades antrópicas como las filtraciones de sistemas sépticos, lavado de fertilizantes o acumulación de heces de ganado en zonas agropecuarias (Debernardi *et al.*, 2008). En particular, en la Provincia de Buenos Aires, la provisión de agua potable depende de la explotación de los acuíferos Pampeano y Puelche, ambos mostrando contaminación de este tipo (Leanza *et al.*, 2005; Debernardi *et al.*, 2008; ACUMAR, 2015). Los riesgos asociados a la ingesta de agua contaminada con nitratos responden a la posible generación de metahemoglobinemia o el desarrollo de cáncer en el aparato digestivo (WHO, 2007) habiéndose establecido, por lo tanto, en Argentina, un límite de 45 mg/L (equivalente a 10 mg de N de nitrato/L) en el agua de bebida (ANMAT, 2012).

En aquellos casos en los que se dispone de fuentes cercanas de agua no contaminada, el tratamiento consiste en una simple dilución hasta alcanzar los valores permitidos (Jensen *et al.*, 2014). Si esto no es posible, existen métodos alternativos de tratamiento. Los más utilizados son el intercambio iónico, la ósmosis inversa y la electrodiálisis, los cuales comparten dos serias desventajas: el alto costo operativo y la generación de una corriente concentrada en sales que termina siendo descartada en el ambiente (Jensen *et al.*, 2014). Por el contrario, la desnitrificación presenta la ventaja de transformar el nitrato en N₂ cuya descarga a la atmósfera es completamente inocua, así como también, una alta recuperación de agua, baja cantidad de barro de descarte, menores costos operativos y baja utilización de químicos, entre otros. (Upadhyaya *et al.*, 2010; WA DOH, 2005).

La desnitrificación biológica (DB) para el tratamiento de agua subterránea es un proceso bien establecido a escala industrial (Mohseni-Bandpi *et al.*, 2013) con varios sistemas en funcionamiento

en Francia, Alemania, Austria, Polonia, Italia y Gran Bretaña y dos proyectados en Estados Unidos (Seidel *et al.*, 2011). En la mayoría de ellos se emplean reactores de lecho fijo, en los cuales un material inerte actúa como soporte de la biopelícula desnitrificante (Jensen 2014, Mohseni-Bandpi *et al.*, 2013).

La DB es una vía natural del ciclo del nitrógeno que involucra una serie de pasos metabólicos catalizados por diferentes enzimas, en la que los electrones de un dador son transferidos al nitrato (Bothe *et al.*, 2007) (Ecuación 1, Pasos del proceso de desnitrificación).



Ecuación (1)

La DB puede realizarse en forma heterotrófica o autotrófica, siendo la vía heterotrófica la más eficiente en cuanto a la velocidad y capacidad de remoción de nitrato (Resvani, 2019). Un número importante de procariontes heterótrofos son capaces de utilizar nitrato como aceptor final de electrones en la respiración anóxica. Sin embargo, no todos los microorganismos son capaces de transformar nitrato en nitrógeno gaseoso (desnitrificación completa) y por lo tanto, la selección de las cepas adecuadas en el reactor es de suma importancia. En este tipo de sistemas la inoculación con cepas específicas no es habitual (Webster y Togna, 2009) por lo que el desarrollo de la comunidad desnitrificante depende de la selección natural a partir de la manipulación de las condiciones ambientales. Para ello, resulta necesario adaptar las condiciones utilizadas en las plantas industriales establecidas en otros países, a las condiciones locales. Esto incluye la selección del material de soporte disponible, la fuente de carbono utilizada como dador de electrones, y la composición del agua y de la microbiota del acuífero.

El tipo de medio soporte empleado puede afectar la eficiencia de la desnitrificación debido a su capacidad de facilitar la adhesión de las células microbianas, siendo la superficie de la fase sólida un factor determinante de la colonización microbiana (Zhu *et al.*, 2010). Entre los soportes más adecuados para el crecimiento de microorganismos en biopelículas se encuentra el carbón granular activado (Di Capua *et al.*, 2015), la grava silícica (Karanasios *et al.*, 2016), la arena y los soportes plásticos (Evans *et al.*, 2010). Los microorganismos que llevan a cabo la desnitrificación heterotrófica utilizan compuestos carbonados como fuente de energía y carbono para el metabolismo y la síntesis de biomasa. La fuente de carbono utilizada afecta la diversidad funcional de las comunidades microbianas (Hallin *et al.*, 2006). Las más utilizadas son los alcoholes metílico y etílico, así como también el ácido acético (Mohseni-Bandpi *et al.*, 2013), aunque en algunos países el metanol se encuentra prohibido para el tratamiento de agua potable (Resvani 2019). También se ha reportado el uso de polímeros biodegradables o materiales de descarte del tipo lignocelulósicos, que podrían actuar al mismo tiempo como soporte (Magram, 2010; Shen *et al.*, 2013; Luo y Angelidaki, 2014). La relación entre la fuente de carbono dadora de electrones y el aceptor final de los mismos (relación C:N) es determinante de la eficiencia del sistema, involucrando un equilibrio complejo que debe permitir la respiración del nitrato disponible

evitando favorecer procesos competitivos como la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio (RDNA) (van den Berg *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, ha sido demostrado que tanto las características del agua a tratar como la microbiota del acuífero influyen en la composición de la comunidad microbiana de los sistemas de tratamiento (Albers *et al.*, 2015).

El objetivo de este trabajo fue estudiar las condiciones necesarias para el establecimiento del proceso de DB heterotrófica aplicado a la remoción de nitratos en agua de consumo proveniente de napas subterránea de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Para ello, se analizó inicialmente el uso de distintos materiales de bajo costo, disponibles localmente (arena, plásticos y carbón granular activado) como soporte para la formación de biopelículas desnitrificantes, en sistemas discontinuos. Por otra parte, teniendo en cuenta su accesibilidad, se estudió el uso de acetato o etanol como fuentes de carbono y electrones y se evaluó el efecto de las diferentes relaciones C/N y N/P. Los ensayos se llevaron a cabo empleando sistemas continuos con biorreactores de columna de vidrio con lecho fijo. En cada caso, la eficiencia del proceso de DB, se determinó mediante la cuantificación de las concentraciones de nitrato, nitrito y amonio a través del tiempo.

Materiales y métodos

Todos los ensayos se realizaron con agua suministrada por la empresa Agua y Saneamientos Argentinos S.A. (AySA) proveniente de un pozo sito en la localidad de Llavallol, Pcia. de Buenos Aires, Argentina, afectado por contaminación con nitrato conteniendo en promedio (99 +/- 12) mg/ml de nitrato.

Sistema discontinuo

100 ml de agua de pozo suministrada por AySA se incubaron con 100 ml de 3 clases de material de soporte: arena de granulometría 1 mm, carbón granular activado y soportes plásticos autoclavados en sendos matraces erlenmeyers de 250 ml, sellados con tapones de goma dentro de un agitador orbital con regulación de temperatura a 20°C (Figura 1A).

El agua de pozo se suplementó con diferentes concentraciones de KCO_2CH_3 (pH=9.7) como fuente de C y $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (1:1) (pH=6.8) como fuente de P para lograr relaciones C:N 1:1, 2:1 y 4:1 y relaciones N:P 10:1 y 20:1. Las relaciones C:N=4:1 y N:P=10:1 fueron las elegidas inicialmente en base a trabajos previos referidos en bibliografía (Mohseni-Bandpi *et al.*, 2013; Calderer *et al.*, 2010). El medio se cambió en forma semanal mientras que las mediciones se realizaron en forma diaria. Ensayos en las mismas condiciones, exceptuando el agregado de nutrientes, se utilizaron como controles de desnitrificación abiótica.

