



Estudio del tratamiento del efluente de un reactor anaerobio de membranas sumergidas (SAnMBR) mediante un sistema de fangos activados.

Memoria que para optar al grado de Doctor por la Universitat de València, presenta **JAVIER EDUARDO SÁNCHEZ RAMÍREZ**.

Directores: Dr. Alberto Bouzas Blanco

Dra. M^a Francisca García Usach

Valencia, 2016

AGRADECIMIENTOS

Existen etapas en la vida que son muy importantes y en cada etapa participan personas que te ayudan a cumplir tus objetivos. Por ese motivo, quiero agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis y que me han acompañado en este proceso.

Quiero agradecer a los doctores Alberto Bouzas y M^a Francisca García por el tiempo dedicado en la dirección de este trabajo y por su confianza en estos años. A Paqui que a pesar de los problemas de salud siempre estuvo dispuesta a colaborar.

A los doctores José Ferrer y Aurora Seco por su confianza y por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis.

Al Departamento de Ingeniería Química de la Universitat de València por el buen trato y ayuda que siempre he recibido.

A todos mis compañeros del grupo de investigación CALAGUA. Especialmente a Javier, Brenda y Fredy por los momentos que hemos compartido y por haberme brindado su amistad. También deseo agradecer a Vicky, Luis, y Nuria por el apoyo sincero que he recibido por su parte a nivel profesional y personal.

A Josep, Daniel, Joaquín y Ramón por su calidad humana.

A Laura C, Laura S, Ana R, Ana P, Juan, Emérita, Rafa, Sara, Berta y Ángel por ser grandes compañeros de trabajo que han logrado que me sienta como en casa en todos estos años.

También deseo agradecer a Silvia, Mónica, Patricia, Dani, Tao, Alex, Nuria y Johana por su compañerismo y porque de una u otra manera han contribuido a la realización de este trabajo.

A Claudia Amorocho y al grupo de investigación USCO agroindustria de la Universidad SurColombiana y a Colciencias (Conv 617). A la empresa DAM y al equipo de I+D por su confianza.

A Dios por darme la oportunidad de estar aquí y conocer este magnífico país. A todas las personas de NHR, Manuel Umaña y en especial a Juan Pablo, Marinela, Nata, Edwin, Juan Carlos y Jesús que han compartido conmigo esta etapa. A mi Padre y mi familia en Colombia que desde el principio me han brindado un gran apoyo, en especial a Alirio por ser un padre, tío y amigo a la vez.

Especialmente a mi Madre que fue ella quien construyó ese puente entre dos continentes y recorrió parte de este camino apoyándome y animándome a continuar. A mis hermanas Jaqueline y Johana gracias por su apoyo y confianza en estos años. A Miguel y Alfonso por su apoyo constante cuando lo necesitaba. A mis sobrinos Andrés, Dylan y Angélica porque han hecho parte esencial de mi vida con su inocencia y ternura.

Finalmente, dedico este trabajo a mi hijo Emmanuel que llegó en un momento muy importante en mi vida y por quien he decidido avanzar en este proceso. Su inocencia, dulzura y alegría me dan fuerza para crecer cada día. A mi esposa Pilar por creer en este proyecto de vida, porque con su apoyo incondicional, amor, paciencia y su sabiduría, me ha fortalecido y ha sido mi ayuda idónea todos estos años.

A mi Hijo y mi Esposa.

RESUMEN

RESUMEN

El crecimiento acelerado de los núcleos urbanos ha provocado que las aguas residuales urbanas sean una fuente importante de contaminación ambiental, siendo necesario desarrollar e implementar tecnologías enfocadas a prevenir y mitigar los graves problemas de contaminación.

El uso de un reactor anaerobio de membrana sumergida (SAnMBR) para el tratamiento de aguas residuales urbanas es una alternativa que permite transformar la materia orgánica en biogás y minimizar los fangos producidos. Sin embargo produce un efluente con concentraciones de nitrógeno y fósforo similares a las del agua residual afluente, con concentraciones moderadas de materia orgánica biodegradable y metano disuelto y en ocasiones concentraciones significativas de sulfuro. Por tanto, el efluente del SAnMBR en caso de no poder ser reutilizado directamente para uso agrícola, debe ser tratado para poder ser vertido, reutilizado en usos industriales y evitar la emisión del sulfuro y el metano a la atmósfera.

Hasta la fecha, la mayoría de investigaciones sobre el postratamiento de efluentes anaerobios se centran en estudiar los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo de forma aislada, incluyendo el trabajo de algunos autores que emplean el sulfuro y el metano disuelto en los procesos de desnitrificación. Sin embargo, el estudio conjunto de todos los procesos para el tratamiento del efluente real de un reactor SAnMBR que trata agua residual urbana no ha sido realizado.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el estudio en conjunto de todos los procesos para el tratamiento del efluente de un reactor (SAnMBR) que trata agua residual urbana, mediante un proceso de fangos activados con configuración UCT. Tiene como fin conocer y cuantificar la influencia de diversos factores ambientales y de operación sobre el rendimiento y la eliminación biológica de nitrógeno, fósforo, sulfuro y metano disuelto presentes en el efluente de un SAnMBR que trata agua residual urbana.

RESUMEN

Inicialmente, se estudió el potencial de desnitrificación mediante la puesta en marcha y seguimiento de un reactor SBR (Sequencing Batch Reactor) a escala laboratorio, empleando los dadores de electrones (materia orgánica, sulfuro y metano disuelto) presentes en el efluente del SAnMBR.

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio en una planta piloto de fangos activados que permitió analizar la influencia de la temperatura, el tiempo de retención hidráulico (TRH) y la concentración de ácidos grasos volátiles, sulfuro y metano disuelto sobre los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo. También, se estudió el efecto del sulfuro y el tiosulfato sobre la nitrificación mediante ensayos en laboratorio con fango de la planta piloto y fango procedente de estaciones depuradoras. Así mismo, se realizaron ensayos con sulfuro y ácidos grasos volátiles como dadores de electrones con el fin de evaluar su papel en la desnitrificación.

Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron determinar que el sulfuro actúa como inhibidor de la nitrificación. El TRH en este sistema tiene gran influencia, siendo necesarios TRH mayores a 16 h para disminuir el efecto inhibidor del sulfuro. También, se determinó que el tiosulfato no actuó como inhibidor de la nitrificación. Asimismo, se observó que además de los ácidos grasos volátiles, el sulfuro y el metano disuelto participan como dadores de electrones en la desnitrificación, observándose una mayor afinidad por el sulfuro que por los ácidos grasos volátiles. El seguimiento del proceso de eliminación biológica de fósforo ha permitido observar que los organismos acumuladores de polifosfatos presentan una elevada tolerancia a los cambios ambientales y operacionales experimentados en el sistema estudiado.

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que es posible combinar tratamientos anaerobios con sistemas de fangos activados y tratar efluentes provenientes de reactores anaerobios con un alto contenido de sulfuro. Esta combinación es de gran interés y presenta una alternativa tecnológicamente viable que permitiría la reutilización del agua tratada para varios usos.

RESUM

El creixement accelerat dels nuclis urbans ha provocat que las aigües residuals urbanes (ARU) siguen una font important de contaminació ambiental, sent necessari desenvolupar i implementar tecnologies enfocades a previndre i mitigar els greus problemes de contaminació.

L'ús d'un reactor anaerobi de membrana submergida (SAnMBR) per al tractament d'aigües residuals urbanes és una alternativa que permet transformar la matèria orgànica en biogàs i minimitzar els fangs produïts. No malgrat això produïx un efluent amb concentracions de nitrogen i fòsfor semblants a les de l'aigua residual afluent, amb concentracions moderades de matèria orgànica biodegradable i metà dissolt i de vegades concentracions significatives de sulfur. Llavors, l'efluent del SAnMBR en cas de no poder ser reutilitzat directament per a ús agrícola, ha de ser tractat per a poder ser abocat, reutilitzat en usos industrials i evitar l'emissió del sulfur i el metà a l'atmosfera.

Fins a la data, la majoria d'investigacions sobre el posttractament d'efluents anaerobis se centren a estudiar els processos de nitrificació, desnitrificació i eliminació biològica de fòsfor de forma aïllada, incloent el treball d'alguns autors que empren el sulfur i el metà dissolt en els processos de desnitrificació. No obstant això, l'estudi conjunt de tots els processos per al tractament de l'efluent real d'un reactor SAnMBR que tracta aigua residual urbana no ha sigut realitzat.

L'objectiu principal d'esta tesi doctoral ha sigut l'estudi en conjunt de tots els processos per al tractament de l'efluent d'un reactor (SAnMBR) que tracta aigua residual urbana, per mitjancant un d'un procés de fangs activats amb configuració UCT. Té com a fi conèixer i quantificar la influència de diversos factors ambientals i d'operació sobre el rendiment i l'eliminació biològica de nitrogen, fòsfor, sulfur i metà dissolt presents a l'efluent d'un SAnMBR que tracta aigua residual urbana.

RESUM

Inicialment, es va estudiar el potencial de desnitrificació per mitjançant la posada en marxa i seguiment d'un reactor SBR (Sequencing Batch Reactor) a escala laboratori, emprant els donadors d'electrons (matèria orgànica, sulfur i metà dissolt) presents en l'efluent del SAnMBR.

Posteriorment, es va dur a terme l'estudi en una planta pilot de fangs activats que va permetre analitzar la influència de la temperatura, el temps de retenció hidràulic (TRH) i la concentració d'àcids grassos volàtils (AGV), sulfur i metà dissolt sobre els processos de nitrificació, desnitrificació i eliminació biològica de fòsfor. També, es va estudiar l'efecte del sulfur i el tiosulfato sobre el procés de nitrificació per mitjançant assajos en laboratori amb fang de la planta pilot i fang procedent d'estacions depuradores. Així mateix, també es van realitzar assajos utilitzant sulfur i AGV com a donadors d'electrons per a avaluar el seu paper en la desnitrificació.

Els resultats obtinguts en esta tesi van permetre determinar que el sulfur actua com a inhibidor de la nitrificació. El TRH en este sistema té gran influència, sent necessaris TRH majors a 16 h per a disminuir l'efecte inhibidor del sulfur. També, es va determinar que el tiosulfato no actua com inhibidor de la nitrificació. Així mateix, es va observar que a més dels AGV, el sulfur i el metà dissolt participen com a donadors d'electrons en la desnitrificació, observant-se una major afinitat pel sulfur que pels AGV. El seguiment del procés d'eliminació biològica de fòsfor ha permés observar que els organismes acumuladors de polifosfatos presenten una elevada tolerància als canvis ambientals i operacionals experimentats en el sistema.

Els resultats d'esta tesi posen de manifest que és possible combinar tractaments anaerobis amb sistemes de fangs activats i tractar efluent provinents de reactors anaerobis amb un alt contingut de sulfur. Esta combinació resulta de gran interès i presenta una alternativa tecnològicament viable que permetria la reutilització d'aigua tractada per a diversos usos.

SUMMARY

The increasing population living in urban areas is producing larger amount of urban wastewater, which remains an important source of environmental pollution. Therefore, it is necessary to develop and implement new technologies focused on prevention and mitigation of the growing pollution problems associated.

The use of a submerged anaerobic membrane reactor (SAnMBR), for urban wastewater treatment is an alternative to obtain biogas from transform organic matter, minimizing the sludge produced. However, the anaerobic reactor produces an effluent with nitrogen and phosphorus concentration similar to the influent, with moderate concentrations of biodegradable organic matter, dissolved methane and sometimes significant concentrations of sulphide. Therefore, the effluent from SAnMBR must be treated in order to be discharge or reused in order to prevent the emission of sulphide and methane into the atmosphere.

Current studies on anaerobic effluent treatment are focused on studying the processes of nitrification, denitrification and biological phosphorus removal develop separately. Some authors have studied the denitrification processes using sulphide and dissolved methane. Nevertheless, the set of all processes for treating a SAnMBR effluent on the treating urban wastewater has not been studied.

The main aim of this thesis is to study the processes for the treatment of the effluent from a reactor (SAnMBR) all together, dealing with urban waste water by a process of activated sludge UCT configuration. It also aims to understand and quantify the influence of various environmental and operating factors on the yield in the biological nitrogen removal, phosphorus, sulphide and dissolved methane present in the effluent from a SAnMBR reactor.

SUMMARY

Initially, the denitrification potential was studied by the implementation and monitoring of a SBR (Sequencing Batch Reactor) at laboratory scale, using the different electron donors (organic matter, sulphide and dissolved methane) present in the SAnMBR effluent.

Subsequently, the study carried out in a pilot plant of activated sludge allowed analyzing the influence of temperature, hydraulic retention time (HRT) and the concentration of volatile fatty acids (VFA), sulphide and dissolved methane, on the nitrification, denitrification and biological phosphorus removal. The effect of sulphide and thiosulphate on the nitrification process was also studied during laboratory tests, using sludge from pilot plant and sludge from sewage treatment plants. Further ahead, some laboratory tests were also performed using sulphide and VFA, both as electron donors, in order to assess their role in the denitrification process.

The results obtained from this study allowed us to determine that sulphide acts as a nitrification inhibitor. The HRT in this system has a massive influence, HRT greater than 16 hours is being required to reduce sulphide's inhibitory effect. It is also determined that the thiosulphate does not participate as nitrification inhibitor. It was also determined that the addition of volatile fatty acids, sulphide and dissolved methane as electron donors take part in denitrification, showing a higher affinity for sulfur by volatile fatty acids. The process of biological phosphorus removal has allowed us to observe that the polyphosphate Accumulating organisms have high tolerance to environmental and operational changes experienced in the studied system.

The results of this thesis show that, it is possible to combine anaerobic treatment with an activated sludge systems and treat effluents from anaerobic reactors with high sulphide content. This combination is of great interest because it presents a viable technological alternative that would allows the reuse of treated water for different uses.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	<i>CONTAMINACIÓN DEL AGUA</i>	3
1.1.1	Eutrofización	3
1.1.2	Incremento de los gases de efecto invernadero	4
1.1.3	Problemas asociados al sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	5
1.2	<i>LEGISLACIÓN AMBIENTAL</i>	7
1.3	<i>TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES</i>	11
1.4	<i>PROCESOS AEROBIOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....</i>	12
1.4.1	Eliminación de materia orgánica	13
1.4.2	Eliminación biológica de nitrógeno	14
1.4.2.1	Nitrificación	14
1.4.2.2	Desnitrificación	17
1.4.3	Eliminación biológica de fósforo.....	20
1.4.4	Eliminación biológica de metano.....	22
1.4.5	Esquemas de eliminación conjunta de materia orgánica, nitrógeno y fósforo	24
1.4.5.1	Esquema A ² /O	24
1.4.5.2	Esquema UCT (University of Cape Town).....	25
1.4.5.3	Reactores biológicos de membrana (MBR).....	26
1.5	<i>PROCESOS ANAEROBIOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES</i>	28
1.5.1	Procesos implicados en los tratamientos anaerobios	29
1.5.1.1	Hidrólisis.....	30
1.5.1.2	Acidogénesis	30
1.5.1.3	Acetogénesis	31
1.5.1.4	Metanogénesis.....	31
1.5.1.5	Reducción del sulfato	32
1.5.2	Esquemas de tratamientos anaerobios	35
1.5.2.1	Reactores Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB).....	35
1.5.2.2	Reactores Biológicos Anaerobios de Membranas (AnMBR)	38
1.5.3	Efluentes anaerobios	40
1.5.3.1	Características de los efluentes anaerobios.....	40
1.5.4	Tratamiento de efluentes anaerobios	42
1.5.4.1	Fangos activados	45
1.5.4.2	Microalgas	47

INDICE

1.6	<i>MICROBIOLOGÍA ASOCIADA AL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES</i>	48
1.6.1	Características de los organismos nitrificantes	50
1.6.2	Características de los organismos desnitrificantes	52
1.6.3	Características de los organismos acumuladores de polifosfatos	53
1.6.4	Características de los organismos metanotróficos	54
1.6.5	Características de los organismos sulfatorreductores	56
1.6.6	Técnica FISH: identificación y cuantificación	57
2	OBJETIVOS	63
2.1	<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	63
3	MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.1	<i>PLANTA PILOTO ANAEROBIA DE MEMBRANAS SUMERGIDAS</i>	69
3.1.1	Descripción de la planta	70
3.1.2	Funcionamiento de la planta	71
3.2	<i>PLANTA PILOTO DE FANGOS ACTIVADOS</i>	72
3.2.1	Descripción de la planta piloto	72
3.2.1.1	Componentes auxiliares	75
3.2.1.2	Instrumentación	78
3.2.1.3	Comunicación y monitorización	80
3.2.2	Procedimiento experimental	82
3.2.2.1	Operación y seguimiento	82
3.3	<i>REACTORES A ESCALA LABORATORIO</i>	85
3.3.1	Reactor SBR	86
3.3.2	Reactores para el estudio de la inhibición de la nitrificación con sulfuro y tiosulfato.	90
3.3.3	Reactores para el estudio de la desnitrificación	94
3.4	<i>MÉTODOS ANALÍTICOS Y MICROBIOLÓGICOS</i>	97
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
4.1	<i>REACTOR SBR</i>	108
4.1.1	Determinación del grado de desnitrificación	111
4.1.2	Influencia de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), sulfuro y metano disuelto en la desnitrificación	120
4.1.3	Análisis microbiológico	132
4.1.4	Criterios y recomendaciones	136

4.2	ESTUDIO EN PLANTA PILOTO	138
4.2.1	Etapa I (0 a 220 días)	139
4.2.1.1	Nitrificación	142
4.2.1.2	Desnitrificación	153
4.2.1.3	Eliminación biológica de fósforo	164
4.2.2	Etapa II (310 a 445 días)	172
4.2.2.1	Nitrificación	177
4.2.2.2	Desnitrificación	182
4.2.2.3	Eliminación biológica de fósforo	191
4.2.3	Etapa III (480 a 750 días)	196
4.2.3.1	Nitrificación	199
4.2.3.2	Desnitrificación	207
4.2.3.3	Eliminación biológica de fósforo	214
4.2.4	Análisis comparativo de los periodos estudiados	219
4.2.5	Ensayos en laboratorio	228
4.2.5.1	Inhibición de la nitrificación por sulfuro y tiosulfato	228
4.2.5.2	Desnitrificación con ácido acético y sulfuro	254
5	CONCLUSIONES	267
6	BIBLIOGRAFÍA	275
7	ANEXOS	301
7.1	ANEXO I. PERFILES OBTENIDOS CON LAS SONDAS INSTALADAS EN LA PLANTA PILOTO	301
7.2	ANEXO II. NOMENCLATURA	305
7.3	ANEXO III. RESUMEN DE LOS CRITERIOS DE CALIDAD REQUERIDOS PARA LA REUTILIZACIÓN DE AGUA DEPURADA SEGÚN LOS USOS (RD1620/2007).	307

Relación de Tablas

Tabla 1. Condiciones de vertido para una EDAR, RD 509/1996.	9
Tabla 2. Requisitos de vertido en zonas sensibles, procedentes de EDAR, directiva 91/271/CEE.	9
Tabla 3. Características de los efluentes anaerobios.	42
Tabla 4. Caudales iniciales empleados durante la operación de la planta piloto.	83
Tabla 5. Parámetros determinados en las analíticas de seguimiento del proceso. (Analíticas rutinarias) 84	
Tabla 6. Parámetros adicionales determinados en las analíticas exhaustivas.	84
Tabla 7. Variables de operación del reactor SBR.	89
Tabla 8. Sondeas de hibridación empleadas en la técnica FISH.	104
Tabla 9. Caracterización del afluente	108
Tabla 10. Condiciones de operación del reactor SBR.	109
Tabla 11. Concentraciones y porcentaje de desnitrificación durante el periodo I de operación SBR.	113
Tabla 12. Concentraciones y porcentaje de desnitrificación durante el periodo II de operación SBR.	115
Tabla 13. Concentraciones y porcentaje de desnitrificación durante el periodo III de operación SBR.	116
Tabla 14. Concentraciones y porcentaje de desnitrificación durante el periodo IV de operación SBR.	118
Tabla 15. Concentraciones y grado de desnitrificación durante el periodo V de operación SBR.	119
Tabla 16. Potencial de desnitrificación de los dadores presentes al inicio de cada periodo, DQO requerida y porcentaje de desnitrificación.	122
Tabla 17. DQO degradada (AGV, S^{2-} , CH_4), DQO requerida y DQO demandada en cada periodo.	123
Tabla 18. N- NO_3 teórico que podría eliminarse a partir de AGV, sulfuro y metano disuelto eliminado en cada periodo y N- NO_3 eliminado experimentalmente.	124
Tabla 19. Concentración de sulfuro y sulfato en cada periodo de operación del reactor SBR.	128
Tabla 20. Experimento de oxidación de sulfuro a sulfato en condiciones aerobias.	130
Tabla 21. Experimento de oxidación de sulfuro a sulfato en condiciones anóxicas.	131
Tabla 22. Sondeas específicas empleadas en la técnica FISH.	133
Tabla 23. Abundancia de organismos desnitrificantes, metanotróficos y sulfatorreductores presentes en el reactor SBR en cada periodo.	134
Tabla 24. Condiciones de operación en cada etapa.	139
Tabla 25. Características del inóculo.	140
Tabla 26. Parámetros físico-químicos del afluente	140
Tabla 27. Condiciones de operación en la etapa I	141
Tabla 28. Concentración en el afluente de CH_4 disuelto y AGV en la etapa I.	149
Tabla 29. Concentración de amonio, nitrito y nitrato durante el ensayo.	153
Tabla 30. Evolución de la concentración de amonio, nitrito y nitrato en el afluente y efluente etapa I. 154	
Tabla 31. Concentración de nitrito y nitrato al final de la zona anóxica.	155
Tabla 32. Potencial de desnitrificación de los dadores presentes en el afluente.	162
Tabla 33. Nitrato que teóricamente podría desnitrificarse con cada uno de los dadores de electrones y nitrato eliminado durante la etapa I.	163