Sistema continuo

Se utilizaron biorreactores de lecho fijo constituidos por columnas de vidrio de 50 ml con 30 ml de arena (volumen efectivo 13 ml) (Figura 1B). Se utilizó arena aclimatada (AA) con biomasa

bacteriana con capacidad desnitrificante proveniente de las incubaciones en modo discontinuo o arena nueva (AN). La alimentación se efectuó, de manera ascendente, mediante 2 bombas peristálticas en forma continua por 8 h diarias, con agua subterránea, suplementada con KCO_2CH_3 o $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ y $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, en relaciones C:N 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 con N:P 20:1. Además, se incluyeron biorreactores de las mismas características alimentados con agua de pozo sin nutrientes, como controles abióticos. El flujo se ajustó en 30 ml/h, determinando un tiempo de residencia hidráulica (TRH) igual a 26 min. Posteriormente, se realizó un escalado 10X, en columnas de vidrio con 300 ml de AN como material de soporte (Figura 1C), ajustando el flujo a 300 ml/h, determinando un TRH de 60 min. Cada columna contó con un duplicado experimental. En todos los casos, la temperatura de trabajo fue la ambiental y la toma de agua para el análisis químico se realizó diariamente luego de 4 h de funcionamiento continuo.

Sistema continuo en Planta Piloto

Los biorreactores de fibra de vidrio de 100 L de capacidad, se alimentaron en forma continua las 24 h (Figura 1D). El material de soporte elegido fue arena y etanol como fuente de C. La relación inicial C:N se fijó en 4:1, el flujo ascendente se ajustó en 100 l/h, determinando un tiempo de residencia de 60 min.

Cuantificación de nitrato, nitrito y amonio y medición del pH

La cuantificación de NO_3^- y NO_2^- en los diferentes sistemas se realizó espectrofotométricamente. En el primer caso, a partir de la medición de la absorbancia a 220 nm (APHA, 1999) y, en el segundo, utilizando el kit comercial Nitrite test (Merck) según las instrucciones del proveedor. La cuantificación de la concentración de NH_4^+ se realizó por el método del fenato (APHA, 1999). El pH se midió con un pHmetro Hanna HI 221.

Visualización de biopelículas por microscopía

Para microscopía confocal, los biopelículas se tiñeron con los fluoróforos SYTO9 e ioduro de propidio LIVE/DEAD BaLight Bacterial Viability (Molecular Probes) según las indicaciones del fabricante. Los biopelículas se visualizaron con un microscopio de escaneo láser confocal Leica, modelo SP5.

Para microscopía electrónica de barrido, los biopelículas se fijaron con formaldehído 4% a 4°C durante 2 h y luego se deshidrataron con etanol. Posteriormente, los granos de arena se montaron sobre soportes de aluminio, se cubrieron con una capa metálica de oro-paladio y se examinaron en un microscopio de escaneo Philips XL30 TMP.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Graphpad (v5.0). Las diferencias con los valores límites de los iones se analizaron mediante la prueba *t de Student* no pareada considerando valores de $p < 0.05$ como significativos.

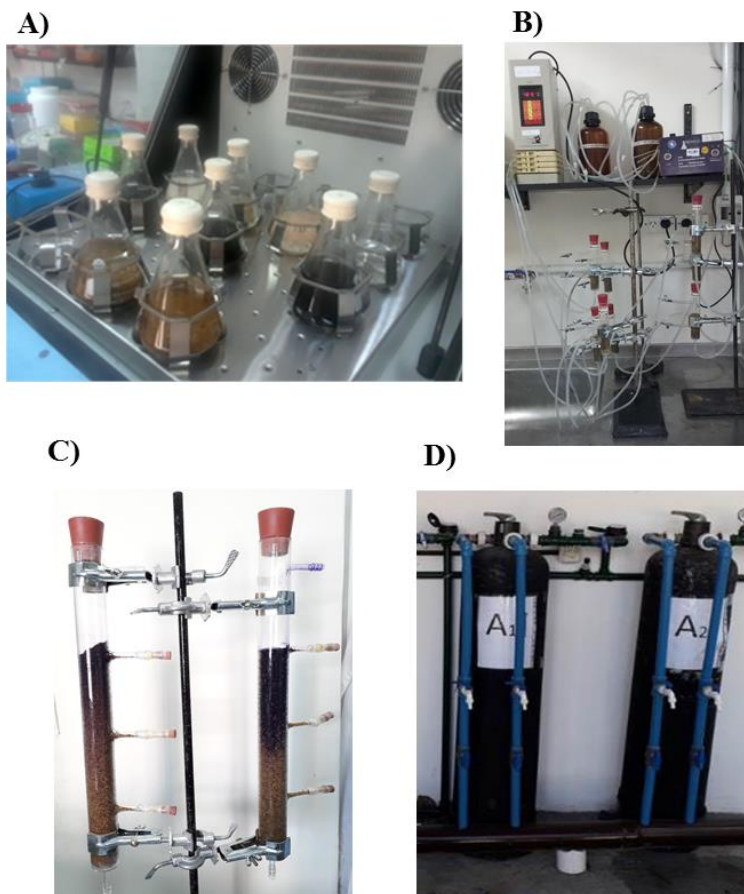


Figura 1. Imágenes de los distintos sistemas utilizados. A) Matracos erlenmeyers con incubaciones en discontinuo, B) Biorreactores de lecho fijo en columna 1X, C) Biorreactores de lecho fijo en columna 10X y D) Biorreactores de lecho fijo en la Planta Piloto.

Resultados

Selección del material soporte para el crecimiento bacteriano y determinación de la relación C:N

En la Figura 2, se observa que el uso de carbón activado implicó la reducción de la concentración de NO_3^- por debajo del límite permitido para agua potable en forma casi instantánea (10 mg de $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$).

En los ensayos control para carbón activado los niveles de nitrato descendieron un $(72 \pm 3)\%$ en los primeros 10 minutos de incubación. Por el contrario, al utilizar soportes plásticos como superficie para el crecimiento bacteriano, la concentración de nitrato se mantuvo por encima del valor límite mencionado la mayor parte tiempo. En el caso de la arena, se determinó que luego

de un período de aproximadamente 2 semanas, en el que las bacterias se adaptaron a las condiciones de crecimiento, la concentración de nitrato disminuyó hasta niveles cercanos a 0. Así, los tiempos de aclimatación (tiempo en disminuir la concentración de nitrato a menos de 10 mg de $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$) para los 3 soportes fueron de 1 día para la arena y el carbón activado ($p=0.0069$ y $p=0.0003$, respectivamente) y de 22 días para el plástico ($p=0.0006$).

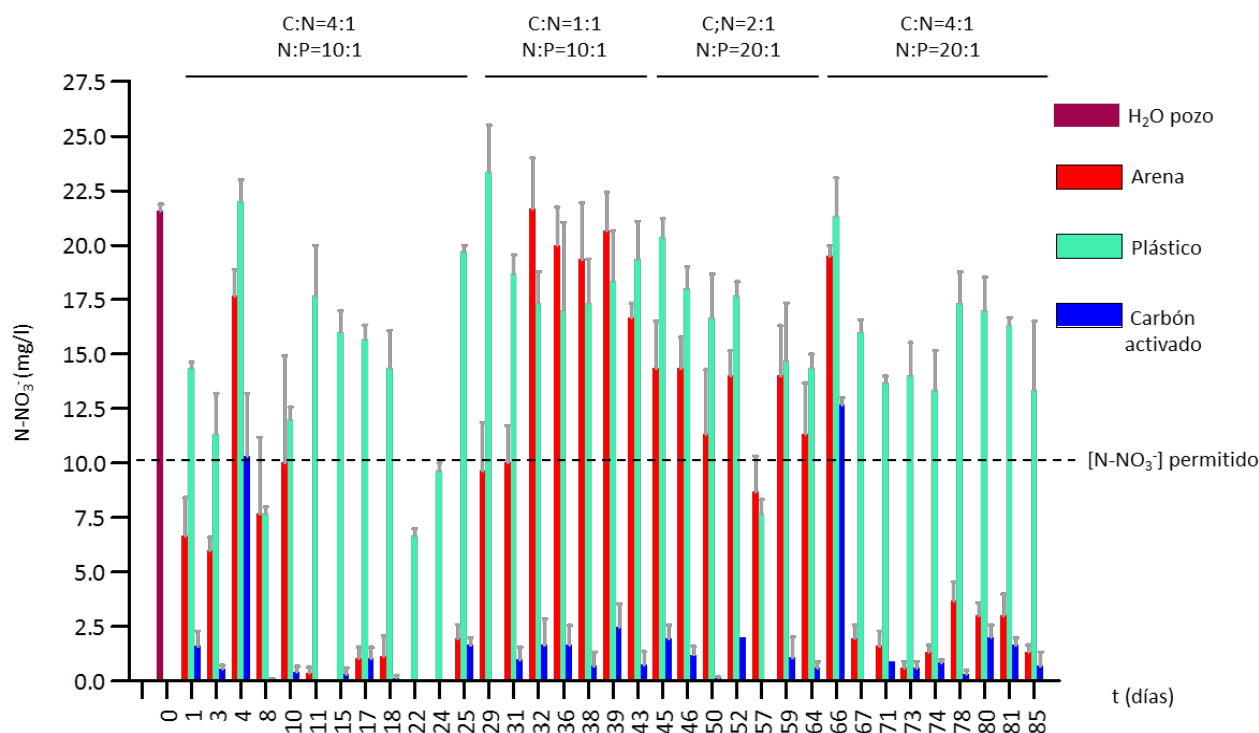


Figura 2. Evolución del proceso de desnitrificación a través del tiempo, utilizando arena, carbón activado o plásticos como material de soporte y diferentes relaciones C:N y N:P. Las barras representan el error estándar.

La relación C:N se redujo a 1:1, manteniendo la relación de N:P (10:1). Bajo esta condición, la concentración de nitrato fue superior al límite permitido al usar arena o plástico como soporte, mientras que con carbón activado se mantuvo por debajo de dicho límite, aunque con valores más altos que los de la relación 4:1. Detectándose, además, concentraciones elevadas de P residual. Debido a la posibilidad de que en estas condiciones las bacterias no tuvieran suficiente disponibilidad de electrones, y con el objeto de reducir el exceso de PO_4^{3-} , respectivamente, se incrementaron las relaciones C:N a 2:1 y N:P a 20:1. Sin embargo, la concentración de nitrato fue superior al límite establecido, por lo que se incrementó la relación C:N a 4:1 manteniendo la relación N:P en 20:1.

En estas condiciones, los niveles de nitrato se redujeron por debajo del límite permitido cuando el medio soporte fue arena o carbón activado. El uso de plástico, en cambio, no permitió tal reducción, encontrándose los niveles de nitrato por encima del límite establecido durante toda esta etapa.

Para todos los soportes de crecimiento bacteriano, la concentración de amonio fue despreciable. La detección infrecuente de amonio se relacionó a un período de carencia de nutrientes, reduciéndose inmediatamente luego del recambio del medio de incubación.

Ajuste de las condiciones para sistema continuo a escala de laboratorio

Se realizaron ensayos en sistema continuo utilizando arena proveniente de las incubaciones en el sistema discontinuo, con biomasa desnitrificante (aclimatada), y arena estéril, para estudiar el tiempo necesario para la colonización del sistema continuo por la microbiota del acuífero.

En la Figura 3 puede observarse el balance de masas de N, evidenciándose un descenso gradual de la concentración de N a través del tiempo. En los biorreactores con arena aclimatada, la concentración de nitrato e encontró por debajo del límite permitido en agua potable (10 mg N-NO₃⁻ /L) a partir del día 1 ($p=0.0292$).

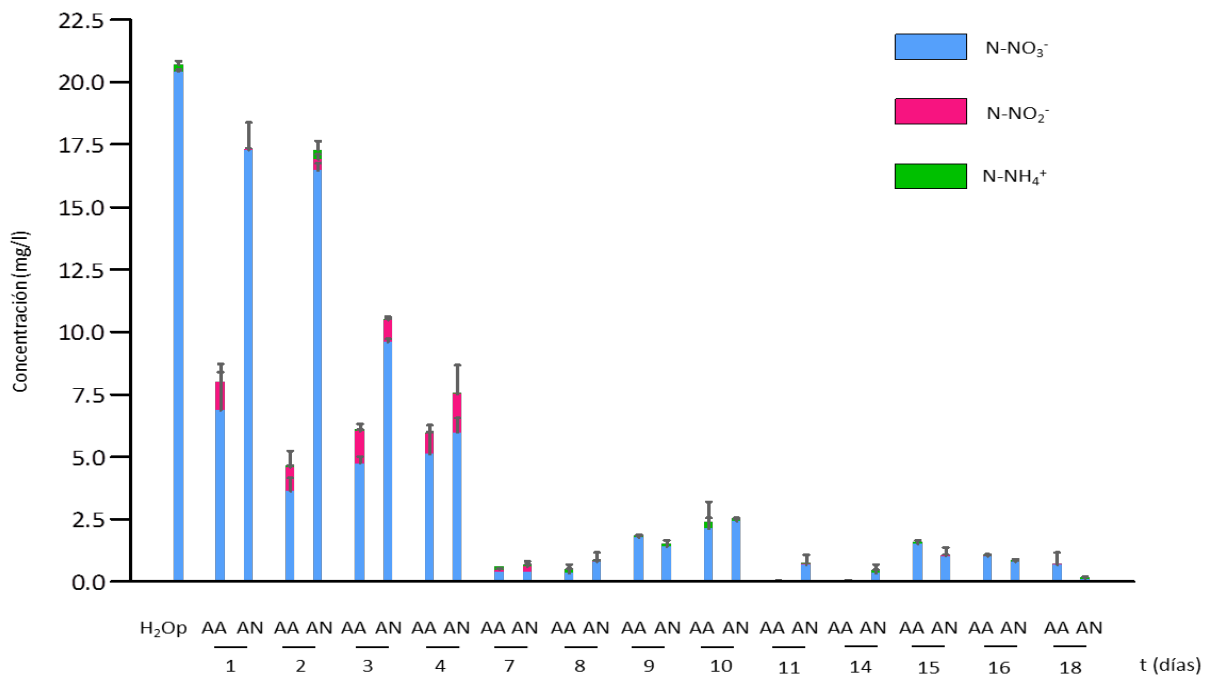


Figura 3. Variación en la concentración de N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺ en función del tiempo en los biorreactores alimentados con agua de pozo suplementados con acetato y fosfato. AA: Arena aclimatada, AN: Arena Nueva. Las barras representan el error estándar.

Por su parte, los biorreactores con arena nueva redujeron los niveles de nitrato a partir del día 3 ($p=0.0151$) (Figura 4). Los reactores control presentaron niveles de nitrato que no difieren significativamente de los del agua de pozo ($p>0.05$), indicando la ausencia de procesos abióticos involucrados en la reducción del contenido de nitratos del agua.