TABLAS

Tabla 34. Evolución de la concentración de fósforo durante la etapa I.	164
Tabla 35. Características del inóculo durante la etapa II.....	173
Tabla 36. Parámetros físico-químicos del afluente durante la etapa II.	173
Tabla 37. Condiciones medias de operación en la etapa II.	175
Tabla 38. Concentración media de amonio, nitrito y nitrato en el afluente y efluente en la etapa II.	183
Tabla 39. Concentración media de nitrito y nitrato al final de la etapa anóxica.	183
Tabla 40. Concentración de AGV, sulfuro y metano presentes en el afluente, DQO requerida, nitrógeno eliminado y porcentaje de desnitrificación en la etapa II.	187
Tabla 41. Nitrato que teóricamente podría desnitrificarse con cada uno de los dadores de electrones y nitrato eliminado durante la etapa II.	188
Tabla 42. Evolución de la concentración de fósforo durante la etapa II.	191
Tabla 43. Características del inóculo.	196
Tabla 44. Parámetros físico-químicos del afluente durante la etapa III.....	197
Tabla 45. Condiciones medias de operación en la etapa III.	198
Tabla 46. Concentración de amonio, nitrito y nitrato en el afluente y efluente en la etapa III.	208
Tabla 47. Concentración de nitrito y nitrato al final de la etapa anóxica.	208
Tabla 48. Concentración de (AGV, $S-S^2$ y CH_4) disponible en el afluente, DQO requerida, nitrógeno eliminado y porcentaje de desnitrificación etapa III.....	212
Tabla 49. Nitrato que teóricamente podría desnitrificarse con cada uno de los dadores de electrones presentes y nitrato realmente eliminado durante la etapa III.	214
Tabla 50. Seguimiento de la concentración de fósforo durante la etapa III.....	215
Tabla 51. Comparación del porcentaje de nitrificación alcanzado en diferentes periodos.	220
Tabla 52. Comparación entre periodos durante la desnitrificación.	221
Tabla 53. Concentración de AGV, sulfuro y metano en periodos con mayor desnitrificación.	223
Tabla 54. Comparación entre periodos con mayor porcentaje de eliminación de fósforo.....	224
Tabla 55. Concentraciones de nitrógeno (en sus diferentes fracciones), fósforo total, DQO total y sólidos suspendidos del efluente para los periodos evaluados.	226
Tabla 56. Condiciones de los experimentos realizados para el estudio de la inhibición de la nitrificación por sulfuro y tiosulfato.	229
Tabla 57. Velocidades de consumo de amonio, ensayos de inhibición con fango de la planta piloto.....	239
Tabla 58. Velocidades de consumo de amonio de los ensayos de inhibición con fango de la EDAR del Carraixet.....	248
Tabla 59. Ensayos de desnitrificación empleando ácido acético y sulfuro como dador de electrones. ..	255
Tabla 60. Velocidad de consumo de nitrógeno en los ensayos de desnitrificación.	263

Relación de Figuras

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del azufre (Lens y Kuene, 2001).	6
Figura 2. Sistema convencional de fangos activados.	13
Figura 3. Esquema A ² /O.....	25
Figura 4. Esquema UCT.....	26
Figura 5. Esquema de reactores biológicos de membranas. Sumergida (A) y de flujo tangencial (B).	28
Figura 6. Etapas y procesos implicados en la degradación anaerobia de la materia orgánica.....	29
Figura 7. Procesos implicados en la reducción de sulfato (Giménez, 2014).....	33
Figura 8. Esquema reactor UASB (GTZ/TBW, 2001).	36
Figura 9. Esquema general del proceso SANI (Wang <i>et al.</i> , 2009).	37
Figura 10. Esquema general de un reactor SAnMBR.....	39
Figura 11. Dominios de la vida (Bacteria, Eukarya y Archaea).	49
Figura 12. Rutas para la oxidación de CH ₄ y la asimilación de formaldehído. (Hanson y Hanson 1996)....	55
Figura 13. Esquema general de tratamiento reactor SAnMBR (Giménez <i>et al.</i> , 2011).	69
Figura 14. Planta piloto de fangos activados.	72
Figura 15. Diagrama general de la planta piloto.	73
Figura 16. Zona anaerobia y anóxica.	74
Figura 17. Zona aerobia.	74
Figura 18. Sistema de agitación.....	75
Figura 19. Soplante de la planta piloto.....	76
Figura 20. Bomba de recirculación.	76
Figura 21. Bomba peristáltica.....	77
Figura 22. Válvulas y conducciones.	77
Figura 23. Cuadro eléctrico.	78
Figura 24. Sonda de pH.....	78
Figura 25. Sonda redox.	79
Figura 26. Sonda de oxígeno disuelto.....	79
Figura 27. Sonda combinada de amonio y nitrato.	80
Figura 28. Sistema de control y adquisición de datos SCADA.	81
Figura 29. Sistema de comunicación de la planta piloto.	82
Figura 30. Esquema y fotografía del montaje experimental del reactor SBR.....	87
Figura 31. Etapas durante un ciclo de operación.	89
Figura 32. Fotografía y esquema del dispositivo BIOCALIBRA.....	91
Figura 33. Diagrama de flujo para el estudio de la inhibición de la nitrificación en presencia de sulfuro o tiosulfato.	93
Figura 34. Montaje experimental, ensayos de desnitrificación con sulfuro y ácido acético.	95
Figura 35. Diagrama de flujo para los ensayos de desnitrificación.	96
Figura 36. Evolución de la concentración de los sólidos suspendidos totales y volátiles en el SBR.....	110

FIGURAS

Figura 37. Evolución de la concentración de nitrato, nitrito y nitrógeno gas durante la operación del SBR durante el ciclo 2.....	112
Figura 38. Fotografía del reactor SBR, presencia de azufre elemental.	128
Figura 39. Oxidación química del sulfuro durante 24 h para dos efluentes. Izq (Erlenmeyer con efluente SAnMBR), Dcha (Erlenmeyer con efluente con efluente sintético).	132
Figura 40. Microfotografía FISH, total de bacterias EUBmix (A), organismos desnitrificantes sonda AT1458 (B).	135
Figura 41. Microfotografía FISH, total de bacterias sonda EUBmix (A), organismos metanotróficos tipo I sonda Mg 84 (B).	135
Figura 42. Evolución del TRC durante la etapa I.	142
Figura 43. Influencia de las características del afluente sobre la nitrificación.	143
Figura 44. Abundancia de organismos AOB y NOB durante la etapa I.	146
Figura 45. Evolución de la concentración de sulfuro y sulfato en la etapa I.	149
Figura 46. Microfotografía FISH, organismos filamentosos <i>Thiothrix</i> (A), total de bacterias sonda EUB mix (B). Morfología en campo claro (C yD).	151
Figura 47. Evolución de la OUR y la concentración de amonio, nitrito y nitrato con el tiempo.....	153
Figura 48. Abundancia de organismos desnitrificantes y metanotróficos durante la etapa I.	157
Figura 49. Influencia de las características del afluente sobre la desnitrificación.	158
Figura 50. Abundancia de organismos PAO durante la etapa I.	166
Figura 51. Influencia de las características del afluente sobre la eliminación biológica de fósforo.	167
Figura 52. Evolución del TRC durante la etapa II.	175
Figura 53. Influencia de las características del afluente sobre la nitrificación.	176
Figura 54. Abundancia de organismos AOB y NOB durante la etapa II.	178
Figura 55. Evolución de la concentración de sulfuro y sulfato en el afluente y efluente, etapa II.....	181
Figura 56. Abundancia de organismos desnitrificantes y metanotróficos etapa II.	185
Figura 57. Influencia de las características del afluente sobre la desnitrificación en la etapa II.	186
Figura 58. Perfil de compuestos de azufre en la planta piloto sin presencia organismos (TRH: 13 h).	190
Figura 59. Perfil de compuestos de azufre en la planta piloto con presencia organismos (TRH: 13 h). ...	190
Figura 60. Influencia de las características del afluente sobre la eliminación biológica de fósforo.	193
Figura 61. Abundancia de organismos PAO durante la etapa II.	194
Figura 62. Evolución del TRC durante la etapa III.	199
Figura 63. Influencia de las características del afluente sobre la nitrificación en la etapa III.	201
Figura 64. Evolución de la concentración de amonio durante los cambios del TRH realizados.....	203
Figura 65. Abundancia de organismos AOB y NOB etapa III.	204
Figura 66. Evolución de la concentración de sulfuro en el afluente y en el efluente, etapa III.	206
Figura 67. Abundancia de organismos desnitrificantes y metanotróficos tipo I y II en la etapa III.	209
Figura 68. Influencia de las características del afluente sobre la desnitrificación.	211
Figura 69. Abundancia de organismos PAO en la etapa III.	216

Figura 70. Influencia de las características del afluente sobre la EBP, etapa III.	218
Figura 71. Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) y de la OUR (Exp 1).	231
Figura 72. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la planta piloto a 13°C (Exp 2).	233
Figura 73. Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) y de la OUR con fango de la planta piloto a 20°C (Exp 3).	235
Figura 74. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la planta piloto a 20°C (Exp 4).	237
Figura 75. Evolución de la concentración de amonio en presencia de tiosulfato a 20°C (Exp 5).	240
Figura 76. Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) y de la OUR con fango de la EDAR del Carraixet a 13°C (Exp 6).	242
Figura 77. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la EDAR del Carraixet a 13°C (Exp 7).	244
Figura 78. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR empleando fango de la EDAR del Carraixet a 20°C (Exp 8).	245
Figura 79. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la EDAR del Carraixet a 20°C (Exp 9).	247
Figura 80. Evolución de la concentración de amonio en presencia de tiosulfato a 20°C (Exp 10).	249
Figura 81. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la EDAR Quart-Benàger (Exp 11).	251
Figura 82. Ensayos de desnitrificación con ácido acético como dador de electrones. Aceptores de electrones: (A) nitrato, (B) nitrato (I parte) y nitrito (II parte), (C) nitrato/nitrito simultáneamente.	258
Figura 83. Ensayos de desnitrificación con sulfuro. A partir de nitrato (ensayo A'), nitrito (ensayo B'), nitrato y nitrito (ensayo C').	262
Figura 84. Perfiles obtenidos con las sondas instaladas en la planta piloto etapa II.	302
Figura 85. Perfiles obtenidos con las sondas instaladas en la planta piloto etapa III.	304

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso imprescindible para la vida humana, la industria, la agricultura y el desarrollo de grandes ciudades. Al ser utilizada en diversos procesos se genera gran cantidad de agua residual, usualmente con altas concentraciones de sustancias contaminantes por encima de los valores permitidos por la legislación existente. Por tanto, es necesario tratar las aguas residuales antes de su vertido a ríos, mares y acuíferos para controlar y evitar la contaminación.

Las sustancias contaminantes que suelen encontrarse habitualmente en las aguas residuales son materia orgánicas y nutrientes (nitrógeno y fósforo). El vertido de agua residual no tratada genera un agotamiento del oxígeno en el medio receptor, y un crecimiento excesivo de microalgas relacionado con el exceso de nutrientes en el medio conocido como eutrofización.

Para minimizar los efectos causados por los vertidos y mejorar la calidad de los medios receptores, la legislación existente pone unos límites al contenido de sólidos, materia orgánica y nutrientes en las aguas residuales a verter. Actualmente, para eliminar estos contaminantes del agua residual, en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) se aplica una combinación de operaciones y procesos unitarios físicos, químicos y biológicos cuyo único objetivo es obtener agua con una calidad adecuada para su vertido o uso posterior.

Los procesos biológicos para la depuración del agua residual han ganado un gran interés al permitir la eliminación de materia orgánica y nutrientes sin la adición de reactivos químicos. Además, generan una menor cantidad de fangos que el proceso químico, presentado menores costes de tratamiento y de evacuación de los mismos.

Actualmente, uno de los procesos más empleados para el tratamiento de agua residual mediante tratamientos biológicos es el sistema de fangos activados. En Europa, el agua residual urbana es depurada prácticamente en su totalidad mediante tratamientos biológicos aerobios. Uno de los inconvenientes en el uso de los procesos aerobios es su elevado consumo energético, motivo por el cual se hace necesaria la implementación de alternativas de tratamiento más sostenibles.

Una alternativa al tratamiento aerobio es el tratamiento anaerobio, que es ampliamente utilizado en climas donde las temperaturas ambiente están entre 20-30°C, ya que permiten establecer fácilmente condiciones mesofílicas para el proceso (Mahmoud, 1995). En cambio, en países con bajas temperaturas ambiente, en los cuales el agua residual es depurada en su mayoría por tratamientos aerobios, el estudio de una alternativa de tratamiento anaerobio sería muy conveniente.

El uso de tratamientos anaerobios supone un cambio de paradigma, y requiere superar ciertas limitaciones relacionadas con las bajas temperaturas tales como la velocidad de crecimiento de los organismos y la eficacia de separación de la biomasa. Algunas de estas limitaciones pueden ser superadas haciendo uso conjunto de los tratamientos anaerobios y la tecnología de membranas. Estudios realizados por (Liao *et al.*, 2006; Fawehinmi *et al.*, 2007; Jeison y Van Lier, 2007; Lew *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2011) utilizan estos sistemas y han obtenido resultados satisfactorios a escala laboratorio y piloto para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales.

El uso conjunto de procesos anaerobios y membranas representa una tecnología capaz de llevar a cabo el proceso anaerobio a baja temperatura, con un bajo coste energético y económico. Sin embargo, un aspecto importante en la utilización de esta tecnología es la generación de efluentes con concentraciones importantes de nutrientes (nitrógeno y fósforo), metano

disuelto y en ocasiones concentraciones importantes de sulfuro, siendo necesario estudiar su tratamiento, con el fin de obtener opciones tecnológicas que permitan eliminar los contaminantes presentes y obtener efluentes que cumplan con la legislación actual.

1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

En la actualidad la contaminación de las aguas puede producirse por causas naturales o antrópicas, pero estas últimas son las que generan mayor deterioro en la calidad del agua. El vertido a ríos, mares y acuíferos de aguas contaminadas con sustancias orgánicas o nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo, provoca efectos negativos, como por ejemplo, la eutrofización. En los vertidos de agua residual también pueden encontrarse otros contaminantes como por ejemplo sustancias orgánicas prioritarias, presentes en concentraciones traza pero muy dañinas para el medio ambiente. A su vez, los procesos de tratamiento de las aguas contaminadas pueden dar lugar a otros contaminantes como el sulfuro de hidrógeno, óxidos de nitrógeno o el metano disuelto.

1.1.1 Eutrofización

El agua natural o una fuente oligotrófica contienen una concentración baja de nutrientes, tiene un crecimiento pobre de algas, una concentración adecuada de oxígeno y, por lo general, tiene una biota establecida. Una fuente eutrófica, al contrario, contiene un elevado contenido de nutrientes principalmente nitrógeno (amonio, nitrito o nitrato) y fósforo (ortofosfato).

El elevado contenido de nutrientes genera una actividad fotosintética importante que se refleja en el crecimiento excesivo de microalgas. Este aumento de microalgas en el medio genera mayores tasas de descomposición

que consumen el oxígeno disuelto, aumentando la turbidez del agua y limitando la entrada de luz. Por tanto se dificulta el desarrollo de vegetación y cualquier forma de vida acuática.

1.1.2 Incremento de los gases de efecto invernadero

Se consideran gases de efecto invernadero a aquellos gases que absorben y emiten radiación, en determinada longitud de onda del espectro de radiación infrarroja emitido por la superficie de la tierra, la atmósfera y las nubes. El vapor de agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O), metano (CH_4), y ozono (O_3) son los principales gases de efecto invernadero en la atmósfera terrestre. Además, existen otros como hexafluoruro de azufre (SF_6), hidrofluorocarbonos (HFC) y perfluorocarbonos (PFC).

Según la Agencia Gubernamental para el Cambio Climático (IPCC, 2006) el porcentaje aproximado de gases de efecto invernadero actual es de 72,3 % de CO_2 , 16,6 % de CH_4 , 7,6 % de N_2O , 2,7 % de compuestos fluorados y 0,4 % de SF_6 . Existe una gran preocupación debido a que gran cantidad se encuentran almacenados bajo la superficie de la tierra o disueltos en el agua. Estimaciones realizadas mencionan que un aumento en la temperatura de la tierra de 3 grados permitiría que se liberaran 250.000 millones de toneladas de estos gases.

De acuerdo a lo descrito en el anexo A del protocolo de Kyoto, las EDAR realizan diversos procesos para el tratamiento de agua residual que generan gases de efecto invernadero, fundamentalmente metano y óxido nitroso.

Uno de estos procesos es el tratamiento anaerobio de aguas residuales, que genera concentraciones importantes de metano disuelto (gas de efecto invernadero con potencial de calentamiento global 21 veces superior al CO_2 (Singh y Viraraghavan, 1998; Keller y Hartley, 2003), siendo necesario estudiar su tratamiento o recuperación.

Otro gas de efecto invernadero es el óxido nitroso, con potencial de calentamiento global 300 veces superior al CO₂, y que puede ser emitido en el tratamiento de aguas residuales durante la eliminación biológica de nitrógeno. En la actualidad siguiendo con las directrices de la Agencia Gubernamental para el Cambio Climático (IPCC, 2006) existen diversos estudios que plantean la posibilidad de realizar una estimación de la cantidad de óxido nitroso en el tratamiento de aguas residuales. Las medidas realizadas se llevan a cabo sobre los procesos de nitrificación y desnitrificación (Wang *et al.*, 2008; Kampschreur *et al.*, 2009; Daelman *et al.*, 2012).

1.1.3 Problemas asociados al sulfuro de hidrógeno (H₂S)

Los problemas de olores y los problemas de corrosión, entre otros que se perciben y observan en las plantas de tratamiento de aguas residuales, son problemas bastante recurrentes. Usualmente se producen por la presencia de los compuestos reducidos de azufre como el sulfuro de hidrógeno.

Además de los problemas de corrosión y olores que genera este compuesto, algunos estudios (Sears *et al.*, 2004; Bejarano *et al.*, 2013) mencionan la posible inhibición de algunos procesos biológicos desarrollados en las EDAR en presencia de sulfuros. Este es un aspecto importante a tener en cuenta en el desarrollo de tecnologías que combinen diversos procesos y donde esté presente el sulfuro.

Los compuestos de azufre suelen estar presentes en los vertidos de aguas residuales de la industria petroquímica, textil, tenería, procesadoras de alimento y papel. En los vertidos de aguas urbanas el azufre se encuentra habitualmente en forma de sulfato, pero en los colectores o en el propio tratamiento se pueden generar sulfuros a partir de la reducción del sulfato.

La química del azufre es compleja debido a los estados de oxidación que presenta, y que dan lugar a la formación de diferentes compuestos mediante procesos químicos de oxidación-reducción y mediante procesos biológicos (Figura 1). Los compuestos de mayor importancia debido a la estabilidad son el sulfuro, el azufre elemental y el sulfato, siendo el sulfato el compuesto más oxidado y el sulfuro el más reducido.