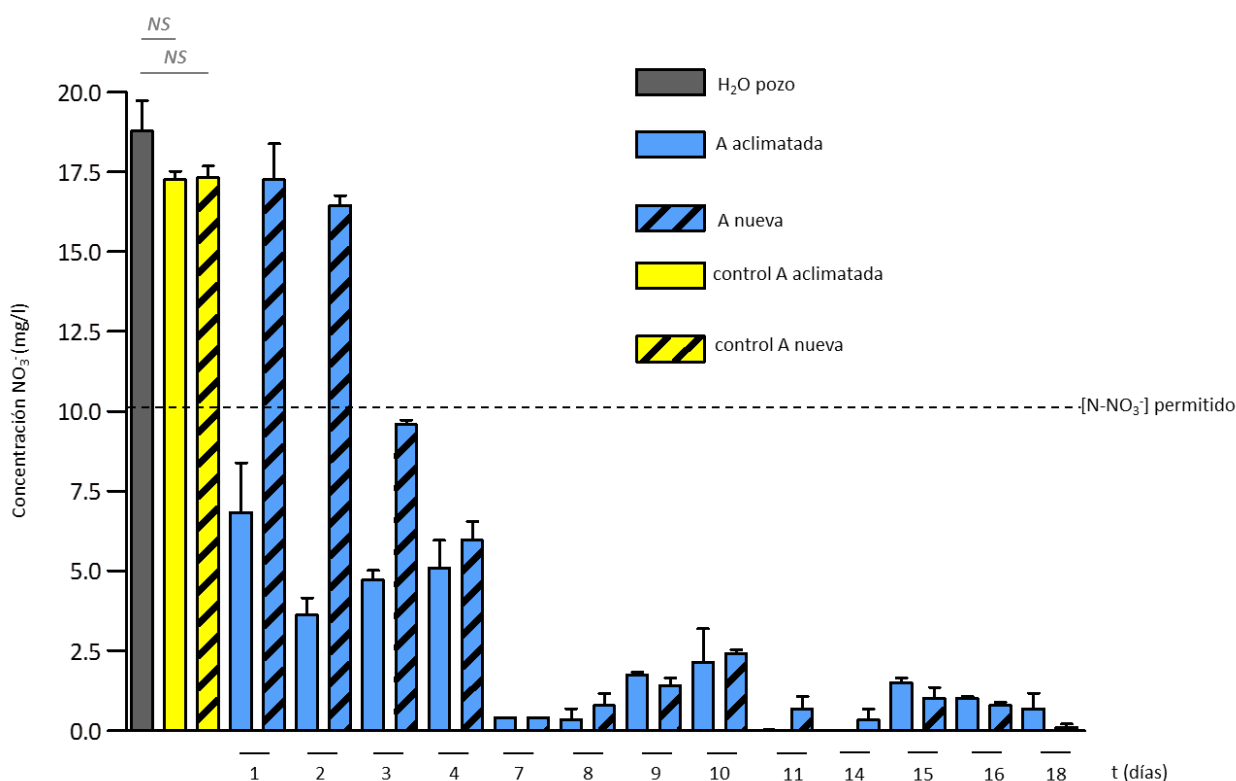


Figura 4. Concentración de N-NO₃⁻ en función del tiempo en los biorreactores alimentados con agua de pozo suplementados con acetato y fosfato. Las barras representan el error estándar.

La concentración de nitrito se incrementó por encima del límite permitido en agua potable (30 µg N-NO₂⁻ /L) a partir del día 1 en los biorreactores con arena aclimatada ($p=0.0424$) y a partir del día 2 en los biorreactores con arena nueva como soporte bacteriano ($p=0.0387$). A partir del día 7, los niveles de nitrito comenzaron a disminuir hasta caer por debajo de dicho límite en ambos tipos de biorreactores (Figura 5).

En la Figura 6 se observa que los niveles de amonio se mantuvieron en todo el experimento por debajo del límite permitido para agua potable (0.16 mg N-NH₄⁺/L). El pH del agua tratada osciló

superando ligeramente los límites permitidos para agua potable ($6.5 < \text{pH} < 8.5$) en ambos tipos de biorreactores, siendo en promedio 8.5 ± 0.2 para la arena aclimatada y 8.5 ± 0.1 para la arena nueva.

El desarrollo de la comunidad desnitrificante se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido y confocal de fluorescencia (Figura 7). En ambos casos pudo observarse la formación de una biopelícula mixta compuesta por microorganismos de diversas morfologías.

El uso de una relación C:N menor (1:1) resultó en una adecuada reducción de nitrato, aunque a expensas de un aumento de la concentración del intermediario nitrito, que alcanzó niveles no aceptables para consumo (Figura 8).

Adicionalmente, se evaluó el uso de etanol como fuente de carbono y electrones alternativa al acetato. Estos ensayos se hicieron en sistema continuo en columna, utilizando relaciones C:N 4:1, 3:1 y 2:1. Los cambios en la concentración de nitrato, nitrito y amonio fueron similares a los obtenidos usando acetato como fuente de carbono, lográndose la reducción satisfactoria de la concentración de los 3 iones medidos para todas las relaciones evaluadas (Figura 9).

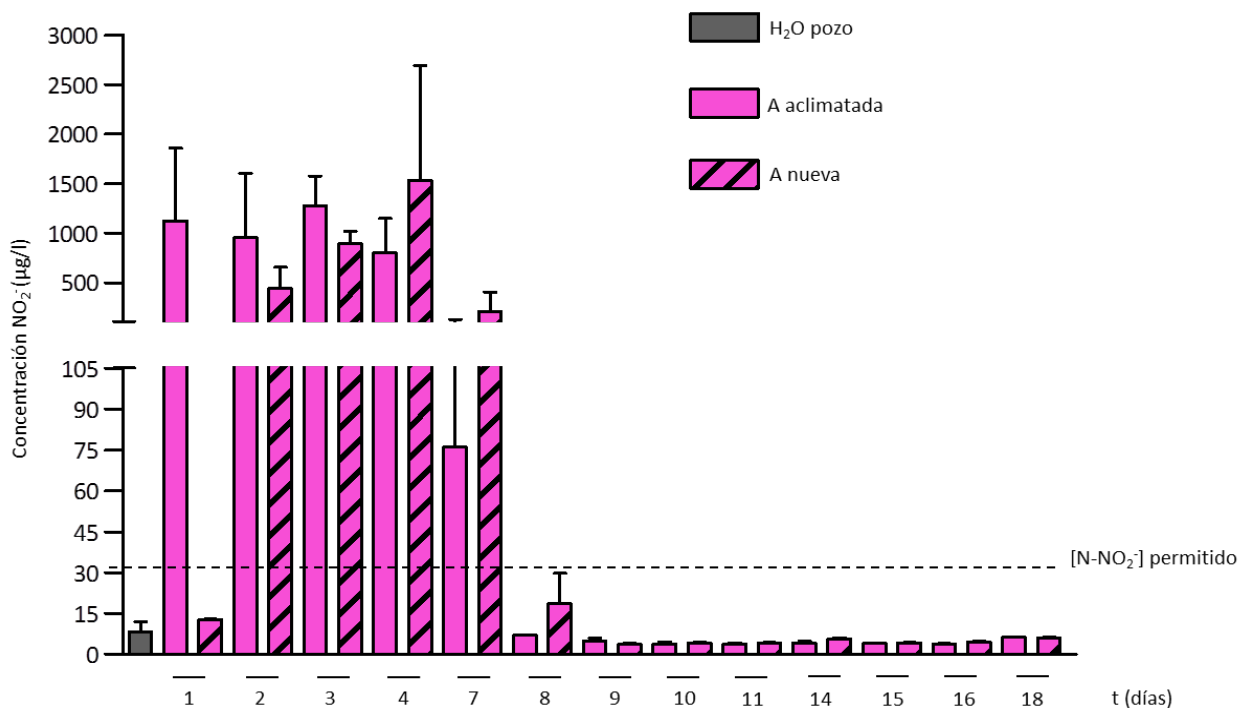


Figura 5. Concentración de N-NO_2^- en función del tiempo en los biorreactores alimentados con agua de pozo suplementados con acetato y fosfato. Las barras representan el error estándar.

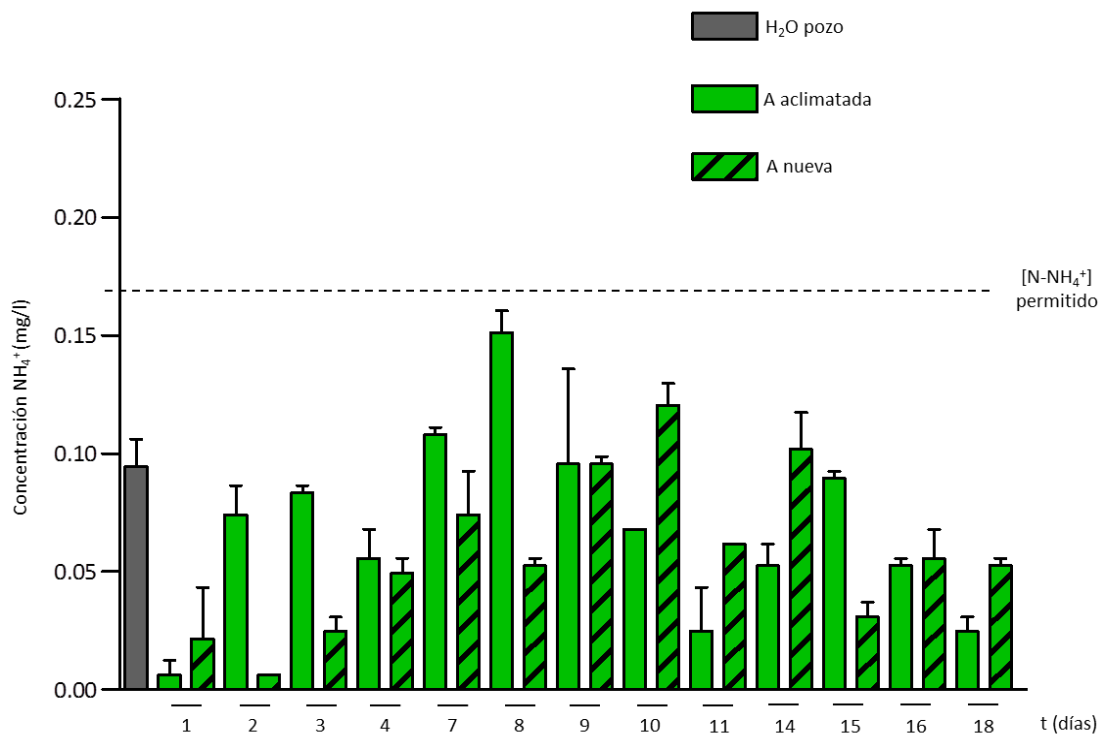


Figura 6. Concentración de $N-NH_4^+$ en función del tiempo en los biorreactores alimentados con agua de pozo suplementados con acetato y fosfato. Las barras representan el error estándar.

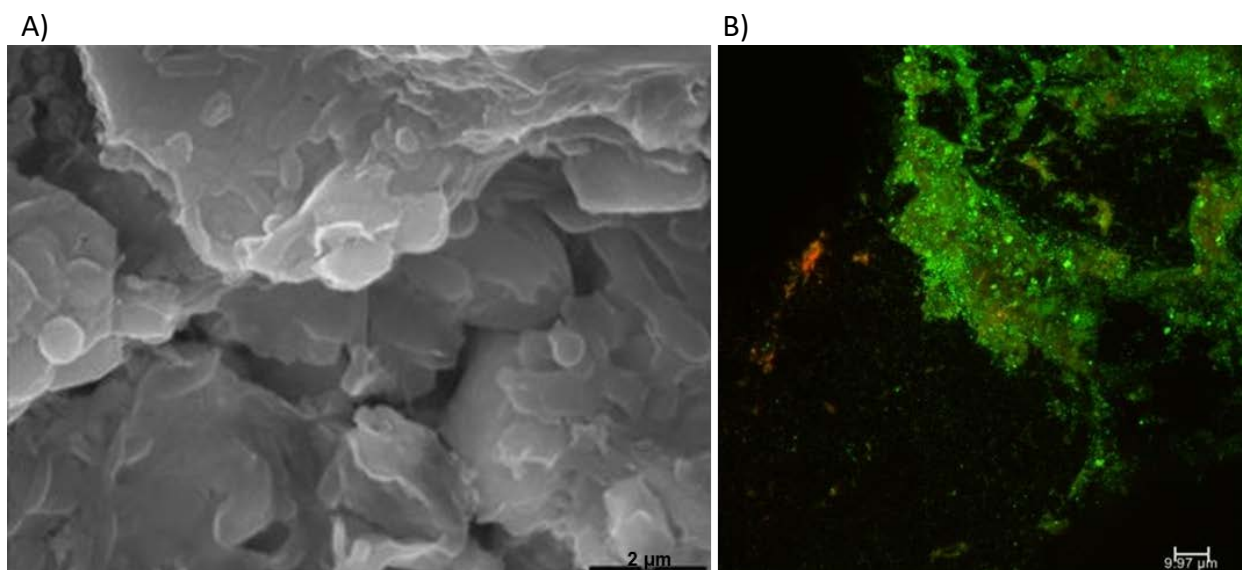


Figura 7. A) Microfotografía electrónica de barrido de un grano de arena. B) Microfotografía de fluorescencia confocal de una sección de un grano de arena, en verde células intactas, en rojo células con membrana dañada.

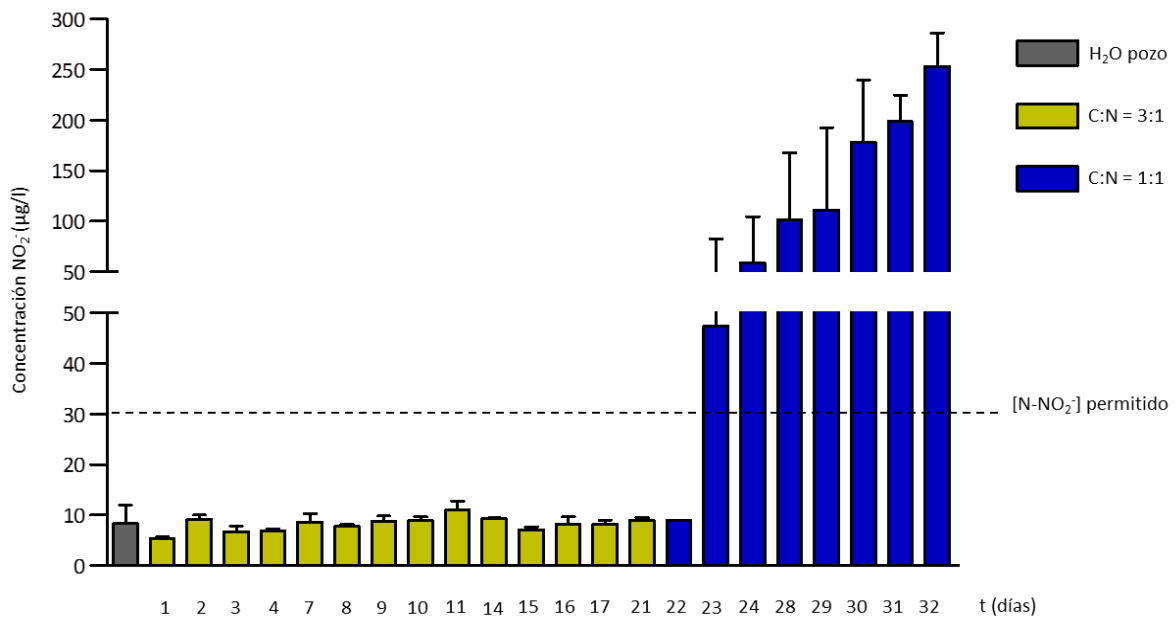


Figura 8. Concentración de N-NO₂⁻ en función del tiempo en el sistema continuo para distintas relaciones de C:N. Las barras representan el error estándar.