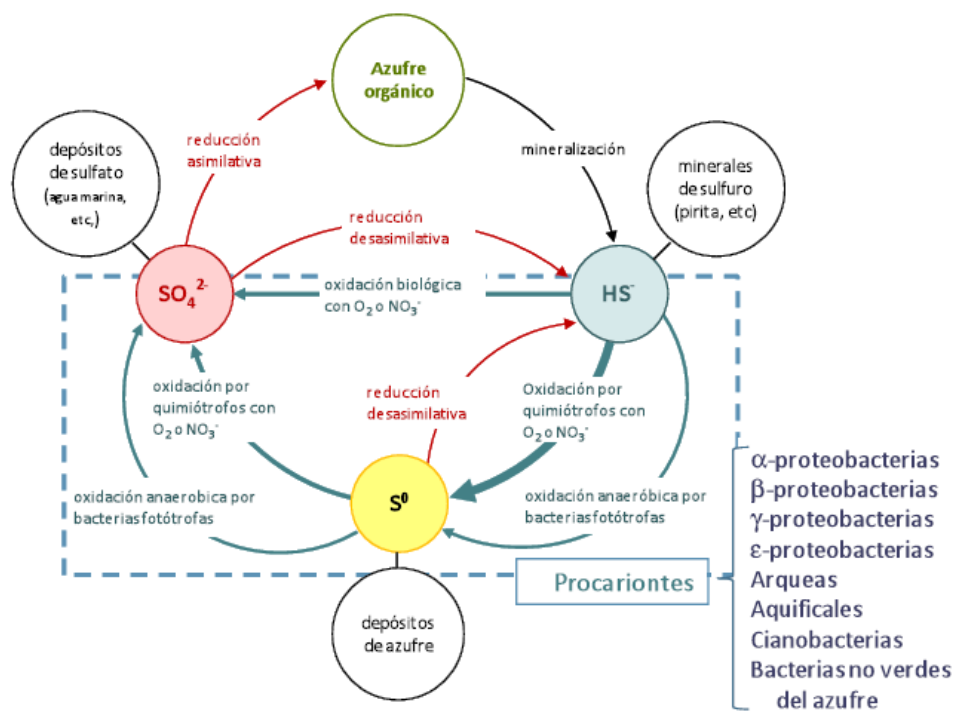
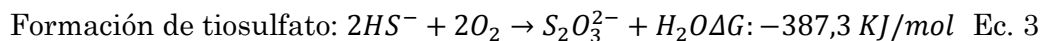
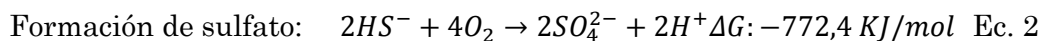
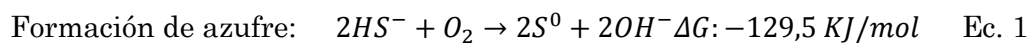


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del azufre (Lens y Kuene, 2001).

El sulfato (SO_4^{2-}) se reduce a sulfuro (H_2S) por la acción bacteriana y en condiciones anaerobias. El sulfuro se oxida a tiosulfato, azufre, sulfito o sulfato. La forma en la que el sulfuro está presente en el ambiente se relaciona con el pH. Si el pH es mayor que 11 está en mayor porcentaje como ión sulfuro (S^{2-}). A pH neutro existe un equilibrio entre la forma no ionizada de sulfuro (H_2S) y el ión sulfuro de hidrógeno (HS^-). A pH menor que 7 está en mayor porcentaje como sulfhídrico (H_2S).

Janssen *et al.* (1995) observaron que el producto final de la oxidación del H_2S es el azufre si la reacción ocurre en condiciones limitadas de oxígeno ($<0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y es el sulfato si la reacción ocurre a concentraciones mayores de oxígeno.

Las reacciones más importantes de la oxidación-reducción de sulfuro se presentan a continuación:



1.2 LEGISLACIÓN AMBIENTAL

A nivel europeo se han formulado varias directivas para la protección y control de la contaminación en los ecosistemas acuáticos naturales, así como para la protección contra la contaminación atmosférica. A continuación, se mencionarán aquellas que hacen referencia a la protección de las masas de agua y regulan la calidad del agua que puede ser vertida. Del mismo modo se mencionan aquellas que regulan la contaminación atmosférica.

Con respecto a la protección de las masas de aguas, la Directiva 2000/60/EC establece el marco de actuación en la política de aguas entre los estados de la Comunidad Europea. Esta directiva tiene como objetivo principal proteger el estado ecológico de las masas de agua.

La Directiva 91/271/CEE de aguas residuales urbanas, modificada por la Directiva 98/15/CE, establece que es necesario disponer de sistemas colectores y realizar el tratamiento de las aguas residuales urbanas y las procedentes de determinadas industrias.

Las normas aplicables al control del vertido de aguas residuales en España se detallan en el Real Decreto 509/1996 del 15 de marzo.

En el Real Decreto 509/1996 se impone la aplicación de tratamientos a las aguas residuales antes de su vertido a las aguas continentales o marítimas y

se definen los criterios para que una zona sea considerada “sensible” o “menos sensible”. La rigurosidad del tratamiento aplicado al agua residual dependerá de la zona donde se realiza el vertido.

Estas medidas legislativas incentivan y justifican el estudio de los tratamientos que permitan eliminar los contaminantes presentes. En las EDAR los tratamientos a aplicar deben garantizar que se cumplan los niveles exigidos en las directivas mencionadas anteriormente.

Los vertidos de EDAR que incluya un tratamiento secundario o equivalente deben cumplir las concentraciones de vertido relacionadas con las concentraciones de sólidos y materia orgánica presentes en el efluente y que están definidas en la Tabla 1.

El vertido de una EDAR a una zona sensible debe cumplir además de las condiciones expuestas anteriormente, las condiciones de concentración o reducción de nutrientes fijadas para el nitrógeno y el fósforo (Tabla 2). Para cumplir con la concentración y reducción de nutrientes se debe tener en cuenta el tamaño de la EDAR expresado en habitantes equivalente (h-e).

Con respecto a la protección del ambiente atmosférico, la legislación española sobre calidad del aire viene representada por la Ley 34/2007 y el Real Decreto 102/2011. En estas leyes se define la base legal para los desarrollos relacionados con la evaluación y la gestión de la calidad del aire en España, y tiene como fin último el de alcanzar unos niveles óptimos de calidad del aire para evitar, prevenir o reducir riesgos o efectos negativos sobre la salud humana, el medio ambiente y demás bienes de cualquier naturaleza. En este sentido, el problema de la contaminación atmosférica tiene dos enfoques: las inmisiones (calidad del aire) y las emisiones de contaminantes procedentes del ejercicio de ciertas actividades potencialmente contaminadoras, cualquiera que sea su localización.

Tabla 1. Condiciones de vertido para una EDAR, RD 509/1996.

Parámetro	Concentración	%Reducción
Demanda biológica de oxígeno DBO₅	25 mgO ₂ ·l ⁻¹	70-90%
Demanda química de oxígeno DQO	125 mgO ₂ ·l ⁻¹	75%
Sólidos totales en suspensión	35mg·l ⁻¹ (más 10,000h-e) 60mg·l ⁻¹ (de 2000 a 10,000h-e)	90% 70%

Tabla 2. Requisitos de vertido en zonas sensibles, procedentes de EDAR, directiva 91/271/CEE.

Nutriente	Concentración	%Reducción
Fósforo total	2 mg·l ⁻¹ (10,000-100,000 h-e) 1 mg·l ⁻¹ (más de 100,000 h-e)	80%
Nitrógeno total	15 mg·l ⁻¹ (10,000-100,000 h-e) 10 mg·l ⁻¹ (más de 100,000 h-e)	70-80%

Con respecto a la calidad del aire y de acuerdo al Real Decreto 102/2011, el sulfuro (H₂S) se encuentra dentro de los contaminantes gaseosos a controlar en función de la concentración en el medio y del tiempo de exposición. El valor límite es de 100 µg·m⁻³ (0,001 ppm) para 30 min de exposición y 40 µg·m⁻³ (0,00004 ppm) para 24 horas.

El umbral de detección del sulfuro de hidrógeno (H₂S) es excesivamente bajo y varía entre 0,0085 y 1 ppmv (De Zwart and Kuenen 1992; Lomans *et al.*, 2002), entre 0,0005 y 0,01 ppmv (Ruth, 1986) o entre 0,01 y 0,3 ppmv (Guidotti, 1994). La sensibilidad a la hora de detectar un olor depende del individuo (sensibilidad, subjetividad, costumbre, etc.) y del ambiente (humedad, temperatura, etc.) (Ward *et al.*, 2004).

Tanto la American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) como el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo en España (INSHT) consideran, que el valor límite ambiental de exposición diaria (VLA-ED) durante una jornada de trabajo de ocho horas al H₂S de una persona no debe exceder concentraciones de 5 ppm (7,0 mg·m⁻³). Así mismo, el valor límite ambiental de exposición de corta duración (VLA-EC) para un periodo continuado de 15 min a lo largo de una jornada laboral no debe exceder concentraciones de 10 ppm (14,0 mg·m⁻³).

La Agencia para la Seguridad y la Salud en el Trabajo (OSHA) de los Estados Unidos considera que el límite de exposición permisible (PEL) que define la concentración máxima que un trabajador puede estar expuesto durante una jornada de trabajo de ocho horas al sulfuro, no debe superar una concentración de 10 ppm. También define que la exposición de pico máxima durante 10 min en una jornada de trabajo es de 50 ppm. OSHA define la exposición máxima de pico como los niveles máximos de seguridad de una sustancia que un trabajador puede estar expuesto. Sin embargo, la exposición pico máximo sólo se refiere a las situaciones en las que existe una exposición nula a la sustancia para las otras 7 horas y 50 minutos del día. Además, considera que una concentración igual o superior a 100 ppm puede ser "un peligro inmediato para la vida y la salud."

El Protocolo de Kyoto establece la reducción de las emisiones de seis gases (dióxido de carbono, metano, óxido nitroso, hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos y hexafluoruro de azufre) que provocan el calentamiento global. El metano disuelto con un 15% es el segundo compuesto que más contribuye al calentamiento global de la tierra (efecto invernadero), sólo superado por el dióxido de carbono con un 75%.

El metano se caracteriza por su baja solubilidad y elevada persistencia en la atmósfera. Su producción se distribuye en diversos sectores donde el tratamiento de agua residual constituye el 2,6% de la producción total.

Según el Real Decreto 508/2007, que define los umbrales de emisión, se establece que el umbral de emisión a la atmósfera de metano se sitúa en 100.000 Kg·año⁻¹ de metano.

El óxido nitroso (N₂O) es un importante gas de efecto invernadero con una permanencia media de 100 años en la atmósfera. Actualmente se le atribuye el 5% del efecto invernadero artificial, además de atacar la capa de ozono reduciendo éste a oxígeno molecular y liberando dos moléculas de monóxido de nitrógeno (NO). Según el Real Decreto 508/2007 mencionado anteriormente, el umbral de emisión a la atmosfera para el N₂O es de 10.000 Kg·año⁻¹.

1.3 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Para mejorar la calidad de las aguas residuales antes de su vertido es necesario aplicar un tratamiento que permita eliminar o disminuir la concentración de sólidos en suspensión, materia orgánica, nitrógeno y fósforo.

Hay distintos tipos de tratamiento de las aguas residuales donde cada uno de los métodos específicos se clasifica en operaciones unitarias. Se utilizan operaciones unitarias físicas y procesos unitarios químicos o biológicos que permiten obtener los requisitos de vertido exigidos por la legislación.

Entre las operaciones unitarias físicas que se pueden llevar a cabo en una EDAR las de mayor aplicación son: absorción (aireación), flotación, mezclado, floculación, sedimentación y filtración.

Las principales operaciones unitarias químicas aplicadas en EDAR son: adsorción, precipitación, coagulación y desinfección.

Las operaciones unitarias biológicas emplean organismos capaces de producir reacciones bioquímicas que modifican la calidad del agua residual. Los procesos biológicos se emplean principalmente para eliminar la materia orgánica y los nutrientes presentes en el agua residual.

Los procesos biológicos se clasifican según el medio en el que se encuentran los organismos y según el aceptor de electrones presentes en el medio.

- Según el medio en el que se encuentran los organismos se clasifican en: procesos de cultivo en suspensión y procesos de soporte fijo. En los cultivos en suspensión los microorganismos se encuentran suspendidos en el medio líquido y en los de soporte fijo los microorganismos se encuentran sobre un soporte sólido inerte.
- Según el aceptor de electrones presente en el medio se clasifican fundamentalmente en: aerobios (fangos activados, filtros aerobios, biodiscos, lagunas aireadas) y anaerobios (UASB, mono-etapa, filtros anaerobios, reactores de lecho fluidizado, reactores anaerobios de membrana).

1.4 PROCESOS AEROBIOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

El proceso biológico de cultivo en suspensión más utilizado en la actualidad es el sistema de fangos activados. El esquema convencional de un sistema de fangos activados consiste en un reactor y un decantador secundario (Figura 2). La biomasa presente se mantiene en suspensión y en condiciones aerobias durante un periodo de tiempo suficiente para eliminar la materia orgánica. Posteriormente la biomasa es separada mediante un decantador secundario. Parte de la biomasa separada es recirculada al reactor con el fin

de mejorar el rendimiento del proceso y mantener una concentración de sólidos en el reactor. Uno de los parámetros más importantes en este sistema es el Tiempo de Retención Celular (TRC), el cual es fijado y controlado mediante el caudal de purga.

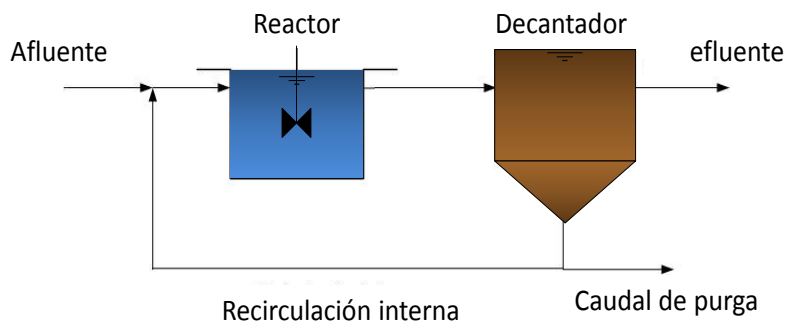


Figura 2. Sistema convencional de fangos activados.

1.4.1 Eliminación de materia orgánica

Según los estudios realizados por Ekama y Marais (1979), la materia orgánica se clasifica en soluble y particulada, biodegradable y no biodegradable; todas éstas expresadas en términos de DQO. En condiciones aerobias el aceptor de electrones utilizado en las transformaciones bioquímicas es el oxígeno. Los organismos heterótrofos presentes en el reactor utilizan la materia orgánica biodegradable soluble como fuente de alimento para su crecimiento y para producir la energía necesaria para los procesos metabólicos (anabolismo y catabolismo).

La materia orgánica particulada necesita ser transformada mediante hidrólisis en moléculas más simples como lactato, piruvato, etanol, acetato, antes de ser consumida por los organismos heterótrofos.

En el anabolismo se construyen grandes biomoléculas complejas a partir de moléculas más pequeñas. Algunos de los procesos más importantes incluyen la síntesis de proteínas a partir de aminoácidos, la formación de glucosa y la síntesis de ADN a partir de nucleótidos.

El catabolismo engloba todos los procesos enzimáticos empleados por los organismos para obtener energía a partir de la oxidación de compuestos. El siguiente paso es la utilización de dicha energía para sintetizar componentes celulares esenciales produciéndose las reacciones anabólicas o biosintéticas.

1.4.2 Eliminación biológica de nitrógeno

En el agua residual, el nitrógeno se puede encontrar en diferentes formas, nitrógeno orgánico, amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-); y en concentraciones variables, siendo las formas orgánica y amoniacal las que predominan en la mayoría de los casos. Aproximadamente, el 60% del nitrógeno presente en las aguas residuales urbanas se encuentra en forma orgánica (aminoácidos, proteínas y urea), mientras el 40% restante se encuentra en forma inorgánica como amonio.

En las EDAR, el nitrógeno presente en el agua residual urbana puede ser eliminado en varias etapas, pero en muchas ocasiones no es suficiente para cumplir con los requisitos de vertido. En la decantación primaria es eliminado entre un 5-10% del nitrógeno total. En el proceso biológico se utiliza entre un 10-30% para cubrir las necesidades de la biomasa. El restante es eliminado aplicando tratamientos biológicos adicionales.

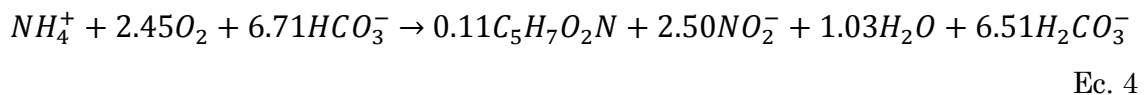
Actualmente, el tratamiento más aceptado y adecuado para eliminar el nitrógeno incluye los procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación, que transforman el nitrógeno amoniacal contenido en las aguas residuales en nitrógeno gas (N_2).

1.4.2.1 Nitrificación

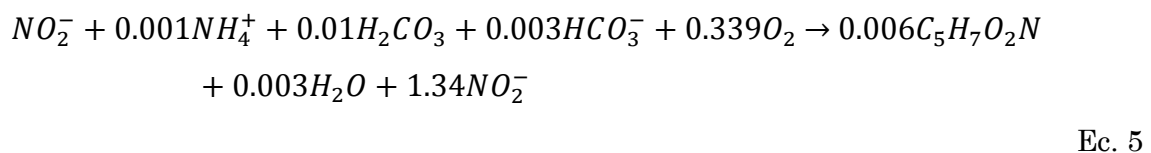
La nitrificación es un proceso que transforma el nitrógeno amoniacal en nitrato utilizando organismos autótrofos, en condiciones aerobias. Ocurre en dos etapas: en la primera, el nitrógeno amoniacal es oxidado a nitrito por las

organismos amonioxidantes (Ec. 4); y en la segunda, el nitrito es oxidado a nitrato por organismos nitritooxidantes (Ec. 5). Las reacciones de síntesis celular se presentan a continuación donde la composición celular está representada como $C_5H_7O_2N$ (Grady *et al.*, 1999):

Organismos amonioxidantes



Organismos nitritooxidantes



Existen parámetros que pueden influir en el proceso de nitrificación tales como: temperatura (T), alcalinidad (ALK), pH, oxígeno disuelto (OD), Tiempo de Retención Celular (TRC), y la presencia de sustancias inhibidoras o tóxicos.

Uno de los parámetros que más afecta a la velocidad de nitrificación es la temperatura (Harremoës *et al.*, 1998). El intervalo de temperatura en el que puede desarrollarse la nitrificación está comprendido entre 4 y 45 °C, siendo 35 °C la temperatura óptima de los organismos amonioxidantes y entre 35-42 °C para los organismos nitritooxidantes (EPA, 1992).

La falta de alcalinidad produce dos efectos: en primer lugar, los organismos nitrificantes carecen del carbono inorgánico necesario para su metabolismo; en segundo lugar, se provoca un descenso importante del pH. Según Metcalf y Eddy (1995), cada $mg \cdot l^{-1}$ de $N-NH_4$ oxidado consume $7,14 mg \cdot l^{-1}$ de alcalinidad expresada como $CaCO_3$.

Teniendo en cuenta que los organismos responsables de la nitrificación son estrictamente aerobios, la concentración de OD puede convertirse en un

factor limitante siendo necesario mantener unas concentraciones adecuadas en el reactor, con el objetivo de no llegar a disminuir o inhibir la nitrificación (Grady *et al.*, 1999). Por cada mg de N-NH₄⁺ (nitrógeno en forma de amonio) oxidado a N-NO₃ (nitrógeno en forma de nitrato) se necesitan 4,57 mg de O₂. Se ha observado que concentraciones de oxígeno disuelto inferiores a 1 mg · l⁻¹ pueden conducir a una reducción significativa de la velocidad de crecimiento de los organismos nitrificantes.

La velocidad de crecimiento de los organismos nitrificantes es baja comparada con la de los organismos heterótrofos responsables de la degradación de materia orgánica. Es decir, es necesario emplear TRC elevados para lograr un buen desarrollo del proceso de nitrificación.

La nitrificación es un proceso crítico en la eliminación biológica de nitrógeno y puede verse afectado por varios factores ambientales y operacionales como los mencionados anteriormente. De igual forma existen sustancias capaces de afectar o de inhibir este proceso y han sido reportadas por varios autores como sustancias inhibitoras. McCarty (1999) menciona más de 30 sustancias que pueden ocasionar inhibición. De igual forma, explica el posible mecanismo que siguen este tipo de compuestos y que afectan a los organismos amonioxidantes y nitritooxidantes. Algunas de las sustancias inhibitoras mencionadas están formadas por compuestos reducidos de azufre capaces de inactivar la enzima AMO (ammonia monooxygenase) y competir por el sitio activo sobre el que actúa la enzima.