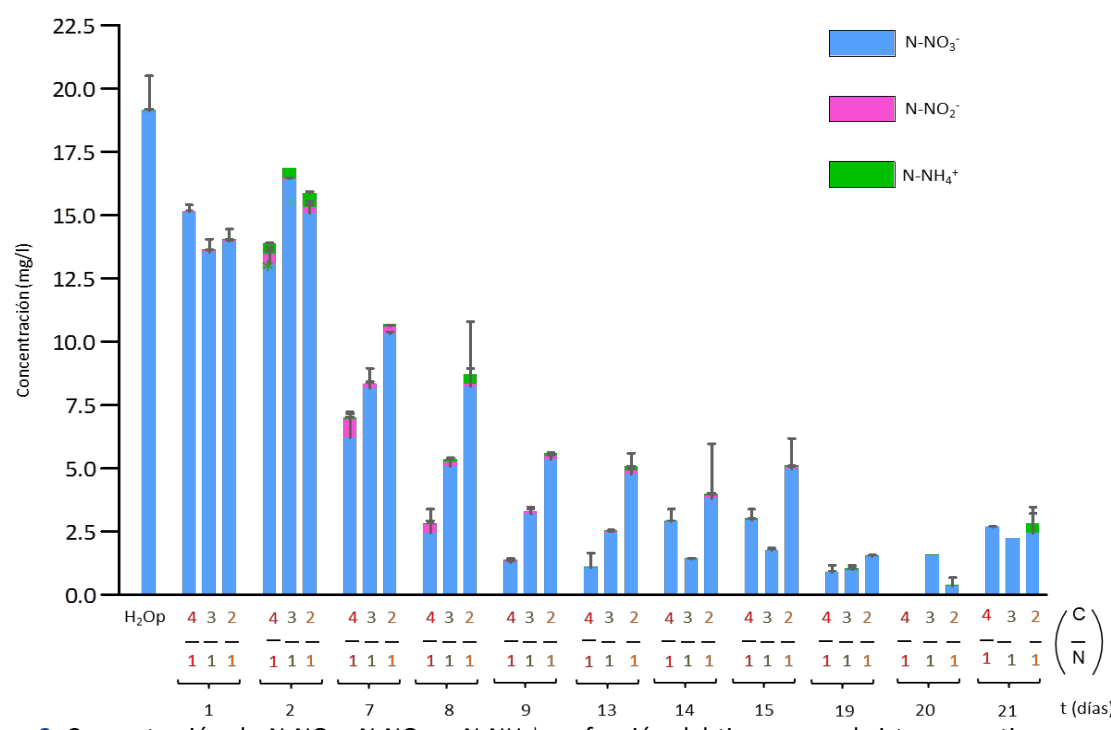


Figura 9. Concentración de N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺ en función del tiempo en el sistema continuo para distintas relaciones de C:N. Las barras representan el error estándar.

Pre-escalado: Diseño del conjunto de material de relleno y fuente de carbono y dimensiones de un sistema de tratamiento a escala piloto

Con la información recolectada se realizó un escalado 10X del proceso. El sistema se inició con una relación C:N (4:1) y etanol como fuente de carbono. Luego de 100 h de alimentación, equivalentes a 100 TRH, todos los iones alcanzaron valores de concentración inferiores a los límites establecidos para agua potable. A partir de ese momento se disminuyó la relación C:N a (2:1), manteniéndose la eficiencia de remoción por un período similar (Figura 10).

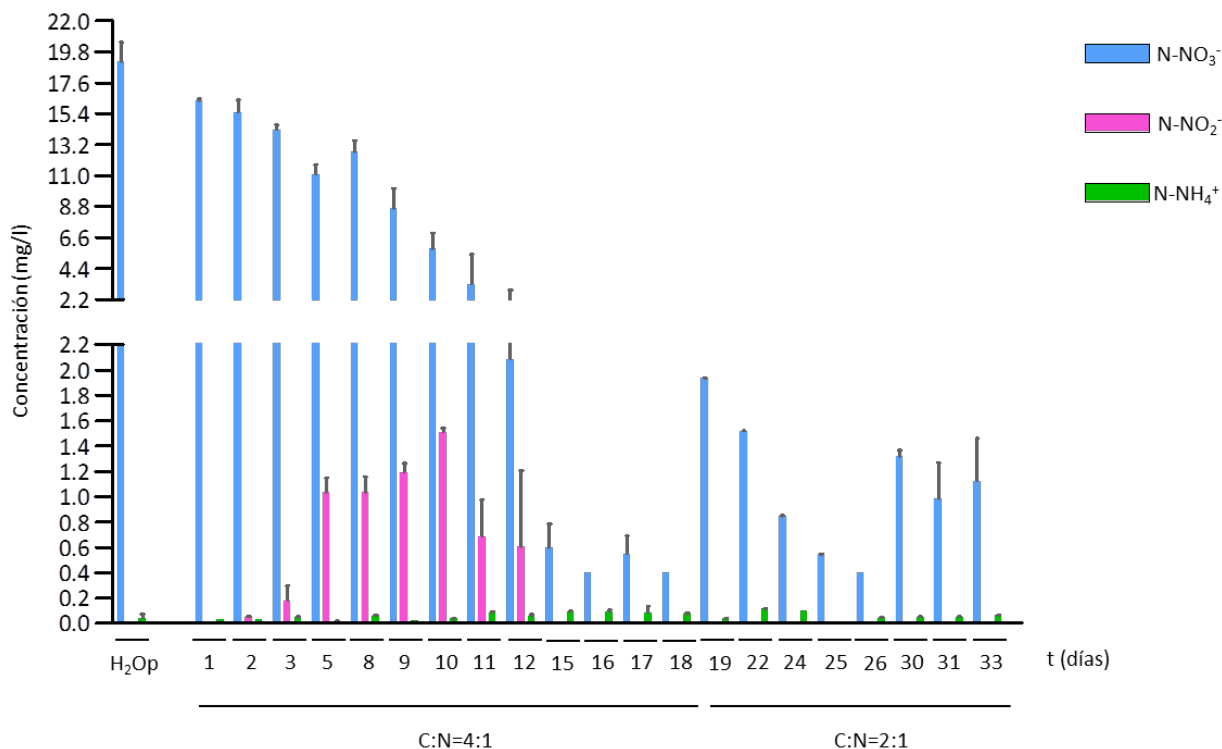


Figura 10. Variación en la concentración de N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺ en función del tiempo en los biorreactores a escala laboratorio 10X. Las barras representan el error estándar.

Debido a la reproducibilidad observada en los tiempos de aclimatación (Tabla 1) y la consistencia de los datos obtenidos a escala laboratorio, se procedió al escalado a Planta Piloto en un pozo de agua de la provincia de Buenos Aires con elevado contenido de nitratos, en el cual se montaron las instalaciones pertinentes. Los biorreactores de la Planta Piloto ya se encuentran en funcionamiento en sistema continuo, siendo la arena y el etanol, el material soporte y la fuente de C elegidas. La relación inicial C:N se fijó en 4:1. La Figura 11 muestra resultados preliminares de uno de los 4 biorreactores.