La presencia de compuestos de azufre, como el sulfuro, en determinados tipos de aguas residuales, como los efluentes de procesos anaerobios, ha abierto nuevas investigaciones, con el fin de relacionar y entender el efecto del sulfuro sobre la inhibición de la nitrificación. Algunos estudios (Juliette *et al.*, 1993; Sears *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2011; Bejarano *et al.*, 2013) mencionan los efectos del sulfuro y la concentración (0,5-5 mg S · l⁻¹) a la que puede actuar como inhibidor del proceso. También destacan que la

inhibición es reversible, y que el proceso de nitrificación se recupera después de eliminar el sulfuro presente. Otro estudio realizado en un reactor batch, explica que la presencia de sulfuro genera una acumulación de nitrito, destacando la sensibilidad de los organismos nitritooxidantes frente a este compuesto (Erguder *et al.*, 2008).

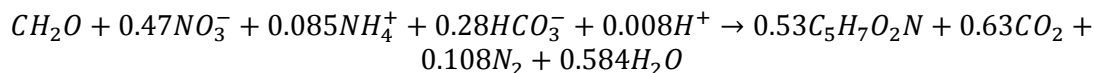
Con la nitrificación se consigue transformar el nitrógeno amoniacal en nitrato, pero para completar el proceso de eliminación de nitrógeno del agua residual es necesario transformar ese nitrato en nitrógeno gas (N_2).

1.4.2.2 Desnitrificación

El proceso de desnitrificación transforma el nitrato presente en nitrógeno gas utilizando organismos heterótrofos facultativos o autótrofos, en condiciones anóxicas (ausencia de oxígeno y presencia de nitrato). Con este proceso se completa la eliminación biológica de nitrógeno en aguas residuales. La desnitrificación requiere de una fuente de energía, orgánica o inorgánica (dador de electrones), y el nitrato o nitrito como aceptor de electrones.

En la desnitrificación con organismos heterótrofos facultativos (Ec. 6), la fuente de energía es orgánica (metanol, etanol y ácido acético entre otros). La desnitrificación a partir de nitrato hasta nitrógeno gas integra cuatro procesos de reducción secuenciales, donde el nitrato es reducido inicialmente a nitrito (NO_2), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y finalmente nitrógeno gas (N_2).

La Ec.6 describe una de las reacciones globales de desnitrificación empleando un carbohidrato como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno para los organismos (Grady *et al.*, 1999):



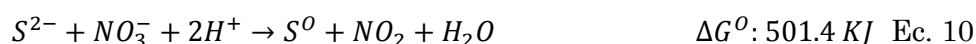
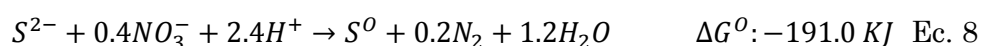
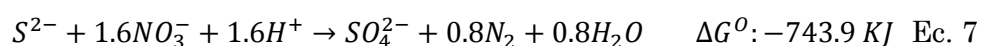
Ec. 6

Como se puede observar en la reacción, la desnitrificación compensa parcialmente la disminución de la alcalinidad del proceso de nitrificación.

En la desnitrificación con organismos autótrofos, la energía es obtenida de sustratos inorgánicos, como hidrógeno, hierro o compuestos reducidos de azufre. Algunos organismos desnitrificantes son quimiolitioautotrofos y pueden oxidar compuestos inorgánicos de azufre como el sulfuro (H_2S), azufre elemental (S^0), tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) o sulfito (SO_3^{2-}) en condiciones anaerobias o anóxicas a expensas de la reducción del nitrato. Entre ellas, autótrofos obligados que crezcan a pH neutros tan solo se conocen dos: *Thiobacillus denitrificans* y *Thiomicrospira denitrificans* y pueden llevar a cabo la sulfoxidación en condiciones anaerobias o anóxicas.

Una alternativa interesante al uso de materia orgánica como principal dador de electrones en la desnitrificación es el uso de sulfuro, ya que este compuesto está comúnmente presente en el efluente de los reactores anaerobios. Además, tales efluentes contienen nitrógeno que necesita ser eliminado en etapas posteriores mediante procesos de nitrificación / desnitrificación. Por lo tanto, el proceso de desnitrificación usando sulfuro parece ser una solución viable para la eliminación de nitrógeno y sulfuro de efluentes procedentes de reactores anaerobios. Aunque existen algunos estudios sobre este tema, este proceso no ha sido bien descrito, siendo necesario profundizar más en el tema para definir la participación de los organismos heterótrofos y autótrofos en el proceso (Beristain *et al.*, 2006; Mahmood *et al.*, 2007; Cervantes *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2012). Según Sierra-Alvarez *et al.* (2007) el sulfuro puede ser fácilmente utilizado por organismos autótrofos en condiciones anóxicas como un donador de electrones para apoyar la desnitrificación.

En el trabajo realizado por Beristain *et al.* (2006) se estudia el proceso de desnitrificación utilizando sulfuro como dador de electrones y se menciona la oxidación de los compuestos de azufre hasta sulfato de acuerdo a las reacciones descritas en las ecuaciones 7, 8, 9 y 10. La formación de sulfato y azufre elemental depende de las condiciones fisiológicas y de la concentración de nitrato presente. El consumo de nitrato varía significativamente si el proceso de oxidación del sulfuro es incompleto.



Según Moraes *et al.* (2011), los productos finales de desnitrificación en presencia de sulfuro están influenciados por la concentración de sulfuro en las aguas residuales. Cuando la relación molar es menor a la estequiométrica es decir el sulfuro se encuentra en exceso ($N/S < 1,6$ para la desnitrificación a través de nitrato, y $2,7$ para la desnitrificación vía nitrito), se obtiene una completa desnitrificación del nitrato y del nitrito presente y una oxidación parcial del sulfuro hasta sulfato y la formación de compuestos intermedios de azufre tales como el azufre elemental, tiosulfato o sulfito. Cuando la relación molar es mayor a la estequiométrica ($N/S > 1,6$ para la desnitrificación a través de nitrato, y $2,7$ para la desnitrificación vía nitrito), la oxidación del sulfuro tiende a ocurrir de forma completa hasta sulfato y la reducción de forma parcial con respecto al nitrato acumulándose nitrito en el medio. Cuando la relación molar es igual al requisito estequiométrico ($N/S=1,6$ para el nitrato y $2,7$ para el nitrito), la oxidación de sulfuro y la reducción del nitrato o nitrito es completa (Krishnakumar y Manilal, 1999; Beristain *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2012). Según Mahmood *et al.* 2007 en el proceso de desnitrificación con sulfuro la mayor parte del sulfuro (89-90%)

se oxida en presencia de nitrito hasta sulfato, mientras que aproximadamente un (10-11%) ocurre por autooxidación como resultado de la presencia de pequeñas cantidades de oxígeno disuelto en el agua residual.

Reyes-Avila *et al.* (2004) observó en ensayos llevados a cabo en un reactor completamente agitado que el proceso de desnitrificación puede ser llevado a cabo simultáneamente por organismos desnitrificantes heterótrofos y autótrofos. Maconi *et al.* (2006) determinaron en un reactor de tanque agitado que utilizando un lodo procedente de un sistema de fangos activados es posible eliminar completamente el sulfuro y el nitrato presente.

Furumai *et al.* (1996) y Reyes-Avila *et al.* (2004) observaron que la velocidad de desnitrificación es mayor cuando están presentes de manera simultánea una fuente de carbono como el acetato y el sulfuro en el medio, en comparación con la desnitrificación empleando únicamente materia orgánica. Según Reyes-Avila la velocidad de desnitrificación empleando sólo sulfuro es más lenta comparada con la velocidad empleando únicamente acetato.

Wang *et al.* (2009) estudiaron un proceso novedoso llamado SANI (sulfate reduction, autotrophic denitrification, nitrification integrated) de eliminación de nitrógeno que logra reducir hasta el 90% del nitrato presente y oxidar totalmente el sulfuro hasta sulfato. El proceso combina una etapa anaerobia mediante un reactor UASB, para la reducción del sulfato a sulfuro; una etapa anóxica para la desnitrificación con sulfuro; y una etapa aerobia para el proceso de nitrificación.

1.4.3 Eliminación biológica de fósforo

En el agua residual el fósforo se puede presentar en forma de ortofosfatos, polifosfatos y como fósforo orgánico. La forma soluble comúnmente encontrada en las aguas residuales es el ortofosfato (PO_4^{3-}), que junto a los

polifosfatos y una pequeña porción del fósforo orgánico constituyen todas las formas solubles del fósforo. Puede ser eliminado por precipitación química o por medio de la actividad biológica de ciertos organismos.

Las primeras investigaciones sobre la eliminación biológica de fósforo comenzaron en los años 50. Concretamente, en 1955, Greenburg *et al.* (1955) advirtieron que ciertos microorganismos presentes en un proceso de fangos activados eran capaces de acumular más cantidad de fósforo que la estrictamente necesaria para su crecimiento.

Los organismos presentes en los procesos biológicos convencionales emplean el fósforo como nutriente, eliminando una parte importante del fósforo presente en el agua residual y que podría representar aproximadamente un 15% del fósforo total. Sin embargo, esto no es suficiente para cumplir con los requisitos de vertido exigidos en la legislación vigente para zonas sensibles.

Para favorecer el crecimiento de organismos PAO (Polyphosphate Accumulating Organisms) y usar su capacidad de almacenar en proporciones superiores fósforo en forma de polifosfato es necesario someter a la biomasa a una variación entre condiciones aerobias/anóxicas y anaerobias (Brett *et al.*, 1997). A este tipo de organismos se les conoce como organismos acumuladores de polifosfatos.

Durante la etapa anaerobia los organismos PAO son capaces de almacenar ácidos orgánicos de cadena corta, especialmente ácido acético en forma de polímeros internos llamados polihidroxialcanoatos (PHA). Las principales formas de estos polihidroxialcanoatos son el poli-beta-hidroxibutirato (PHB) y el poli-beta-hidroxivalerato (PHV). El PHB se forma cuando el sustrato principal es acetato. La energía necesaria para almacenar el PHB la obtienen de la descomposición del glucógeno almacenado intracelularmente y de la hidrólisis del polifosfato (Poli-P). El fosfato es liberado al medio produciendo un incremento de la concentración de ortofosfatos en el mismo.

Después de la etapa anaerobia sigue una etapa aerobia o anóxica, donde los organismos PAO utilizan la fuente de carbono almacenada internamente durante la fase anaerobia, en forma de PHA. Mediante la utilización del PHA se obtiene la energía necesaria para el crecimiento, producción de glucógeno y almacenamiento del ortofosfato presente en el agua en forma de Poli-P, asegurando de este modo las reservas de energía necesarias en la etapa anaerobia.

Este proceso permite un incremento en la eliminación neta de fósforo mayor que el producido por la sola síntesis celular de los organismos heterótrofos no acumuladores de polifosfatos. De esta forma el fósforo pasa a formar parte de la biomasa y es extraído del sistema a través de la corriente de purga del decantador secundario.

1.4.4 Eliminación biológica de metano

Algunos efluentes y principalmente los que provienen de tratamientos anaerobios, contienen concentraciones importantes de metano disuelto. El metano disuelto como se ha mencionado anteriormente hace parte de uno de los gases de efecto invernadero con un alto potencial de calentamiento global. Según esto, el metano presente en las aguas residuales debe ser recuperado o eliminado mediante procesos físicos, químicos o biológicos antes de que llegue a la atmósfera.

La oxidación biológica de metano puede llevarse a cabo en condiciones aerobias, anaerobias o anóxicas por diversos tipos de organismos. Una característica interesante de estos organismos es la capacidad de utilizar enzimas específicas para catalizar el metano convirtiéndolo en otro compuesto de carbono fácilmente biodegradable como el metanol o catalizarlo directamente hasta CO_2 . Este hecho sugiere que el metano se podría utilizar como único donante de electrones en la eliminación biológica de nitrógeno específicamente en el proceso de desnitrificación.

La oxidación del metano en condiciones aerobias es impulsada por un grupo amplio de bacterias, llamadas metanotróficas. Estas bacterias son muy importantes en el ciclo global de carbono, ya que son capaces de oxidar la mayor parte del metano generado en los ambientes anaerobios antes de que llegue a la atmósfera. Por tanto, contribuyen de manera significativa en la prevención del calentamiento global (Hanson y Hanson, 1996). Las bacterias metanotróficas son capaces de crecer en ambientes con concentraciones bajas de oxígeno (Ettwig *et al.*, 2008; Wu, 2012). Este tipo de organismos son únicos en su capacidad de utilizar el metano como fuente de carbono y energía mediante la asimilación de formaldehído (Hanson y Hanson, 1996). Estas bacterias se dividen en tres grupos: tipo I, tipo II y Tipo X, que inicialmente pertenecía al tipo I. Los organismos metanotróficos Tipo I (y X) crecen a bajas concentraciones de metano, mientras que las de Tipo II a concentraciones mayores de metano.

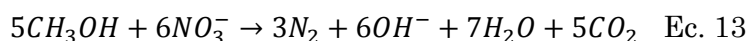
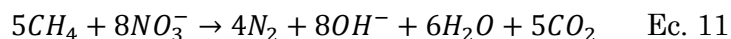
En condiciones anóxicas, se ha encontrado recientemente una nueva vía metabólica (Ettwig *et al.*, 2008; Wu, 2012), en el que la oxidación del metano se acopla con el proceso de desnitrificación. El organismo descubierto pertenece al phylum NC10, el cual produce su propio suministro de oxígeno mediante la dismutación del óxido nítrico (NO) en N₂ y O₂.

En condiciones anaerobias, Boetius *et al.* 2000 menciona la existencia de un consorcio de arqueas metanogénicas divididas en tres grupos (ANME I-III) y bacterias reductoras de sulfato (SRB) capaces de utilizar el metano y el sulfato presente.

La bibliografía sugiere que el metano puede ser transformado por los organismos metanotróficos en condiciones aerobias, anóxicas y anaerobias en compuestos orgánicos fácilmente biodegradable.

En condiciones aerobias o anóxicas, los organismos metanotróficos oxidan el metano y producen compuestos orgánicos los cuales a su vez son consumidos

por los organismos desnitrificantes (Costa *et al.*, 2000; Islas-Lima *et al.*, 2004; Modin *et al.*, 2007). Algunas de las ecuaciones que describen la oxidación de metano en condiciones aerobias y anóxicas se presentan a continuación:



1.4.5 Esquemas de eliminación conjunta de materia orgánica, nitrógeno y fósforo

Para una eliminación conjunta de materia orgánica, nitrógeno y fósforo el esquema convencional de fangos activados mostrado en el apartado 1.4 (Figura 2) debe ser modificado. Para lograr este propósito es necesario combinar diversas condiciones de operación: anaerobia, anóxica y aerobia. Estas condiciones de operación se han combinado en diversos esquemas, siendo los esquemas A²/O y UCT los más utilizados.

1.4.5.1 Esquema A²/O

El esquema A²/O (Figura 3) de cultivo en suspensión es sencillo y permite eliminar conjuntamente nitrógeno y fósforo. Consiste en una secuencia de tres etapas (anaerobia-anóxica-aerobia) con una corriente de recirculación (recirculación interna o de nitratos) que va del reactor aerobio al anóxico.

En el reactor anaerobio se consume el contenido de ácidos grasos volátiles (AGV) del agua residual y se incrementa la concentración de ortofosfatos en el medio por la actividad de los organismos PAO.

En la zona anóxica ingresa una corriente rica en nitrato desde la etapa aerobia. Este aceptor de electrones es utilizado por los organismos heterótrofos desnitrificantes que consumen la materia orgánica, y los organismos PAO desnitrificantes que acumulan el fósforo soluble como polifosfato.

En la etapa aerobia ocurre el consumo de la materia orgánica que no ha sido degradada en el reactor anaerobio o en la etapa anóxica. Además, en la zona aerobia se produce la nitrificación y la acumulación del fósforo soluble en forma de polifosfatos por parte de los organismos PAO.

En el proceso A²/O, el fango activado sedimentado en el decantador secundario se recircula al inicio de la etapa anaerobia. La desventaja de recircular el lodo a la zona anaerobia es que el nitrato generado en la etapa aerobia puede promover la utilización de ácidos grasos volátiles para la desnitrificación, en lugar de ser almacenado como PHA por los organismos PAO.



Figura 3. Esquema A²/O.

1.4.5.2 Esquema UCT (University of Cape Town)

El esquema UCT es un proceso biológico de cultivo en suspensión derivado del esquema A²/O cuyo objetivo es reducir la entrada de nitratos en la etapa anaerobia, para mejorar el proceso de eliminación biológica de fósforo. La principal diferencia respecto al esquema A²/O reside en que la recirculación de fangos desde el decantador no es conducida al reactor anaerobio sino al anóxico. La finalidad de este cambio es la obtención de condiciones

anaerobias más estrictas en el primer reactor de la serie al eliminarse parte de los nitratos que provienen del decantador secundario. Además se establecen dos recirculaciones internas, una del reactor aerobio al anóxico y otra del reactor anóxico al reactor anaerobio (Figura 4).

La recirculación interna de nitratos se ha de regular para que la concentración de nitratos sea baja en el reactor anóxico, para evitar la recirculación de nitratos al reactor anaerobio.

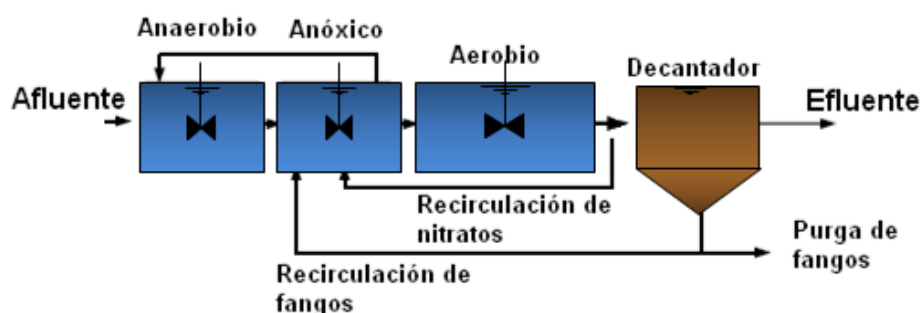


Figura 4. Esquema UCT.

Existe una modificación del esquema UCT que consiste en un segundo reactor anóxico entre la etapa anaerobia y aerobia llamado esquema UCT modificado. El primer tanque anóxico recibe los fangos del decantador secundario y recircula la biomasa al tanque anaerobio. El segundo tanque anóxico permite aumentar la capacidad de desnitrificación del sistema sin el riesgo de introducir nitratos en la etapa anaerobia.

Esto permite realizar por separado la desnitrificación de los fangos recirculados y del licor mezcla procedente del reactor aerobio.

1.4.5.3 Reactores biológicos de membrana (MBR)

Los procesos de depuración de aguas residuales mediante la tecnología de biorreactores de membrana, comúnmente conocida por sus siglas en inglés MBR (*Membrane Biological Reactor*) son tratamientos biológicos que

derivan del sistema convencional de fangos activados en los que se reemplaza la etapa de decantación por una membrana de microfiltración o ultrafiltración colocadas en el mismo reactor o en tanques externos logrando así una completa separación de la biomasa (Figura 5).

La tecnología de membranas permite el desarrollo de sistemas más compactos y con mayores eficiencias en la separación de la biomasa. Los sistemas de tratamiento combinado formados por un proceso de fangos activados y técnicas de separación por membrana, permiten minimizar el volumen de reacción, generar una mayor retención de sólidos en el reactor y obtener efluentes con una concentración de sólidos despreciable, exento de organismos y patógenos.

Los primeros Reactores MBR consistían en reactores de membranas de flujo tangencial, donde las membranas se disponían fuera del tanque de fangos activos. Esta configuración permite a las membranas trabajar a elevadas velocidades de flujo, con el fin de reducir la acumulación de sólidos sobre la superficie de la membrana. Para lograr elevadas velocidades de flujo es necesario generar un elevado caudal de circulación sobre la superficie de las membranas. Para ello se usa una bomba de recirculación de fangos entre el tanque de reacción y el módulo de membranas. Un aspecto desfavorable de este esquema de operación es el gran consumo energético necesario para conseguir estos flujos elevados.

Un importante avance para esta tecnología fue el desarrollo de la disposición MBR con membranas sumergidas (SMBR). Gracias a este tipo de reactores, es posible minimizar la energía necesaria para realizar el proceso de separación. El esquema SMBR opera a presiones transmembrana (PTM) muy inferiores a las establecidas para los sistemas de flujo tangencial, minimizando así los consumos energéticos derivados del proceso de filtración. Del mismo modo, en la tecnología SMBR se minimiza el consumo energético de la bomba de recirculación (siendo posible su completa

eliminación), ya que no se requieren elevadas velocidades de circulación sobre la superficie de la membrana.

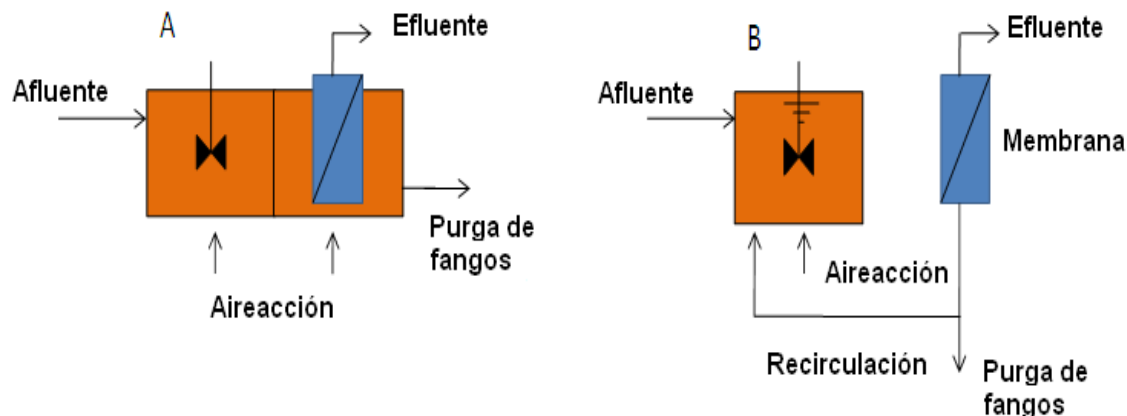


Figura 5. Esquema de reactores biológicos de membranas. Sumergida (A) y de flujo tangencial (B).

El uso de membranas en los procesos de filtración permite: obtener efluentes clarificados y en ocasiones libre de patógenos; minimizar el tamaño de las EDAR; reducir el problema de espumas; trabajar a elevados tiempos de retención celular sin necesidad de elevados volúmenes de reacción; y generar una mayor retención de sólidos en el sistema mejorando considerablemente la eliminación de materia orgánica.

1.5 PROCESOS ANAEROBIOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Los procesos anaerobios se aplican desde hace varias décadas para la eliminación de materia orgánica en la digestión anaerobia de los fangos generados en las EDAR. Los procesos anaerobios consumen menos energía que los aerobios y producen biogás (fundamentalmente $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$) que puede utilizarse como combustible. Además, la producción de fangos por kg de materia orgánica eliminada es inferior a la de los procesos aerobios (del orden de 10 veces menos).

La separación física por sedimentación se hace extremadamente compleja, en comparación con los tratamientos aerobios, debido a que, en los procesos anaerobios, los flóculos formados son más pequeños, y por tanto, su velocidad de sedimentación es menor. Además, los sistemas anaerobios son muy sensibles a las variaciones de temperatura y pH.

La aplicación de procesos anaerobios para el tratamiento de aguas sólo era viable para aguas residuales industriales con elevadas concentraciones de materia orgánica. La aplicación en aguas residuales urbanas de los procesos anaerobios de tratamiento requiere de diversas condiciones para un correcto funcionamiento, pasando por la necesidad de calentar el agua salvo en climas cálidos y trabajar con volúmenes de reacción muy elevados para incrementar el TRC.

1.5.1 Procesos implicados en los tratamientos anaerobios

Los principales procesos implicados en los tratamientos anaerobios son: hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis (Figura 6).

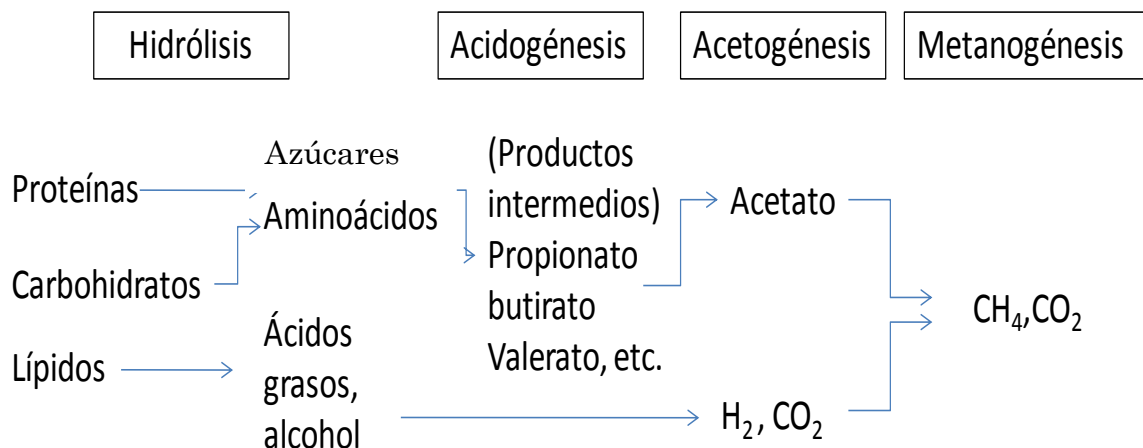


Figura 6. Etapas y procesos implicados en la degradación anaerobia de la materia orgánica.

A continuación se describirá cada uno de los procesos mencionados anteriormente:

1.5.1.1 Hidrólisis

En la hidrólisis se degrada la materia orgánica particulada y las moléculas orgánicas solubles de mayor tamaño y peso molecular (carbohidratos, proteínas y lípidos) mediante la acción de organismos (organismos fermentativos o acidogénicos) presentes en el medio. Los compuestos orgánicos particulados de mayor tamaño son fraccionados hasta la obtención de moléculas más simples y de menor peso molecular, tales como azúcares simples, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga.

La finalidad de este proceso es facilitar el transporte de compuestos más simples a través de la membrana celular de los organismos.

En la hidrólisis se generan enzimas extracelulares que facilitan una mayor degradación de la materia orgánica. La velocidad de hidrólisis dependerá fundamentalmente del pH, de la temperatura, del tipo y naturaleza de sustrato, y de la concentración de material biodegradable. La hidrólisis es la etapa limitante del proceso de degradación anaerobia de materia orgánica en aquellos procesos donde no se ha llevado a cabo una actividad enzimática anterior (Speece, 1983).

1.5.1.2 Acidogénesis

En la acidogénesis se degradan los azúcares y los aminoácidos producidos en la hidrólisis mediante fermentación. Se producen compuestos de cadena corta, tales como ácidos grasos (propiónico, butírico, valérico, etc.), hidrógeno, dióxido de carbono y ácido acético. Los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga son transformados a ácidos orgánicos y alcoholes.

Las principales reacciones asociadas al proceso de acidogénesis son:

- Fermentación de la glucosa.
- Fermentación de aminoácidos.
- Fermentación de glicerol.
- Fermentación de lactato.

1.5.1.3 Acetogénesis

La acetogénesis es el paso en el cual los ácidos orgánicos y alcoholes son transformados a elementos de menor peso molecular, como hidrógeno y ácido acético. En la acetogénesis se produce una mayor cantidad de hidrógeno a partir de reacciones de oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y de los ácidos grasos volátiles.

La proporción de H₂ formado en esta fase cobra una gran relevancia para el proceso global, debido a que es uno de los precursores de metano. En la acetogénesis también se produce ácido acético a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Esta reacción recibe el nombre de homoacetogénesis. En condiciones normales de operación (mesofílicas a 35°C) la importancia de esta reacción en el proceso global es mínima, ya que la velocidad de crecimiento de los organismos (metanogénicos hidrogenotróficos, sulfato reductores hidrogenotróficos) es mayor que la de los microorganismos implicados en la producción de ácido acético.

1.5.1.4 Metanogénesis

En la metanogénesis se forma CH₄ y CO₂ a partir de hidrógeno, ácido acético y dióxido de carbono. A continuación se enumeran los dos procesos de formación de metano existentes, en función del tipo de organismo y del sustrato utilizado:

Metanogénesis hidrogenotrófica: realizada por los organismos homónimos de la reacción, produciendo metano a partir de hidrógeno y dióxido de carbono.

Metanogénesis acetotrófica: realizada por los organismos homónimos de la reacción, produciendo metano a partir de ácido acético.

Generalmente, el proceso de metanogénesis hidrogenotrófica genera una tercera parte del metano total producido en el proceso, siendo las dos terceras partes restantes producidas a partir de ácido acético.

1.5.1.5 Reducción del sulfato

Paralelamente a los procesos explicados anteriormente, existe un grupo de organismos que en condiciones anaerobias y en presencia de sulfatos son capaces de competir por el sustrato, con los organismos descritos anteriormente. Estos organismos son denominados organismos Sulfato rreductores (SRB, Sulfate-Reducing Bacteria). Estos organismos utilizan el sulfato como aceptor de electrones, reduciéndolo a sulfuro.

Bajo condiciones anaerobias el sulfato y sulfito presente se transforman en especies más reducidas como el sulfuro. Estos organismos sulfatorreductores compiten de forma directa con el resto de organismos anaerobios para la toma de sustratos en el medio. La Figura 7 muestra los procesos implicados en la reducción del sulfato, las SRB son capaces de competir por los ácidos grasos de cadena larga y los ácidos grasos volátiles (propiónico, lactato, butirato, etc.) y por compuestos más simples y de metabolización directa, tales como hidrógeno y acético.

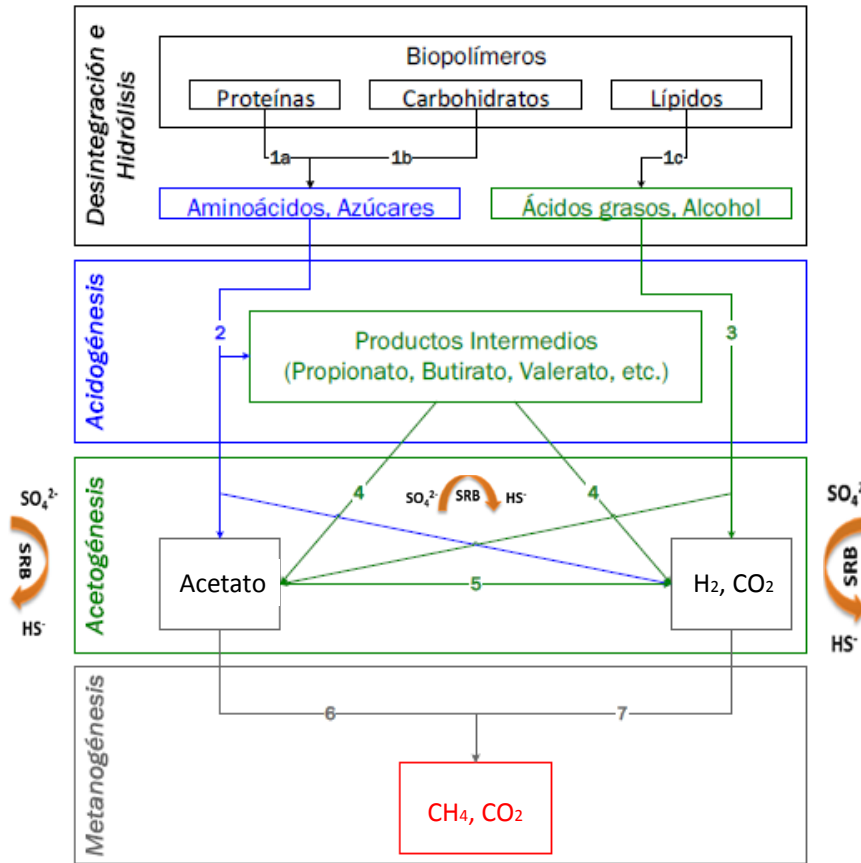
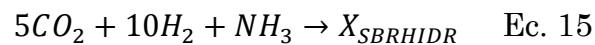


Figura 7. Procesos implicados en la reducción de sulfato (Giménez, 2014).

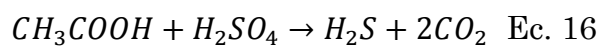
Las reacciones asociadas a la reducción bioquímica de sulfato utilizando hidrógeno (Ec.14 y Ec.15) y ácido acético (Ec.16 y Ec.17) como sustrato (Knobel y Lewis, 2002) son:

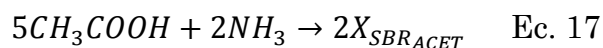
Hidrógeno como sustrato:



($X_{SRBHIDR}$: biomasa SRB hidrogenotrófica [$mg \cdot l^{-1}$])

Acético como sustrato:





$$X_{SRB_{ACET}}(\text{biomasaSRBacetotrófica [mg} \cdot \text{l}^{-1}\text{]})$$

Diversas fuentes bibliográficas han demostrado competencias por la toma de sustratos entre SRB y organismos acidogénicos, en general. Laanbroek *et al.* (1984) establecieron, según el tipo de sustrato, el siguiente ranking de afinidad por parte de las SRB: H₂ > Propiónico > Otros sustratos. Establece un ranking de velocidad de crecimiento para este tipo de organismos, siendo las de mayor velocidad aquellas que lo hacen a partir de hidrógeno como sustrato.

McCartney y Oleszkiewicz (1993) establecieron que las SRB son capaces de competir con los organismos metanogénicos, organismos acetogénicos e incluso organismos fermentativos, por la toma tanto de acético, como de H₂, propiónico y butirato.

Parkin *et al.* (1990) establecieron que las SRB muestran una gran afinidad por la toma de propionato con elevadas tasas de crecimiento, siendo esta afinidad competencia directa con los organismos acidogénicos.

Otros autores afirmaron que los organismos metanogénicos hidrogenotróficos no son capaces de competir con los organismos sulfatorreductores hidrogenotróficos debido a la superioridad competitiva de estos últimos por el hidrógeno como sustrato (Elferink *et al.*, 1994, Colleran y Pender, 2002).

O'Flaherty *et al.* (1998) determinaron que las competencias entre los organismos metanogénicos y sulfatorreductores acetoclásticos son contradictorias dependiendo de las condiciones del medio. En esto son determinantes factores como pH y la relación DQO/SO₄. Los organismos metanotróficos predominan con relaciones DQO/SO₄ superiores a 2,7, mientras que los sulfatorreductores predominan con ratios inferiores a 1,7.

1.5.2 Esquemas de tratamientos anaerobios

Los esquemas anaerobios para el tratamiento de aguas residuales se clasifican según el medio que los organismos usan para su crecimiento: los de soporte de lecho fijo y los de crecimiento libre o suspendido. En los esquemas de crecimiento libre los organismos forman estructuras (gránulos o flóculos) que les permiten permanecer en el reactor y no ser lavados con el efluente. La eficiencia del proceso depende en buena parte de la capacidad del inóculo (lodos/residuos) para formarlas.

Entre los esquemas de lecho fijo se encuentran los filtros anaerobios (AF) y los reactores de flujo ascendente con manto de lodos (UASB).

Entre los esquemas de crecimiento libre están los reactores mono etapa, los de procesos de contacto (ACP), los reactores de lecho fluidizado (FEB) y los reactores biológicos anaerobios de membrana (AnMBR).

1.5.2.1 Reactores Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)

Los reactores UASB se basan en los principios de un reactor USSB (Up-flow staged bed), aunque actualmente se está extrapolando la definición de UASB a reactores de fango granular fluidizado basados en la teoría de los reactores AUFB (upflow fluidized bed).

El funcionamiento clásico de este sistema de tratamiento se basa en la formación de un lecho expandido, a través del cual se hace circular en dirección ascendente el agua residual a tratar (Figura 8). Este lecho contiene la biomasa de forma granular que actúa como etapa de filtración y retención de sólidos y de etapa de degradación de la materia orgánica.

Esto es posible por el flujo ascendente y de baja velocidad con el que se introduce el agua residual a través del lecho. A medida que el proceso de

tratamiento avanza, el lecho va reteniendo los sólidos presentes en el agua residual influente. Cuando la biomasa muere o existe un exceso de sólidos en el lecho, se procede a la retirada de la cantidad excedente de fangos en el lecho.

Este es el sistema de tratamiento de lecho expandido o de fango granular que mayor aceptación y desarrollo ha obtenido, en los últimos años, en el campo del tratamiento de las aguas residuales por tratamiento anaerobio. Fue desarrollado en la década de los 70 por el profesor Lettinga y su grupo de la universidad de Wageningen en los países bajos (Van Haandel y Lettinga, 1994; Fdz-Polanco *et al.*, 2009).

En muchos países tropicales donde la prioridad de descarga es la materia orgánica, la tecnología UASB ha sido muy aceptada debido a que ofrece una manera eficaz de reducir los contaminantes orgánicos. Además, el biogás generado puede ser utilizado como fuente de energía.

Teniendo en cuenta que los organismos se adaptan fácilmente a diversas condiciones ambientales es posible aplicar este tratamiento en países con temperaturas bajas obteniéndose buenos resultados (Lettinga *et al.*, 1983; Sanz y Fdz-Polanco, 1990; Van Last y Lettinga, 1992; Kato *et al.*, 1994).

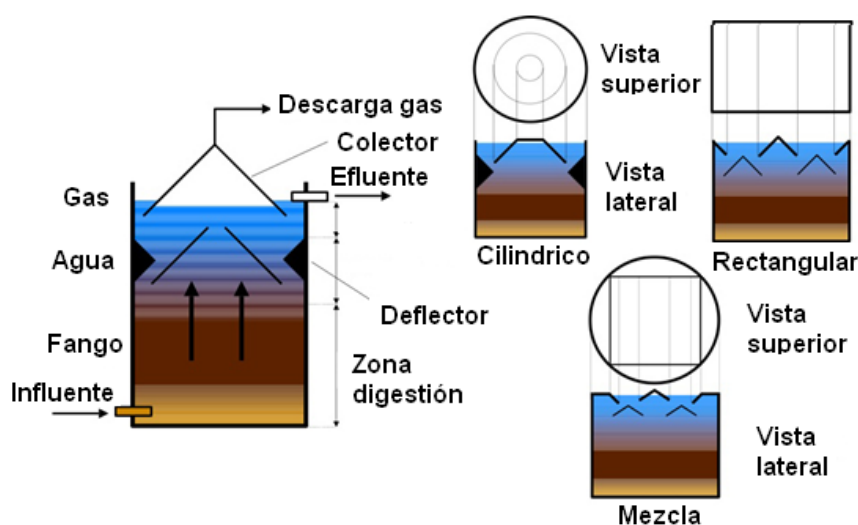


Figura 8. Esquema reactor UASB (GTZ/TBW, 2001).

Una correcta operación del reactor UASB permitiría prescindir del decantador primario, del digestor anaerobio de fangos, del reactor aerobio de fangos y del decantador secundario de una planta convencional de fangos activados para el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, el efluente de los reactores UASB normalmente necesita un tratamiento posterior para lograr degradar la materia orgánica, los nutrientes y los patógenos presentes en el efluente. Este tratamiento o postratamiento puede ser un sistema convencional aerobio como lagunas de estabilización, fangos activos, microalgas u otros.

Otro de los esquemas de tratamiento anaerobio propuesto recientemente que utiliza un proceso anaerobio mediante un reactor UASB es el proceso SANI (Sulfate reduction, Autotrophic denitrification, Nitrification Integrated). El proceso consiste en tres etapas: un reactor anaerobio UASB, un filtro anóxico y un filtro aerobio (Figura 9).

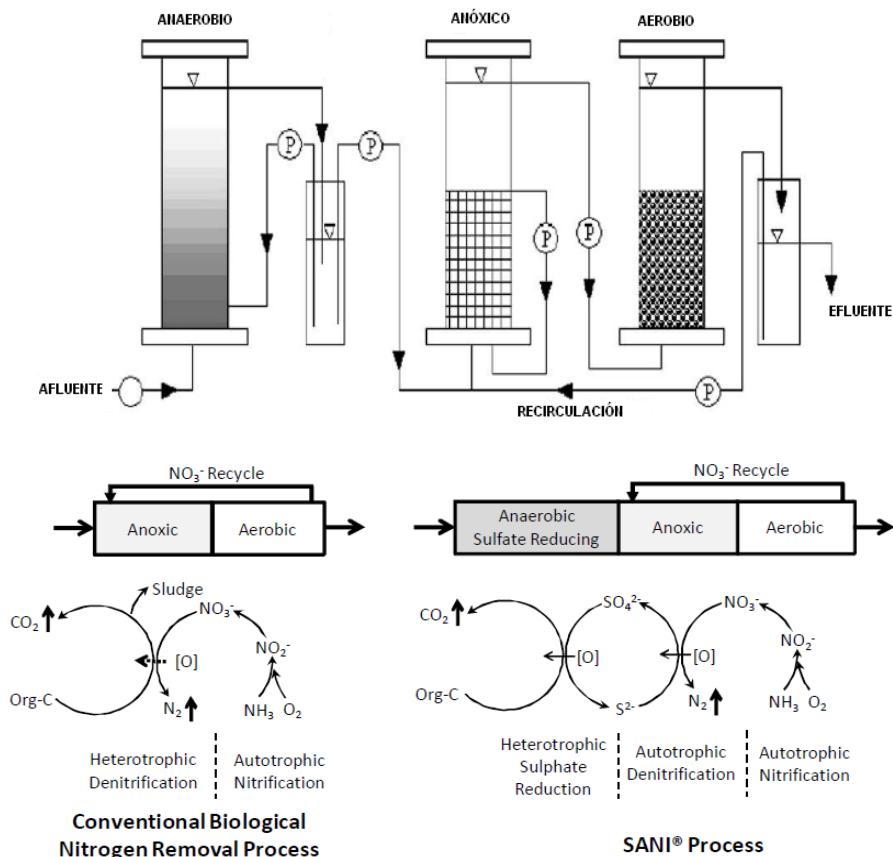


Figura 9. Esquema general del proceso SANI (Wang *et al.*, 2009).