Tabla 1. Tiempos de aclimatación de biorreactores a escala laboratorio

Biorreactor	Tiempo de aclimatación
1X (acetato, C:N 4:1)	102 ± 0 TRH (n=2)
1X (etanol, C:N 4:1)	102 ± 0 TRH (n=2)
10X (etanol, C:N 4:1)	100 ± 0 TRH (n=2)

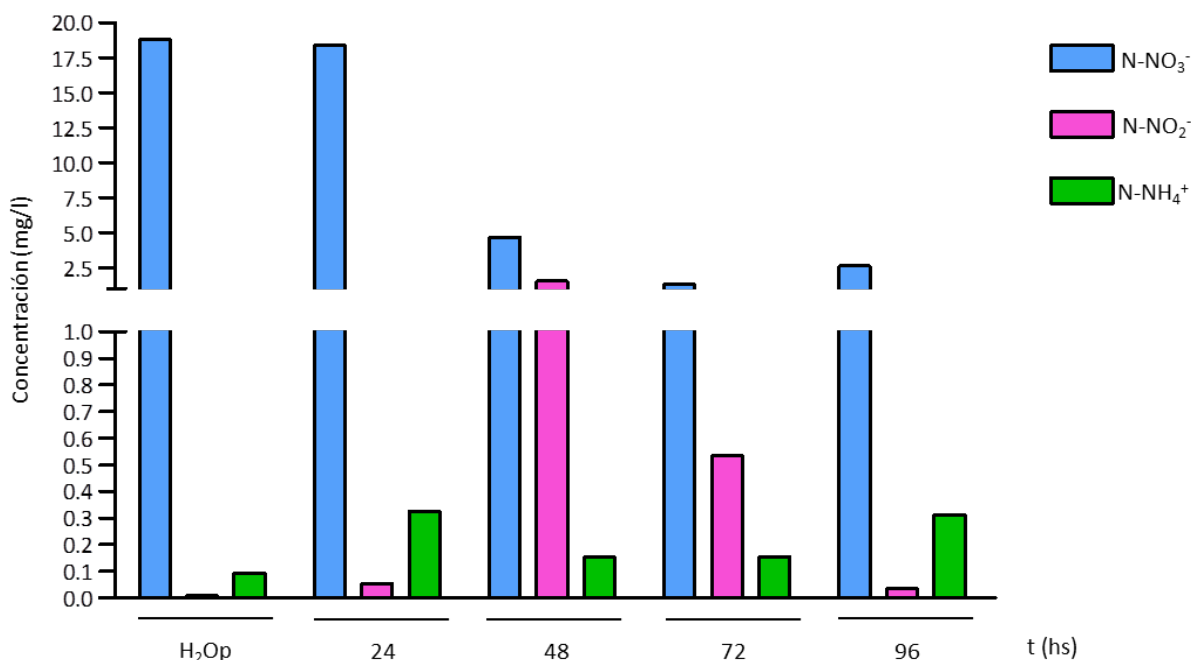


Figura 11. Variación de la concentración de N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ y N-NH₄⁺ en la Planta Piloto. Ensayo en proceso.

Discusión

En este trabajo se demostró la factibilidad de utilización de DB para el abatimiento de nitrato en agua subterránea proveniente de pozos dedicados al suministro de agua potable. Se seleccionaron las condiciones óptimas en el contexto local que permitieron el desarrollo de una comunidad microbiana desnitrificante, funcionalmente estable en un medio soporte accesible y disponible localmente. En dichas condiciones, se verificó no solo la disminución de la concentración del anión nitrato por debajo de los límites establecidos por el Código Alimentario Argentino, sino también que alcanzan las especificaciones para productos intermediarios o alternativos como nitrito y amonio.

En primer lugar, se definió la utilización de arena como soporte para el crecimiento bacteriano, ya que los soportes plásticos requirieron tiempos de aclimatación demasiado prolongados y debido a que el carbón activado granular mostró una respuesta prácticamente instantánea, no compatible con un

proceso biológico, probablemente asociada a un fenómeno de adsorción, el cual ha sido mencionado en distintas ocasiones (Moşneag 2013, Bhatnagar 2011). La relación C:N se considera determinante para el proceso, en caso de que sea baja puede dar lugar a una menor eficiencia de remoción, asociada a la formación de nitritos (Karanasios *et al.*, 2016; Gavazza *et al.*, 2004), mientras que una alta relación C:N podría devenir en un aumento del carbono orgánico disuelto y generar competencia con la RDNA (Rezvani *et al.*, 2019; Kraft *et al.*, 2014; Tugtas y Pavlostathis, 2007). En concordancia con estos resultados, en este trabajo se encontró que el empleo de una relación C:N (1:1) dio lugar a una desnitrificación incompleta con aumento en la concentración de nitrito. Adicionalmente, se detectó un incremento de la concentración de amonio en los ensayos continuos con relación C:N (4:1) atribuible a la RDNA y en alguna ocasión posterior a un período de carencia de nutrientes, posiblemente por lisis celular. Teniendo en cuenta estos datos se propuso el arranque de la escala piloto con una relación C:N 4:1, para luego llevar a 2:1 con la perspectiva de reducir parcialmente este valor, algo superior al óptimo descrito en literatura (Aslan, 2005) hasta llegar al límite para un funcionamiento confiable.

Al igual que lo observado por Webster y Togna (2009) y Jensen y Darby (2012), las condiciones establecidas permitieron la generación de una biopelícula desnitrificante a partir de las bacterias indígenas provenientes del acuífero. La comunidad desnitrificante fue moderadamente diversa en coincidencia a lo informado para un biofiltro a escala piloto alimentado con acetato, donde se detectaron alrededor de 10 géneros diferentes (Jensen y Darby, 2012). El tiempo requerido para alcanzar condiciones de desnitrificación fue de alrededor de 100 TRH en los ensayos de laboratorio continuos e incluso en la Planta Piloto. Un período de tiempo similar fue necesario cuando se trabajó con arena aclimatada. Los períodos de aclimatación reportados en bibliografía a escala piloto, fueron entre 10 días en Los Angeles (Los Angeles County Department of Public Works Water Works Division, 2013) y 2 a 3 semanas en Arlington (Jensen y Darby, 2012).

Actualmente se continúa trabajando en confirmar los parámetros operacionales, optimizar el consumo de reactivos químicos utilizados, determinar el balance de masa de materia orgánica y analizar la calidad microbiológica del agua desnitrificada para planificar el post-tratamiento de la misma.

Conclusiones

El presente estudio ha permitido establecer las condiciones a utilizar en la Planta Piloto para DB de agua subterránea. Se ha seleccionado arena (granulometría 1mm) como soporte adecuado para la formación de biopelículas microbianas activas capaces de producir desnitrificación. La utilización de acetato o etanol como fuente de carbono y electrones con una relación C:N de 2:1, favoreció la DB sobre la RDNA, obteniendo en consecuencia, valores aceptables para agua de consumo. Los excelentes resultados a escala laboratorio, promovieron el escalado a Planta Piloto, la cual se encuentra en funcionamiento con resultados preliminares prometedores que propician su aplicabilidad a escala industrial.

Agradecimientos

Agradecemos la confianza y colaboración del Lic. Omar Fioravanti y el Lic. Elio Mauro. LE y EF son miembros de la carrera de investigador científico y CD becario de CONICET.