En la etapa anaerobia, el sulfato es reducido a sulfuro; en la etapa aerobia, el nitrógeno amoniacal es oxidado a nitrato; y en la etapa anóxica, el sulfuro se utiliza como donador de electrones para la desnitrificación. Esta tecnología permite la eliminación conjunta de sulfuro y nitrógeno (Wang *et al.*, 2009).

1.5.2.2 Reactores Biológicos Anaerobios de Membranas (AnMBR)

Los reactores anaerobios de membrana (AnMBR) combinan el proceso anaerobio de degradación de materia orgánica con un sistema físico de separación por membranas. La disposición de la membrana puede variar según la configuración del proceso y pueden clasificarse en membranas externas y membranas sumergidas.

Este tipo de sistemas permiten obtener tiempos de retención celular (TRC) elevados sin necesidad de incrementar el volumen del reactor y permiten el total desarrollo de la biomasa anaerobia. Con este esquema se evita la problemática existente que presenta la sedimentabilidad de los fangos anaerobios.

El uso de membranas permite que prácticamente todos los microorganismos queden confinados dentro del sistema, facilitando el control de su tiempo de permanencia en el reactor y con el beneficio añadido de proporcionar un efluente libre de material particulado y, en algunos casos (dependiendo del tamaño de poro), de virus y patógenos.

Este hecho aumenta las posibilidades de aplicación de esta tecnología para una gran diversidad de aguas residuales, incluso con contaminantes persistentes o difíciles de degradar. Esta tecnología presenta ventajas frente a los procesos convencionales para el tratamiento de agua residual urbana. Dentro de las principales ventajas se destacan las siguientes:

- Producción de fangos baja (5-10% menos que los procesos aerobios).
- Demanda energética baja.
- Recuperación energética mediante la utilización del biogás.
- Valorización energética de la materia orgánica.
- Obtención de un efluente libre de material particulado, virus y patógenos.
- Reducción del tamaño de las instalaciones actuales.
- Permite una mayor diversidad microbiológica, gracias a la retención de aquellas especies que presentan un crecimiento más lento o que no forman flóculos.

Los reactores anaerobios de membranas sumergidas (SAnMBR de sus siglas en inglés Submerged Anaerobic Membrane BioReactor) están compuestos por un reactor anaerobio de tanque agitado y un sistema externo de filtración mediante membranas de fibra hueca (Figura 10).

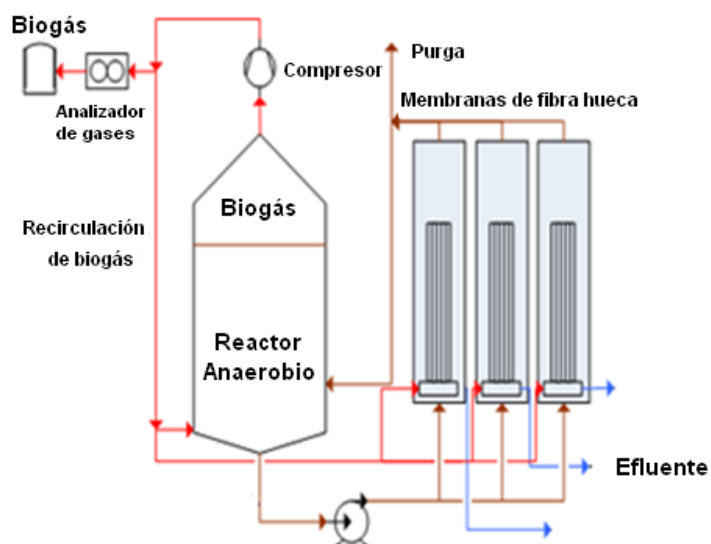


Figura 10. Esquema general de un reactor SAnMBR.

El agua residual pasa al reactor anaerobio donde se transforma la materia orgánica en biogás. El contenido del reactor pasa por la membrana donde se obtienen dos corrientes: una corriente concentrada de fango (rechazo), la

cual regresa al reactor; y una corriente libre de sólidos (permeado o efluente). Comparado con los reactores UASB, estos sistemas permiten que los organismos presentes queden retenidos en el sistema permitiendo un control perfecto de su permanencia en el reactor y un efluente con una alta calidad.

1.5.3 Efluentes anaerobios

Los procesos anaerobios cada vez demuestran ser una tecnología sostenible para el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, la incapacidad de estos procesos para generar un efluente capaz de cumplir con la legislación vigente, según el lugar de vertido, hace necesario del estudio de un tratamiento posterior o un post-tratamiento del efluente generado. Estos efluentes en muchas ocasiones contienen patógenos, material en suspensión, sulfuro, metano disuelto y nutrientes (nitrógeno y fósforo) en concentraciones altas, siendo necesario su tratamiento.

Con el fin de mejorar la calidad de los efluentes generados o eliminar los contaminantes mencionados se han aplicado otras tecnologías de tratamiento. La tecnología empleada debe eliminar los contaminantes y dar valor a las aguas residuales mediante la recuperación y reutilización de los subproductos.

1.5.3.1 Características de los efluentes anaerobios

La calidad de los efluentes anaerobios ha sido medida por varios autores en términos de la concentración de materia orgánica presente (DBO, DQO), nitrógeno total (amonio), compuestos de azufre como el sulfato, sulfuro, o azufre elemental, metano disuelto, y patógenos.

La cantidad de materia orgánica presente en los efluentes anaerobios varía considerablemente y depende de la eficiencia del proceso anaerobio.

Estudios realizados mencionan que la demanda biológica de oxígeno (DBO) varía entre 60 y 150 mg·l⁻¹ y la demanda química de oxígeno (DQO) entre 100 y 200 mg·l⁻¹ sin incluir la que puede aportar el sulfuro y el metano disuelto presentes. La concentración de sólidos suspendidos puede variar entre 0 y 100 mg·l⁻¹ (Chernicharo, 2006; Foresti *et al.*, 2006). Concentraciones bajas e inclusive libres de sólidos suspendidos pueden obtenerse cuando se integran las membranas a los procesos anaerobios.

La eliminación de nutrientes es baja en los tratamientos anaerobios en comparación con los sistemas convencionales (Lettinga *et al.*, 1981; Foresti *et al.*, 2006; Moawad *et al.*, 2009). Según Foresti *et al.* (2006) y Giménez *et al.* (2012) la concentración de nitrógeno amoniacal y fosfato en los efluentes anaerobios es alta y varía entre 30 - 50 mgN·l⁻¹ y de 5 - 10 mgP·l⁻¹, debido a que el nitrógeno y fósforo orgánico son hidrolizados a nitrógeno amoniacal y fosfato.

La presencia de metano disuelto en los efluentes anaerobios representa entre un 30-50% del metano producido en el proceso anaerobio. La concentración de metano en el efluente depende de la transferencia de materia entre las fases gas y líquido. El metano puede encontrarse sobresaturado de forma que su distribución entre ambas fases puede ser diferente de la marcada por la ley de equilibrio, que también puede verse influenciada por las condiciones de temperatura de la etapa anaerobia.

Debido a que el metano actúa como un gas de efecto invernadero es necesario eliminarlo o recuperarlo. Según Thalasso *et al.* (1997) e Islas-Lima *et al.* (2004) puede ser utilizado como fuente de carbono en el proceso de desnitrificación.

Los compuestos de azufre en los efluentes anaerobios en condiciones normales de operación existen en forma de sulfuro y sulfato. La concentración de sulfuro en el efluente depende de la concentración de

sulfato a la entrada del proceso anaerobio. Diversos autores mencionan concentraciones de sulfuro en los efluentes anaerobios entre los 7 y 100 mg S·l⁻¹ (Walia, 2007; Khan *et al.*, 2011).

La concentración de patógenos en los efluentes anaerobios que no tienen acoplado un sistema de filtración por membranas es del orden de 10⁷–10⁸ medida como coliformes fecales (Chernicharo *et al.*, 2001), teniendo en cuenta que los tratamientos anaerobios no están diseñados para la eliminación de organismos patógenos.

Khan *et al.* (2011) realizó una revisión bibliográfica sobre los distintos sistemas empleados para el postratamiento de los efluentes anaerobios, recogiendo en el estudio las concentraciones típicas de un efluente anaerobio (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los efluentes anaerobios.

Parámetro	Concentración
DBO	60 - 150 mgO ₂ ·l ⁻¹
DQO	100 - 200 mgO ₂ ·l ⁻¹
SST	0 - 100 mg·l ⁻¹
N-NH₄	30 - 50 mgN·l ⁻¹
P-PO₄	5 - 10 mgP·l ⁻¹
CH₄ disuelto	30 - 60 mg CH ₄ ·l ⁻¹
H₂S	7 - 100 mgS·l ⁻¹
AGV	0 - 50 mg CH ₃ COOH l ⁻¹

1.5.4 Tratamiento de efluentes anaerobios

Como se ha comentado en el apartado anterior, los efluentes anaerobios contienen concentraciones de metano disuelto, sulfuro y nutrientes que deben ser eliminados en algunos casos para cumplir con la legislación

vigente y para recuperar energía y minimizar la pérdida de gases disueltos a la atmósfera. A continuación se mencionan algunos estudios que utilizan diversas configuraciones para el tratamiento de efluentes anaerobios.

Khan *et al.* (2011) mencionan en su estudio las configuraciones más utilizadas para el tratamiento de efluentes anaerobios procedente de reactores UASB, entre las que se encuentran: filtro de arena, filtros percoladores, coagulación-floculación, reactores discontinuos (SBR), fangos activados, filtros anóxicos-aerobios, contactores biológicos, flotación por aire disuelto (DAF) y humedales artificiales. Estas configuraciones permiten eliminar los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes, el material en suspensión, la materia orgánica soluble poco biodegradable, los nutrientes y eliminar los patógenos.

Chernicharo *et al.* (2001) estudiaron el tratamiento del efluente de un reactor UASB, empleando un sistema natural conocido como OFS (overland flow system) que consiste en una cubierta vegetal capaz de absorber los nutrientes y la materia orgánica presente. Esta configuración permitió eliminar entre el 50-80% de la materia orgánica presente y el 99% de los patógenos presentes en el efluente.

Vyrides *et al.* (2010) estudiaron el tratamiento del efluente de un reactor anaerobio de membranas que trataba aguas residuales salinas, haciendo pasar el efluente a través de un sistema con carbón activado en polvo (Powdered Activated Carbón, PAC). Al utilizar el carbón activado se reducía la concentración del carbono orgánico total soluble en un 80%.

Van der Ha *et al.* (2011) estudiaron el tratamiento de efluentes anaerobios en un reactor SBR haciendo pasar el efluente a través de un sistema compuesto por un co-cultivo de organismos metanotróficos y microalgas (MAC, Coculture Methane oxidizing bacteria and Algae) que conviven simultáneamente, llamado methalgae. Este estudio presentó un nuevo

enfoque, teniendo en cuenta que estos efluentes están saturados de metano disuelto. El sistema permitió la oxidación del metano disuelto por los organismos metanotróficos con una mínima emisión de CO₂ ya que parte de éste es utilizado por las microalgas. Los compuestos de nitrógeno presentes en el efluente actúan como nutriente para el consorcio methalgae.

Otros estudios como los desarrollados por Park *et al.* (2009), Gebert *et al.* (2004), Melse y Van der Werf. (2005) y Sly *et al.* (1993) mencionan la posibilidad de oxidar biológicamente el metano con el fin de reducir las emisiones de este gas a la atmósfera. Los estudios destacan que el metano es oxidado biológicamente por medio de organismos gram-negativos conocidos como metano-oxidantes (MOB), o metanotróficos, las cuales utilizan el metano disuelto como su única fuente de carbono y energía.

Wang *et al.* (2009) estudiaron la tecnología SANI (Sulfate reduction, Autotrophic denitrification, Nitrification Integrated). El proceso consiste en tres etapas: un reactor anaerobio UASB, un filtro anóxico y un filtro aerobio. En la etapa anaerobia, el sulfato es reducido a sulfuro; en la etapa aerobia, el nitrógeno amoniacal es oxidado a nitrato; y en la etapa anóxica, el sulfuro se utiliza como donador de electrones para la desnitrificación. Esta tecnología permite la eliminación conjunta de materia orgánica, sulfuro y nitrógeno. Los rendimientos obtenidos en términos de remoción de materia orgánica y nitrógeno fueron de 95% y 74%, respectivamente.

Moraes *et al.* (2012) estudiaron en un reactor de lecho fijo vertical (fixed-bed) el proceso de nitrificación/desnitrificación simultánea con oxidación de sulfuro para el tratamiento de efluentes anaerobios. En este estudio se presenta la oxidación del sulfuro como una alternativa interesante para la eliminación simultánea de nitrato o nitrito de las aguas residuales, ya que el sulfuro puede ser utilizado como un donador de electrones para la desnitrificación autótrofa. Los rendimientos alcanzados en el proceso de nitrificación y desnitrificación fueron 85% y 53%, respectivamente.

Von Sperling *et al.* (2001) estudiaron el tratamiento del efluente de un reactor UASB utilizando un sistema de fangos activados a escala piloto, que consistía en un único reactor aerobio y un decantador secundario. Esta configuración permitiría eliminar la materia orgánica presente y parte de los sólidos en suspensión. Este sistema permitió reducir la DQO del efluente entre un 85 - 93% y la concentración de sólidos suspendidos en un 82%.

Como se ha comentado anteriormente hay diversos procesos que permiten tratar el efluente generado en el tratamiento anaerobio. Entre los sistemas comentados anteriormente, se encuentran aquellos que permiten eliminar los nutrientes, tales como los fotobiorreactores de Microalgas y aquellos que permiten eliminar de manera conjunta la materia orgánica, nutrientes, sulfuro y metano disuelto como el sistema convencional de fangos activados.

A continuación se realizará una breve descripción de estos dos procesos y se mostrará su potencial aplicación en la eliminación de materia orgánica, nutrientes, metano disuelto y sulfuro.

1.5.4.1 Fangos activados

El proceso de fangos activados se plantea como una alternativa que permite mejorar la calidad de los efluentes provenientes de procesos anaerobios, favoreciendo su reutilización para diferentes usos. Mediante un esquema convencional de fangos activados como el UCT se podría reducir la cantidad de materia orgánica, fósforo y nitrógeno presente, empleando los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo. Del mismo modo se pretende que los compuestos presentes en el afluente tales como el sulfuro y el metano disuelto puedan participar como dadores de electrones en el proceso de desnitrificación. El proceso de fangos activados presenta gran flexibilidad operativa y permite una alta eficiencia en la eliminación biológica de nutrientes. Debido a esto, el proceso de fangos activados podría considerarse como una alternativa tecnológicamente viable.

Tal y como se comentó anteriormente, **Von Sperling *et al.* (2001)** estudió a escala piloto la utilización de un reactor aerobio como alternativa para el tratamiento del efluente de un reactor UASB obteniendo rendimientos en términos de eliminación de materia orgánica superiores al 80%. El estudio destaca como ventajas de esta alternativa comparada con un sistema convencional de fangos activados, un menor consumo energético, menor cantidad de lodos generados debido a la ausencia de fango primario, menor consumo de productos químicos para la deshidratación y la posibilidad de digerir el exceso de fango en el mismo reactor UASB.

Coletti *et al.* (1997) estudiaron, a escala laboratorio un sistema de fangos activados, compuesto de 4 tanques aerobios cada uno con su respectivo decantador, operados a distintos TRC (5, 10, 15 y 20 d). Con este esquema se estudió el tratamiento del efluente de un reactor anaerobio UASB, con el objetivo de determinar los coeficientes estequiométricos y cinéticos del proceso. En el estudio se obtuvieron eficiencias de eliminación del 95% de DBO, 88% de DQO y 28% de fósforo.

Sousa y Foresti (1996) estudiaron a escala piloto un sistema compuesto por un reactor UASB seguido de dos reactores aerobios en paralelo. Las eficiencias de remoción obtenidas fueron del 95% para la DQO y 85% de los sólidos totales. El estudio también menciona que una adecuada operación del sistema permitiría eliminar N y P.

Las investigaciones existentes muestran que es posible combinar procesos anaerobios con sistemas convencionales como el de fangos activados para el tratamiento de efluentes anaerobios y mejorar la calidad de los mismos, permitiendo su reutilización.

1.5.4.2 Microalgas

Como se ha explicado anteriormente una alternativa para el tratamiento de efluentes anaerobios es la utilización de microalgas. Van Der Ha *et al.* 2011 plantea en su estudio que existen co-cultivos de organismos capaces de oxidar el metano disuelto y favorecer el crecimiento de microalgas, permitiendo la oxidación del metano con un mínimo de emisiones de CO₂. Otros estudios también plantean la posibilidad de extraer el metano disuelto antes de ser utilizado en cultivos con microalgas. Las microalgas son capaces de eliminar los nutrientes del agua residual y utilizar el CO₂ atmosférico como fuente de carbono para su crecimiento. El estudio de la utilización de microalgas en el tratamiento de aguas residuales se ha incrementado notablemente en la última década.

Los estudios existentes muestran que diferentes especies de microalgas clasificadas por phylum (Chlorophyta, Euglenophyta Cryptophyta, etc), y entre las que se encuentran las Scenedesmus, Monoraphidium, Diatomea y Tetrastum, son capaces de conseguir elevados rendimientos de eliminación de nitrógeno y fósforo, y, además, pueden utilizar en su crecimiento diferentes compuestos de nitrógeno tales como amonio, nitrato o urea (Xin *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2011; Ruiz-Martínez *et al.*, 2012).

El uso de las microalgas para el tratamiento de efluentes anaerobios presenta diversas ventajas dentro de las que se encuentran:

- Tienen el potencial de ser utilizadas para elaborar diferentes productos como bioetanol de sus carbohidratos, biodiesel de sus lípidos o aceite, biogás y pienso para el ganado de sus proteínas.
- Pueden crecer en diversos ambiente (agua salada, dulce e incluso en residuales) por lo que tienen una excelente adaptación.
- La producción de estas microalgas además permiten absorber CO₂ de la atmósfera.

1.6 MICROBIOLOGÍA ASOCIADA AL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

En los procesos biológicos las especies microbianas presentes dependerán principalmente de las características del agua residual, del diseño y de la operación del proceso biológico. La mayoría de los organismos que se pueden encontrar en los fangos de un proceso de depuración pertenecen al dominio Bacteria (Figura 11).

En la eliminación biológica de contaminantes presentes en las aguas residuales participan diversos grupos de organismos encargados de llevar a cabo los distintos procesos (nitrificación, desnitrificación, eliminación biológica de fósforo, eliminación de metano disuelto, oxidación de sulfuro, etc.). En el proceso de nitrificación donde el amonio es oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato, se asume de manera general que estos dos pasos son realizados por organismos amonioxidantes (AOB) y organismos nitritooxidantes (NOB), respectivamente. No se tiene conocimiento de la existencia de organismos capaces de realizar la oxidación completa del amonio hasta nitrato (Nielsen *et al.*, 2009).

En el proceso de desnitrificación participan principalmente organismos heterótrofos facultativos que llevan a cabo la reducción del nitrato o nitrito a compuestos nitrogenados gaseosos tales como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) y nitrógeno gaseoso (N₂).

Los organismos *Candidatus Accumulibacter Phosphatis* son los responsables del proceso de eliminación biológica de fósforo (en inglés: Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) que pertenecen al grupo *Rhodocyclus*, subclase 2 de las Betaproteobacterias.

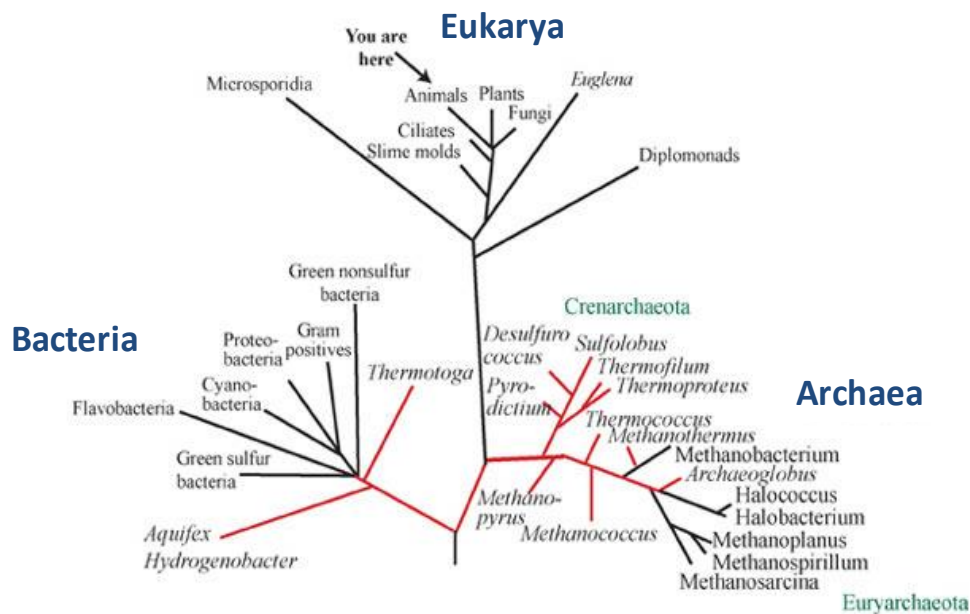


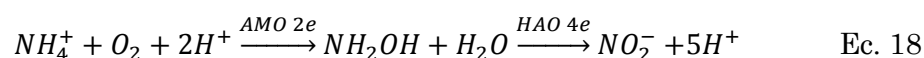
Figura 11. Dominios de la vida (Bacteria, Eukarya y Archaea).

En la oxidación biológica de metano participan principalmente organismos metano-oxidantes (MOB) u organismos metanotróficos capaces de utilizar el metano como única fuente de carbono. La utilización del metano como fuente de carbono para el tratamiento de aguas residuales ha sido objeto de diversas investigaciones (Hanson y Hanson, 1996). Esta utilización puede darse por vía aerobia, anóxica o por vía anaerobia, siendo la primera de ellas la más estudiada hasta el momento. Tal y como se comentará más adelante los organismos metanotróficos transforman el metano en compuestos intermedios (metanol, principalmente; acetato y citrato, entre otros) que son posteriormente oxidados a CO_2 por organismos heterótrofos desnitrificantes (Modin *et al.*, 2007; Osaka *et al.*, 2008).

En el caso del sulfuro se han estudiado organismos capaces de utilizar los compuestos reducidos de azufre. Algunos de estos organismos son conocidos como bacterias “incoloras del azufre” capaces de utilizar el sulfuro, tiosulfato y azufre como fuente de energía para su crecimiento (Janssen, 1995; Madigan *et al.*, 1999).

1.6.1 Características de los organismos nitrificantes

Los organismos nitrificantes se clasifican en organismos amonioxidantes (AOB) y nitritooxidantes (NOB). Los organismos amonioxidantes (AOB) son responsables de la conversión del amonio a nitrito, primer paso de la reacción de nitrificación. El proceso de oxidación del amonio a nitrito se compone de dos reacciones catalizadas por dos enzimas diferentes. La enzima amonio monooxigenasa (AMO), ubicada en la membrana de los organismos, cataliza la transformación del amonio (NH_4^+) a hidroxilamina (NH_2OH), mientras que la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO), ubicada en el periplasma celular, cataliza la conversión de la hidroxilamina (NH_2OH) a nitrito (NO_2^-). En la ecuación 18 se encuentran representadas las dos etapas que componen la reacción de oxidación de amonio a nitrito, con las enzimas involucradas y el flujo de electrones.



Los organismos AOB son procariotas quimioautótrofos pertenecientes a la familia Proteobacteria. La mayoría de estos organismos son de la clase Betaproteobacteria.

Los organismos AOB de la clase Betaproteobacteria se dividen en cuatro géneros: Nitrosomonas, Nitrospira, Nitrosovibrio y Nitrosolobus. A pesar de las diferencias morfológicas encontradas entre los últimos tres géneros, el estudio filogenético realizado por Head *et al.* (1993) y basado en el 16 rRNA planteó la posibilidad de agruparlos en el género Nitrospira. Por su parte, el género Nitrosomonas se encuentra dividido en varios linajes, de acuerdo al estudio realizado por Seviour y Nielsen, 2010.

Los organismos nitritooxidantes (NOB) son los responsables de la conversión del nitrito a nitrato, segundo paso de la reacción de nitrificación. Esta reacción es catalizada por la enzima nitrito oxidoreductasa (Nxr).

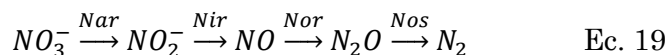
Desde el punto de vista filogenético los organismos NOB son un grupo más heterogéneo que los organismos AOB. Estos organismos son procariotas quimioautótrofos, divididos en cuatro géneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* y *Nitrospina*.

El género *Nitrobacter* perteneciente a la clase Alphaproteobacteria contiene las especies *N. winogradskyi*, *N. hamburgensis*, *N. vulgaris* y *N. alkalicus* (Seviour y Nielsen, 2010). Estas especies se han encontrado en diferentes ecosistemas acuáticos y terrestres, incluyendo sedimentos de lagos de alta alcalinidad (Sorokin *et al.*, 1998). Las especies *Nitrosococcus mobilis* (Gammaproteobacteria) y *Nitrospina gracilis* (Deltaproteobacteria) se encuentran relacionadas con ecosistemas marinos. Las especies del género *Nitrobacter* pueden ser enriquecidas y desarrolladas mediante incubación en sistemas de fangos activados y de soporte sólido. De hecho, estas especies fueron consideradas como los organismos NOB dominantes en los sistemas de tratamiento de agua residual. La técnica de hibridación in situ FISH, permitió identificar a los organismos del género *Nitrospira* como los organismos NOB dominantes en las plantas de tratamiento de agua residual (Daims *et al.*, 2001a).

Aunque los géneros *Nitrobacter* y *Nitrospira* comparten una característica fisiológica común, ambos son organismos quimioautótrofos que pueden crecer empleando nitrito como fuente de energía, pertenecen a grupos filogenéticos completamente diferentes, que representan una diversidad ecofisiológica de importante aplicación industrial.

1.6.2 Características de los organismos desnitrificantes

Los organismos desnitrificantes pueden utilizar compuestos nitrogenados como el nitrato (NO_3^-), el nitrito (NO_2^-) y gases como el óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso (N_2O) como aceptores de electrones en su metabolismo respiratorio. El proceso de desnitrificación es generalmente considerado como un proceso anóxico, aunque hay indicios de que éste puede ocurrir en condiciones aerobias (Robertson y Kuenen, 1984). La desnitrificación a partir de nitrato hasta nitrógeno gas integra cuatro procesos de reducción secuenciales (Ec. 19), catalizados por diversas enzimas tal y como se muestra a continuación:



La reacción bioquímica de reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) es generalmente catalizada por la enzima nitrato reductasa (Nar) localizada en la membrana celular.

Existe otra clase de enzima periplasmática denominada nitrato reductasa (Nap) de diferente estructura y localización cuya actividad no es suprimida por el oxígeno (Philippot, 2002), por lo que se sugiere que está involucrada en el proceso de desnitrificación en condiciones aerobias. La reducción del nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO) se encuentra catalizada por dos enzimas nitrito reductasas denominadas NirS y NirK, presentes en organismos desnitrificantes.

Por otro lado, la reacción de reducción del óxido nítrico (NO) a óxido nitroso (N_2O) se encuentra catalizada por la enzima óxido nítrico reductasa (Nor), localizada en la membrana celular. Esta enzima juega un papel muy importante en la prevención de la acumulación de NO, debido a que éste es tóxico para los organismos. Finalmente, la reacción de reducción de óxido nitroso (N_2O) a nitrógeno diatómico (N_2) es catalizada por la enzima

periplasmática óxido nitroso reductasa (Nos). Este paso constituye un proceso respiratorio independiente que puede darse también en algunos organismos que no son desnitrificantes.

Los grupos de organismos involucrados en el proceso de desnitrificación se componen principalmente de los géneros: *Achoromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobaccillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Spirillum* (Metcalf y Eddy, 1995). En algunos organismos del dominio Arquea y ciertos hongos también se ha identificado un potencial de desnitrificación (Thorndycroft *et al.*, 2007).

Existe otro grupo de organismos gram negativos, quimiolitotróficos pertenecientes a la subclase Proteobacteria llamados *Thiobacillus denitrificans* y *Thiomicrospira denitrificans* capaces de realizar el proceso de desnitrificación (Takai *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Estos utilizan compuestos reducidos de azufre (S^{2-} , S^0 , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$, SO_3^{2-}) como donador de electrones y nitrito o nitrato como aceptor de electrones en condiciones anóxicas (Beristain-Cardoso *et al.*, 2006).

1.6.3 Características de los organismos acumuladores de polifosfatos

Los organismos acumuladores de polifosfatos (PAO, *Polyphosphate Accumulating Organisms*) son organismos capaces de almacenar intracelularmente fósforo en proporciones superiores a los correspondientes requisitos nutritivos normales. Estos organismos son quimioheterótrofos.

Los organismos responsables de este proceso fueron identificados mediante técnicas moleculares, donde se pudo establecer que el organismo responsable de esta acumulación era el *Candidatus Accumilibacter*

phosphatis, perteneciente al grupo *Rhodocylus*, subclase 2 de las *Betaproteoorganismos* (Hesselmann *et al.*, 1999).

La acumulación del fósforo ocurre cuando los organismos PAO son sometidos a la alternancia de dos etapas, la primera en condiciones anaerobias y la segunda etapa en condiciones aerobias o anóxicas. En la primera se lleva a cabo la toma del fósforo y el almacenamiento de ácidos grasos volátiles (AGV) en forma de polihidroxialcanoatos (PHA). En la segunda etapa el oxígeno y el nitrato actúan como aceptor de electrones. En esta etapa, el PHA almacenado es metabolizado para generar ATP que permite el crecimiento de la población bacteriana, la regeneración de las reservas de glucógeno y el almacenamiento de fósforo soluble en forma de polifosfato (Smolders *et al.*, 1994).

Estudios recientes como los desarrollados por Wu *et al.*, 2013, observaron que existe un grupo de microorganismos capaces de llevar a cabo la eliminación biológica de fósforo, utilizando los compuestos de azufre como aceptor de electrones. Este estudio plantea una relación sinérgica entre los compuestos de azufre, especialmente el sulfuro, y el fósforo (poly-S²⁻/S⁰ y poly-P). El estudio presenta una modificación del proceso SANI (Sulfate reduction, Autotrophic denitrification and Nitrification Integrated), explicado anteriormente, donde se incorpora de manera simultánea la eliminación biológica de fósforo en presencia de compuestos de azufre.

1.6.4 Características de los organismos metanotróficos

Las organismos metanotróficos o metanotrófos son un subconjunto de organismos de un grupo conocidos como *Methylootrophs*. Estos organismos son únicos en su capacidad de utilizar metano como única fuente de carbono y energía. El uso de enzimas conocidas como la monooxigenasa que catalizan la oxidación de metano a metanol es una característica importante de estos organismos. La Figura 12 muestra el metabolismo de los organismos

metanotróficos incluyendo el papel central del formaldehído como producto intermedio en el catabolismo y el anabolismo.

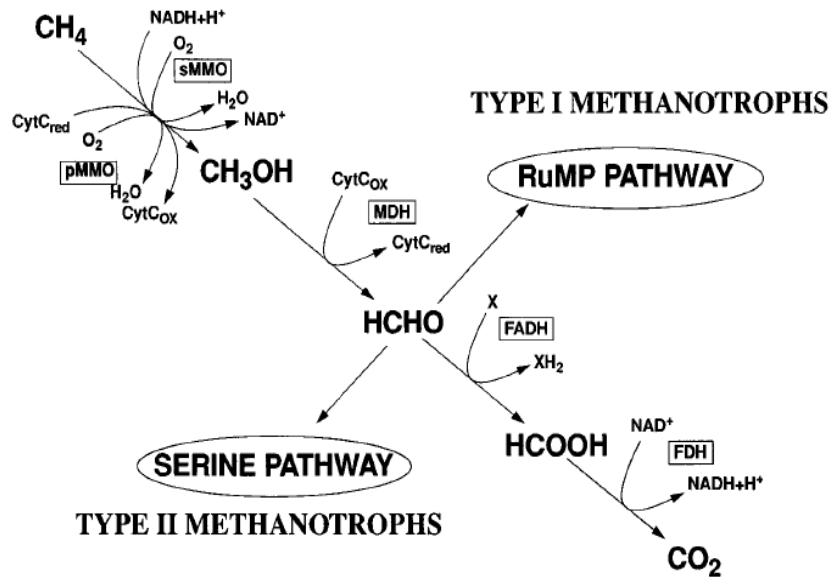


Figura 12. Rutas para la oxidación de CH_4 y la asimilación de formaldehído. (Hanson y Hanson 1996).

El primer organismo capaz de oxidar metano lo aisló Sohngen en 1906 y lo llamo *Methanicus Bacillus*. En otros estudios realizados se aislaron más de 100 nuevos organismos capaces de oxidar metano (Whittenbury *et al.*, 1970).

Estos organismos fueron separados en 5 géneros (Whittenbury *et al.*, 1981; Galchenko *et al.*, 1984; Hanson *et al.*, 1991): *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylocystis* y *Methylosinus*. Una nueva especie llamada *Methyloicribium* fue propuesta por Bowman *et al.* (1991).

Los 5 géneros mencionados anteriormente fueron agrupados en 2 grandes grupos llamados tipo I y tipo II. Los de tipo I incluyen los géneros *Methylomonas* y *Methylobacter*. Los de tipo II incluyen los géneros *Methylosinus* y *Methylocystis*. Existe un grupo llamado tipo X que permite incluir organismos metanótrofos similares a las del género *Methylococcus*, que como los de tipo I utilizan ribulosa monofosfato (RuMP) como vía principal para la asimilación de formaldehído (Hanson y Hanson, 1996).

Actualmente se ha descubierto otro organismo capaz de utilizar el metano disuelto. Este organismo pertenece al phylum NC10 y es capaz de producir su propio suministro de oxígeno al metabolizar el nitrito o el óxido nitroso hasta nitrógeno gas, en el proceso de desnitrificación (Ettwig *et al.*, 2009; Ettwig *et al.*, 2010).

Otras investigaciones realizadas han comparado diversos organismos metanótrofos según sus características fenotípicas y han llegado a la conclusión que los organismos metanótrofos tipo I están incluidos dentro de la familia *Methylococcaceae* y los de tipo II en la familia *Methylocystaceae* (Bowman *et al.*, 1993; Bowman *et al.*, 1995; Hanson y Hanson, 1996).

En estudios realizados por Amaral y Knowles en 1995 encontraron que los organismos de la familia *Methylococcaceae* crecen preferiblemente a concentraciones bajas de metano, mientras que los de la familia *Methylocystaceae* crecen a concentraciones altas. La identificación de estos grupos fue estudiada por Eller *et al.* (2001) mediante la técnica FISH utilizando sondas específicas marcadas con fluorocromos.

1.6.5 Características de los organismos sulfatorreductores

Los organismos sulfatorreductores (SRB) son organismos anaerobios obligados, metabólicamente versátiles provenientes de varias familias y diferentes géneros. Utilizan sulfato u otros compuestos oxidados de azufre como aceptor final de electrones (agente oxidante) para la producción de H₂S. Pueden crecer de forma heterotrófica usando moléculas orgánicas de bajo peso molecular y de manera autotrófica usando hidrógeno y dióxido de carbono (Nagpal *et al.*, 2000; Lens y Kuenen, 2001).

Estos organismos son muy adaptables y pueden ser encontrados en numerosos ambientes terrestres y acuáticos en los que se ha agotado el oxígeno. Se encuentran principalmente en ambientes anaerobios o anóxicos

ricos en sulfatos. Una forma de clasificarlos está basada en su capacidad para degradar la materia orgánica en forma parcial o total. De acuerdo a esta propiedad se dividen en dos grupos principales:

- 1) Oxidantes incompletos de sustrato, que generan acetato como producto final. Estos utilizan lactato, hidrógeno, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos como fuente de carbono y energía para reducir el sulfato a sulfuro. En condiciones ideales tienen una velocidad de crecimiento más rápida que los oxidantes completos y pueden lograr tiempos de duplicación de 3 a 4 horas, si son alimentadas con los sustratos que lo favorecen, como hidrógeno y lactato. El grupo está constituido por géneros como *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Thermodesulfobacterium*.

- 2) Los oxidantes completos de sustrato a dióxido de carbono y sulfuro. Este grupo utiliza ácidos grasos, especialmente acetato. Tienen un crecimiento lento, frecuentemente con tiempos de duplicación mayores a 20 horas. El grupo está compuesto por *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*, *Desulfonema* y *Desulfobacterium* (Visser, 1993; Widdel, 1992; Nagpal *et al.*, 2000).

1.6.6 Técnica FISH: identificación y cuantificación

Para la identificación y cuantificación de los organismos mencionados anteriormente es necesario emplear técnicas convencionales o moleculares. Una de las técnicas más empleadas actualmente es la técnica FISH. A continuación se explicará brevemente su aplicación y utilización.

La técnica de hibridación FISH (Fluorescence in situ Hybridization) es utilizada para detectar y localizar determinadas secuencias de ADN o ARN. Mediante esta técnica es posible identificar “in situ” organismos que

pertenecen a un grupo taxonómico específico (especie, género, clase, etc.) empleando tiempos relativamente cortos.

La técnica FISH utiliza secuencias de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos, denominadas sondas, que se unen a la fracción 16S del ARNr de la organismo diana produciendo una fluorescencia en los organismos con la fracción de ARNr homóloga (Serafim *et al.*, 2002). La observación de los organismos hibridados con la sonda se realiza mediante el empleo de un microscopio específico de epifluorescencia.

Esta técnica se basa en la aplicación del proceso de hibridación que se produce entre secuencias complementarias de material genético. La doble hélice de ADN puede ser desnaturalizada, es decir, se desenrolla y se separa de las hebras que la forman mediante la aplicación de una elevada temperatura. Cuando la temperatura disminuye, las hebras se vuelven a unir por sus bases complementarias. Por tanto, una secuencia de ADN se puede unir a otra de ADN o también a una secuencia de ARN complementaria generando un híbrido: ADN-ADN o ADN-ARN. De esta manera, una secuencia de ADN o ARN de cadena simple y complementaria de la secuencia de interés (sonda) puede utilizarse para identificar, con gran precisión, la presencia de la secuencia en preparaciones de ADN o ARN. La secuencia de bases escogida para la preparación de la sonda hace que los híbridos formados sean fácilmente detectables. Los principales obstáculos asociados con la aplicación de esta técnica están relacionados con la permeabilidad de la célula para la entrada de la sonda en su interior, y con el contenido de ribosomas debido a que la sonda hibrida con el ARN ribosómico.

Las sondas pueden ser diseñadas o adquiridas a través de centros que se dedican a ello, y en los que se pueden adquirir las sondas marcadas con un fluorocromo específico, o incluso sin marcar. La especificidad de la sonda para hibridar con su objetivo está dada por la secuencia de nucleótidos

empleada para su fabricación. Es posible ajustar la especificidad de la técnica FISH a distintos niveles filogenéticos mediante la variación de la extensión de la cadena y las condiciones de hibridación.

Para la cuantificación de las distintas especies microbianas presentes en la muestra se emplean métodos basados en el análisis de imagen (Borrás, 2008). Estos métodos consisten en la toma de un número de imágenes de campos representativos de la muestra hibridada. Posteriormente, mediante el empleo de programas de análisis de imagen se obtiene el área ocupada de la señal en píxeles. El programa realiza un recuento de los píxeles y compara el área de la señal obtenida con la sonda específica y con la sonda general EUBMIX. El resultado final se expresa en porcentaje y representa el porcentaje de área de una especie bacteriana en la muestra que se relaciona con la abundancia del organismo hibridado frente al total de organismos presentes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en estudiar el tratamiento del efluente de un reactor anaerobio de membranas sumergidas (SAnMBR) mediante un proceso de fangos activados con configuración UCT. Tiene como fin conocer y cuantificar la influencia de diversos factores ambientales y de operación sobre el rendimiento y la eliminación biológica de nitrógeno, fósforo, sulfuro y metano disuelto presentes en el efluente de un SAnMBR que trata agua residual urbana (ARU).