Referencias bibliográficas

- Albers, C.N., Ellegaard-Jensen, L., Harder, C.B., Rosendahl, S., Knudsen, B.E., Ekelund, F., Aamand, J. (2015) Groundwater chemistry determines the prokaryotic community structure of waterworks sand filters, *Environ. Sci. Technol.*, **49**(2), 839–846. <https://doi.org/10.1021/es5046452>
- ANMAT, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, (2012) Bebidas hídricas, agua y agua gasificada, en: *Código Alimentario Argentino*, La Rocca, Buenos Aires, 7–21.
- APHA, (1999) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, en: *Stand. Methods Exam. Water Wastewater*, American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation, Washington, 733.
- Aslan, S. (2005) Combined removal of pesticides and nitrates in drinking waters using biodenitrification and sand filter system, *Process Biochem.*, **40**(1), 417–424.
- Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo, (2015) P13- Evolución de la concentración de nitratos en aguas subterráneas de la Cuenca Matanza Riachuelo, Consultado el 2015, Sist. Indicadores ACUMAR.
- Bhatnagar, A., & Sillanpää, M. (2011) A review of emerging adsorbents for nitrate removal from water. *Chemical Engineering Journal*, **168**(2), 493-504.
- Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W. (Eds.) (2007) *Biology of the nitrogen cycle*, 2007th ed. Elsevier Science. Ámsterdam, Países Bajos, 452 pp.
- Calderer, M., Gibert, O., Martí, V., Rovira, M., de Pablo, J., Jordana, S., Duro, L., Guimerà, J., Bruno, J. (2010) Denitrification in presence of acetate and glucose for bioremediation of nitrate-contaminated groundwater, *Environ. Technol.* **31**(7), 799–814. <https://doi.org/10.1080/09593331003667741>
- Debernardi, L., De Luca, D.A., Lasagna, M. (2008) Correlation between nitrate concentration in groundwater and parameters affecting aquifer intrinsic vulnerability, *Environ. Geol.*, **55**, 539–558.
- Di Capua, F., Papirio, S., Lens, P.N.L., Esposito, G. (2015) Chemolithotrophic denitrification in biofilm reactors, *Chem. Eng. J.*, **280**, 643–657.
- Evans, P.J., Opitz, E.M., Daniel, P. A., Schulz, C.R. (2010) Biological Drinking Water Treatment Perceptions and Actual Experiences in North America, Water Research Foundation and Department of Defense, 1–330.
- Gavazza Dos Santos, S., Amâncio Varesche, M.B., Zaiat, M., Foresti, E. (2004) Comparison of Methanol, Ethanol, and Methane as Electron Donors for Denitrification, *Environ. Eng. Sci.*, **21**(3), 313–320.
- Hallin, S., Throbäck, I.N., Dicksved, J., Pell, M. (2006) Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**(8), 5445–5452. <https://doi.org/10.1128/AEM.00809-06>
- Jensen, V.B., Darby, J.L. (2012) Drinking Water Treatment for Nitrate. Technical Report 6, en: *Addressing Nitrate California's Drink*. Water with a Focus Tulare Lake Basin Salinas Val. Groundwater. Rep. State Water Resour. Control Board Rep. to Legis., Center for Watershed Science Sciences, University of California, Davis., Davies, California, 182 pp.
- Jensen, V.B., Darby, J.L., Seidel, C., Gorman, C. (2014) Nitrate in potable water supplies: Alternative management strategies, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **44**, 2203–2286.
- Karanasios, K.A., Vasiliadou, I.A., Tekerlekopoulou, A.G., Akratos, C.S., Pavlou, S., Vayenas, D. V. (2016) Effect of C/N ratio and support material on heterotrophic denitrification of potable water in bio-filters using sugar as carbon source, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **111**, 62–73.

- Kraft, B., Tegetmeyer, H.E., Sharma, R., Klotz, M.G., Ferdelman, T.G., Hettich, R.L., Geelhoed, J.S., Strous, M. (2014) The environmental controls that govern the end product of bacterial nitrate respiration, *Science*, **345**(6197), 676–679. <https://doi.org/10.1126/science.1254070>
- Lasagna, M., De Luca, D.A., Franchino, E. (2016) The role of physical and biological processes in aquifers and their importance on groundwater vulnerability to nitrate pollution, *Environ. Earth Sci.*, **75**, 961.
- Leanza, L.N., Parente, J.R., Varanese, C.T., Echeverría, P.L. (2005) Presencia de nitratos en el agua subterránea del norte Bonaerense, *Av. en Energías Renov. y Medio Ambient.*, **9**, 13–17.
- Luo, G., Angelidaki, I. (2014) Analysis of bacterial communities and bacterial pathogens in a biogas plant by the combination of ethidium monoazide, PCR and Ion Torrent sequencing, *Water Res.*, **60**, 156–163.
- Magram, S.F. (2010) Drinking Water Denitrification in a Packed Bed Anoxic Reactor: Effect of Carbon Source and Reactor Depth, *J. Appl. Sci.* **10**(7), 558-563. doi: 10.3923/jas.2010.558.563.
- Mohseni-Bandpi, A., Elliott, D.J., Zazouli, M.A. (2013) Biological nitrate removal processes from drinking water supply- a review. *J. Environ. Heal. Sci. Eng.*, **11**, 35. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-11-35>
- Moşneag, S. C., Popescu, V., Dinescu, A., & Borodi, G. (2013) Utilization of granular activated carbon adsorber for nitrates removal from groundwater of the Cluj region. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, **48**(8), 918-924.
- Pessolano, B., Ruiz de Galarreta, A., Varni, M., Barranquero, R.S., Larsen, A., Schulz, C.J., Fernández, M.A., Castro, E.C., Silva Busso, A., Santa Cruz, J., Zhu, I.X., Getting, T., Bruce, D. (2005) Los nitratos y su evolución en el acuífero que provee de agua potable a General Acha, La Pampa, Argentina. *Águas Subterráneas*
- Rezvani, F., Sarrafzadeh, M.H., Ebrahimi, S., Oh, H.M. (2019) Nitrate removal from drinking water with a focus on biological methods: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **26**, 1124–1141.
- Seidel, C., Groman, C., Darby, J.L., Jensen, V.B. (2011) An assessment of the state of nitrate treatment alternatives - final report, *Am. Water Work. Assoc.*
- Shen, Z., Zhou, Y., Hu, J., Wang, J. (2013) Denitrification performance and microbial diversity in a packed-bed bioreactor using biodegradable polymer as carbon source and biofilm support, *J. Hazard. Mater.* **250**, 431-438.
- Tugtás, A.E., Pavlostathis, S.G. (2007) Electron donor effect on nitrate reduction pathway and kinetics in a mixed methanogenic culture, *Biotechnol. Bioeng.*, **98**(4), 756–763.
- Upadhyaya, G., Jackson, J., Clancy, T.M., Brown, J., Hayes, K.F., Raskin, L. (2010) Microbial Community in a Fixed-bed Bioreactor System used for Simultaneous Removal of Nitrate and Arsenic from Drinking Water, *IWA Water Res. Conf.*, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410005051> (accessed July 20, 2016)
- van den Berg, E. M., Boleij, M., Kuenen, J.G., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M. C. M. (2016) DNRA and denitrification coexist over a broad range of acetate/N-NO₃⁻ ratios, in a chemostat enrichment culture. *Front. Microbiol.* **7**:1842. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01842>
- WA DOH, Washington State Department of Health, Guidance Document: *Nitrate Treatment Alternatives for Small Water Systems*, (2005) 331–309. Acceso 8 de septiembre de 2021, disponible en: <https://www.doh.wa.gov/portals/1/Documents/pubs/331-309.pdf>
- WQTS, Water Quality & Treatment Solutions, inc. (2013) *Application of Biological Denitrification for Nitrate Removal from District 37 Groundwater*.
- Webster, T.S., Togna, P. (2009) *Demonstration of a Full-Scale Fluidized Bed Bioreactor for the Treatment of Perchlorate at Low Concentrations in Groundwater, Rialto CA*. Acceso 8 de septiembre de 2021, disponible en: https://www.serdp-estcp.org/content/download/5076/72370/file/ER-0543_FR_PMA_Final.pdf
- WHO, World Health Organization (2007) *Nitrate and Nitrite in Drinking Water*.
- Zhu, I.X., Getting, T., Bruce, D. (2010) Review of biologically active filters in drinking water applications, *J. Am. Water Work. Assoc.*, **102**, 67–77.