Para cumplir con el objetivo general de esta tesis se plantearon los siguientes objetivos específicos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar a escala laboratorio el proceso de desnitrificación del efluente de un proceso SAnMBR mediante la puesta en marcha y seguimiento de un reactor SBR (Sequencing Batch Reactor). Los subobjetivos desarrollados para la realización de este estudio se describen a continuación:
 - Puesta en marcha de un reactor SBR con el fin de establecer diversas estrategias de operación, que permitan su puesta a punto y la estabilidad del proceso.
 - Estudiar el proceso de desnitrificación evaluando el uso conjunto de metano disuelto, sulfuro y ácidos grasos volátiles como dadores de electrones.

- Analizar el potencial que tiene el sulfuro como dador de electrones en el proceso de desnitrificación.
- Realizar el seguimiento de la población microbiana durante la operación del reactor SBR.
- Estudiar a escala de planta piloto el tratamiento en continuo del efluente de un proceso SAnMBR. Para poder cumplir con este objetivo fue necesario realizar los siguientes subobjetivos:
 - Instalar y adecuar los elementos de la planta piloto de fangos activados que permitan el correcto funcionamiento del proceso (agitadores, bombas, válvulas, etc).
 - Montar e instalar la instrumentación de la planta piloto que permita realizar el seguimiento del proceso en tiempo real (sondas de pH, redox, NH_4 , NO_3 y oxígeno disuelto).
 - Montar, comprobar y adecuar el programador automático (PLC, Program Logic Control) y el sistema de adquisición de datos (SCADA, Supervisory Control And Data Acquisition).
 - Operar y controlar la planta piloto con el fin de determinar la influencia de los principales parámetros operacionales y ambientales sobre la eliminación biológica de nitrógeno, fósforo, sulfuro y metano disuelto. Los parámetros estudiados fueron: tiempo de retención celular (TRC), tiempo de retención hidráulico (TRH) y temperatura (T).
 - Plantear y ejecutar ensayos de inhibición en discontinuo que permitan estudiar el efecto de la concentración de sulfuro y tiosulfato sobre el proceso de nitrificación. Esto permitirá

determinar la inhibición y/o toxicidad que tienen estos compuestos sobre la actividad de los organismos nitrificantes.

- Plantear y ejecutar ensayos de desnitrificación en batch realizados en laboratorio empleando de forma separada diferentes dadores de electrones (ácidos grasos volátiles o sulfuro). Esto permitirá determinar la influencia de cada dador de electrones en el proceso de desnitrificación.

- Caracterizar y cuantificar mediante técnicas convencionales y moleculares las poblaciones de organismos implicadas en los distintos procesos biológicos que tienen lugar en el esquema de tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PLANTA PILOTO ANAEROBIA DE MEMBRANAS SUMERGIDAS

La planta piloto anaerobia de membranas sumergidas (SAnMBR), que trata agua residual urbana real, fue diseñada por el grupo de investigación CALAGUA en cuyo seno se ha desarrollado esta tesis (Figura 13). Esta planta genera un efluente con unas concentraciones altas de nitrógeno, fósforo, sulfuro y metano disuelto, siendo necesario su postratamiento. Este trabajo de tesis presenta el estudio del tratamiento de este efluente. El reactor SAnMBR consiste en la combinación, en un mismo proceso, de un sistema biológico anaerobio tradicional para el tratamiento de aguas o fangos y de un proceso físico de separación mediante membranas de filtración, en este caso membranas de ultrafiltración de fibra hueca sumergidas.

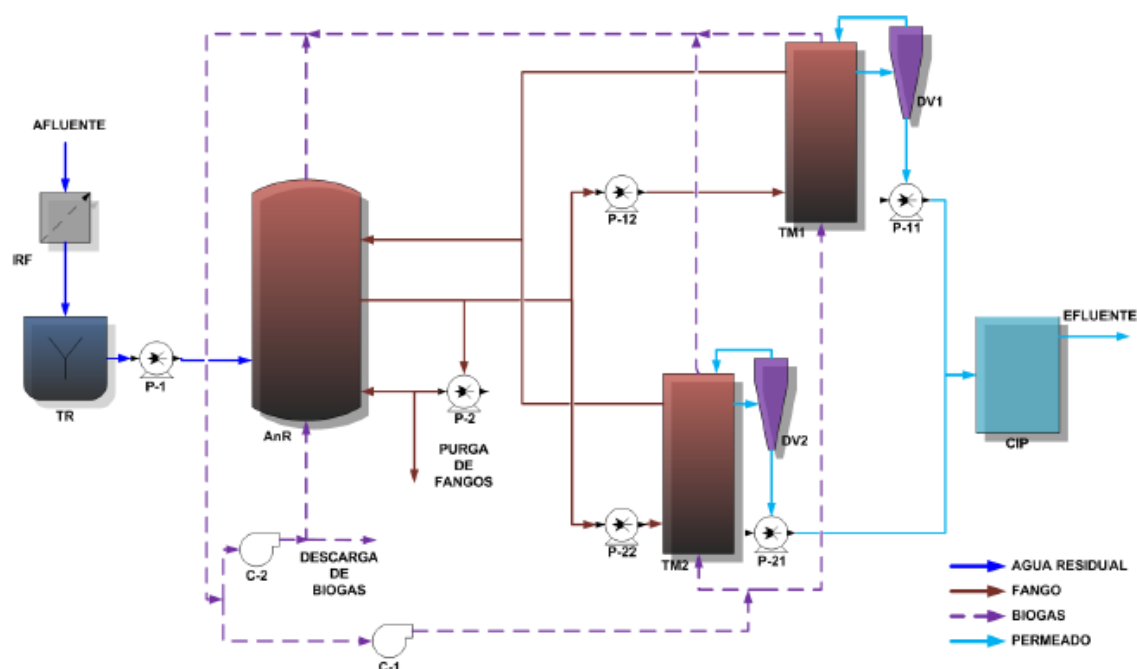


Figura 13. Esquema general de tratamiento reactor SAnMBR (Giménez *et al.*, 2011).

3.1.1 Descripción de la planta

La planta está compuesta principalmente por un rotofiltro (RF), un tanque de regulación (TR), un reactor anaerobio, dos tanques de membranas y un tanque CIP (Clean-in-place).

El rotofiltro funciona como pre-tratamiento del agua residual real doméstica que va a ser introducida al sistema. Su objetivo fundamental es la retención de partículas gruesas que puedan dañar las partes móviles de los equipos o la superficie de las membranas, así como la retención de fibras o cabellos. El rotofiltro tiene una luz de paso de 0,5 mm, tamaño estándar para la retención de gruesos, y su caudal punta de diseño supera los 200 l·h⁻¹.

El tanque de regulación de 300 litros permite homogenizar el agua de entrada, es decir la que pasa a través del rotofiltro. El reactor anaerobio cerrado tiene un volumen total de 1300 litros, 400 litros de los cuales corresponden con el espacio de cabeza para la recolección del biogás.

Los dos tanques de membranas tienen un volumen de 800 litros (TM1 y TM2), con 200 litros de espacio de cabeza. Cada tanque incluye un módulo de membranas comercial de fibra hueca sumergidas (membranas de ultrafiltración, PURON®, Koch Membrane Systems, 0,05 µm de diámetro de poro), con un área total de filtración de 30 m².

El tanque CIP con un volumen de 200 litros, está situado al final de proceso para el almacenamiento del efluente obtenido en las etapas de filtración, conectado mediante una bomba a la etapa de post-tratamiento.

3.1.2 Funcionamiento de la planta

El funcionamiento de la planta piloto SAnMBR se lleva a cabo en 3 etapas: separación, reacción y filtración.

La separación consiste en el paso del agua residual a tratar a través del rotofiltro y del tanque de regulación. El agua residual que entra al rotofiltro proviene del pre-tratamiento de la EDAR del Carraixet (Alboraya, Valencia). Este pre-tratamiento consiste en una etapa de desbaste (enrejados), desarenado, y desengrasado. El agua que sale del proceso de separación entra al proceso de reacción.

La reacción ocurre en el reactor anaerobio donde se realiza la degradación anaerobia de la materia orgánica. Luego la mezcla formada dentro del reactor (fango biológico) pasa al proceso de filtración.

El proceso de filtración se realiza por ultrafiltración en dos tanques de membrana TM1 y TM2. La planta piloto puede operar con ambos módulos de membrana o con uno de ellos independientemente. El agua residual filtrada que sale de las membranas (permeado) se obtiene a partir de la aplicación de un pequeño vacío en el interior de las membranas (Presión Trans-Membrana - PTM). Posteriormente, el permeado es introducido al tanque CIP, donde queda disponible una parte del volumen para la operación de los módulos de membranas. El volumen restante (efluente) pasa a un postratamiento. El rechazo de las membranas (fango) es recirculado al reactor.

3.2 PLANTA PILOTO DE FANGOS ACTIVADOS

La planta piloto en la que se ha llevado a cabo parte del trabajo experimental se encuentra ubicada en la EDAR del Carraixet (Alboraya, Valencia). Las características de la planta y los elementos instalados se describen a continuación.

3.2.1 Descripción de la planta piloto

La planta piloto de fangos activados fue diseñada por el grupo de investigación CALAGUA (Figura 14). Está compuesta por un tanque de homogenización, un reactor biológico de 800 litros y un decantador secundario de 80 litros (Gatti, 2009).

Con la finalidad de conseguir la eliminación biológica de nitrógeno, fósforo, sulfuro y metano disuelto, se ha empleado un esquema UCT (University of Capetown). Para esto, el reactor biológico se ha subdividido en 3 zonas: anaerobia 84 litros, anóxica 332 litros y aerobia 384 litros. Cada zona dispone de varias compuertas removibles que permiten modificar el volumen de reacción.



Figura 14. Planta piloto de fangos activados.

En la planta se han establecido 3 corrientes de recirculación: una recirculación de fangos proveniente del decantador secundario a la zona anóxica, una recirculación de la zona aerobia a la primera zona anóxica y una recirculación de la zona anóxica a la zona anaerobia.

La Figura 15 muestra el diagrama de operación empleado en este estudio. Se observan 11 zonas separadas por compuertas removibles. Las condiciones anaerobias, anóxicas y aerobias vendrán determinadas por las recirculaciones internas y el sistema de aireación. Las zonas anaerobias y anóxicas se encuentran cubiertas con planchas de metacrilato transparente para minimizar la pérdida de gases y la reaireación (Figura 16).

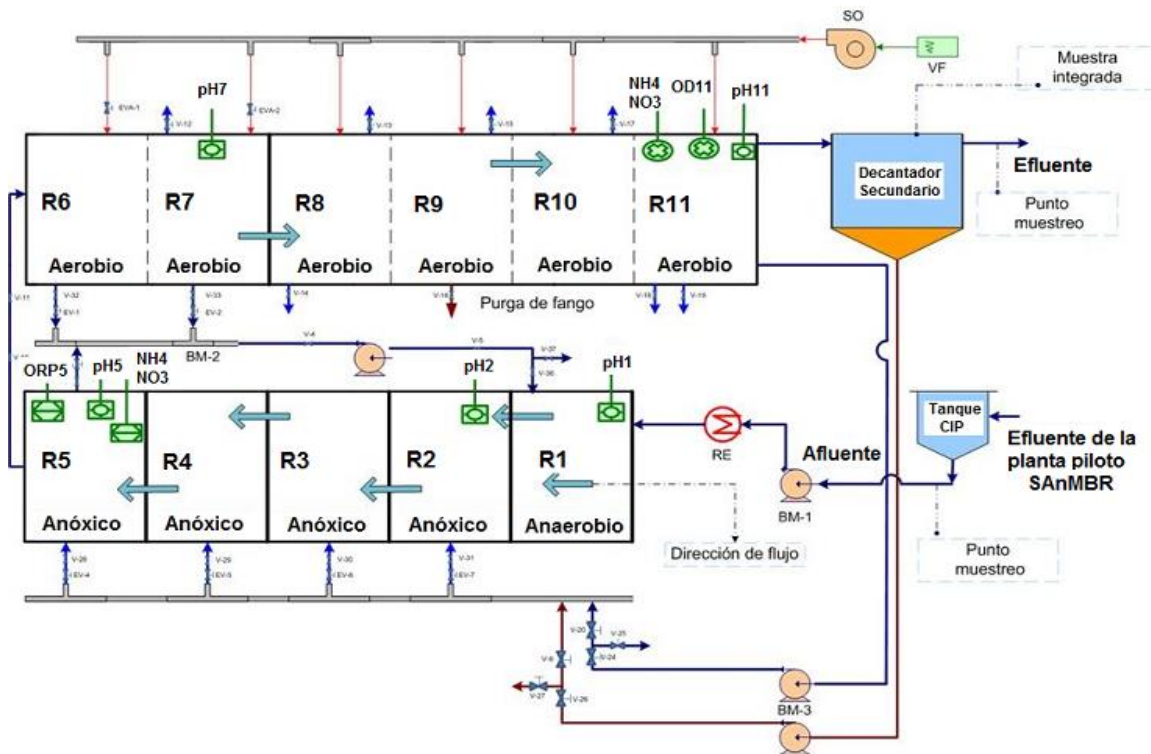


Figura 15. Diagrama general de la planta piloto.

La etapa anaerobia corresponde al primer tanque R1, la etapa anóxica a los tanques del R2 al R5 y la etapa aerobia los tanques del R6 al R11. Según la configuración UCT, la etapa anaerobia recibe la recirculación proveniente de la etapa anóxica R5 y la etapa anóxica recibe la recirculación de fangos desde el decantador y la recirculación interna de nitratos desde la última zona aerobia R11.



Figura 16. Zona anaerobia y anóxica.

La Figura 17 muestra una fotografía de la zona aerobia. Esta zona comprende los tanques desde el R6 hasta el R11.



Figura 17. Zona aerobia.

La aireación de la zona aerobia se lleva a cabo con una soplante que inyecta aire a una conducción central. La conducción divide el aire a cada uno de los difusores situado en el fondo de cada reactor aerobio.

El agua residual efluente del reactor biológico se introduce por la parte superior del decantador a través de un cilindro central. La salida del agua decantada se realiza a través de un vertedero perimetral. La base del

decantador está diseñada con una elevada pendiente para permitir una adecuada concentración de los fangos (diámetro: 0,42 m; altura: 0,82 m; pendiente de cono: 166%).

El efluente proveniente del reactor SAnMBR libre de sólidos es bombeado hasta un tanque homogenizador ubicado en la planta piloto, seguidamente el agua pasa por rebose al reactor anaerobio y posteriormente a la etapa anóxica y aerobia donde se produce la eliminación biológica de nutrientes.

Tras el proceso biológico el agua pasa al decantador secundario donde se produce la sedimentación del fango y se obtiene el agua efluente del proceso por el vertedero perimetral.

3.2.1.1 Componentes auxiliares

Agitadores: La mezcla completa en cada uno de los reactores es obtenida mediante agitadores mecánicos de hélice marina. En la zona anaerobia y anóxica el tipo de agitador corresponde a la serie k80-k90 con motor reductor marca ELMEQ. En la zona aerobia la velocidad de los agitadores es regulable de forma manual con motores de la marca ABB de la empresa Bominsa.



Figura 18. Sistema de agitación.

Sistema de aireación: Se compone de una soplante (Figura 19) modelo serie G-200 2BH13, de la casa Nash-Elmo y un variador de frecuencia (T-Verter, serie E2) que permite regular el caudal de aire. Una conducción central de PVC reparte el aire a cada uno de los reactores aerobios del R6 al R11.



Figura 19. Soplante de la planta piloto.

Bombas de alimentación y recirculación: Son bombas dosificadoras de membrana (Figura 20) marca ECOLAB modelo ELADOS EMP IV-E60, con un caudal máximo de $450 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$, con regulación manual de carrera (10 al 100 %) o posibilidad de regulación automática mediante señal analógica 0/4-20 mA. El cuerpo de la bomba es de PVC y dispone de 2 válvulas de retención de bola por donde se conectan las conducciones de aspiración e impulsión.



Figura 20. Bomba de recirculación.

Bombas de muestra y de purga: Son bombas peristálticas (Figura 21) modelo OEM 313FD/D de la marca comercial Watson Marlow, con velocidad variable de forma manual. Su funcionamiento está temporizado para conseguir que la purga sea lo más exacta posible.



Figura 21. Bomba peristáltica.

Conducciones y válvulas: Son de PVC rígido de 25 mm de diámetro nominal. Las conducciones de entrada y salida de las bombas de recirculación son de PVC flexible de 35 mm de diámetro nominal. Las bombas peristálticas utilizan conducciones de goma de silicona de 10 mm de diámetro nominal. Las válvulas son de bola de PVC de 25 mm de diámetro nominal.



Figura 22. Válvulas y conducciones.

Cuadro eléctrico: Está compuesto por los distintos elementos que regulan la entrada de corriente al sistema (Figura 23), elementos de protección a sobretensiones, interruptores automáticos, magnetotérmicos y diferenciales. En su interior se encuentra los relés que comandados por el PLC y el variador de frecuencia de la soplante.

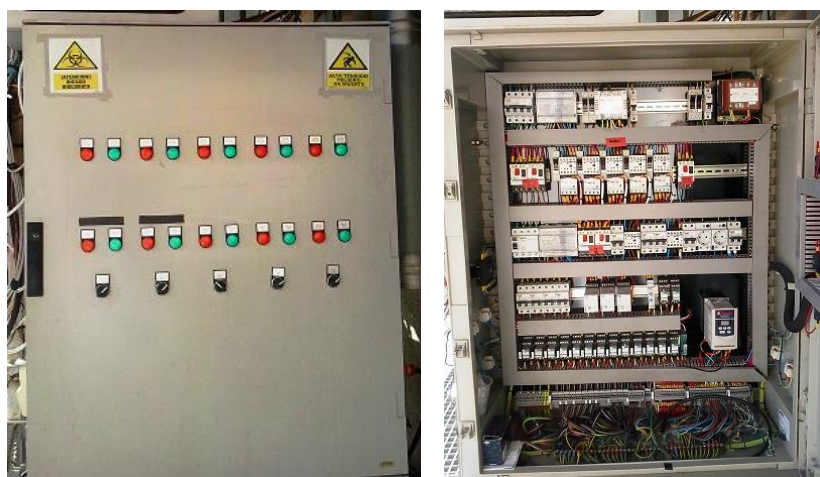


Figura 23. Cuadro eléctrico.

3.2.1.2 Instrumentación

La planta piloto de fangos activados fue equipada con diversos equipos de medición que permitieron obtener los valores on-line de los principales parámetros del proceso de eliminación biológica de nutrientes entre los que se encuentran: pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, sólidos suspendidos, nitrato y amonio (Anexo I. perfiles obtenidos con las sondas instaladas en la planta piloto).

- **Sonda de pH:** Se instalaron 5 sondas de pH con sensor de temperatura modelo pH-D-S de la marca comercial Hach-Lange (Figura 24). Las sondas fueron ubicadas en los reactores R1, R2, R5, R7 y R11. Tienen un intervalo de medida de pH de 0 a 14 y de temperatura de -5 a 75°C.



Figura 24. Sonda de pH.

- **Sonda de redox (ORP):** Se instaló 1 sonda de potencial redox modelo pH-D-S sc ORP (Figura 25) de la marca comercial Hach-Lange al final de la etapa anóxica (reactor R5). El intervalo de medida es de -2000 a 2000 mV para el redox y de -5 a 75°C para la temperatura.



Figura 25. Sonda redox.

- **Sonda de oxígeno disuelto:** Corresponde con el modelo Hach LDO de la marca comercial Hach Lange (Figura 26) cuyo principio de medida es la luminiscencia. Se instaló al final de la etapa aerobia, en el reactor R11. El intervalo de medida de concentración de oxígeno disuelto es de 0,00-20,00 ppm.

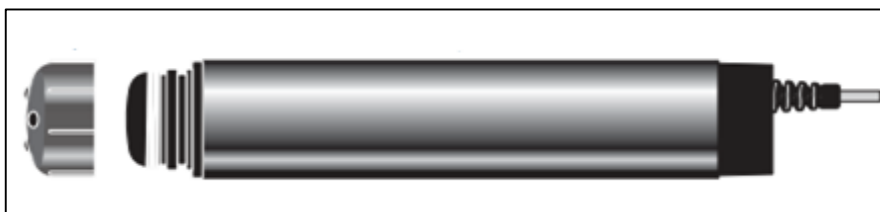


Figura 26. Sonda de oxígeno disuelto.

- **Sonda de amonio y nitrato:** Se instalaron dos sondas de medición combinada de amonio y nitrato al final de la etapa anóxica en el reactor R5 y al final de la etapa aerobia en el reactor R11. Corresponde con un sensor combinado de amonio y nitrato modelo AN-INSE de la marca comercial Hach-Lange (Figura 27). El intervalo de medida para el amonio y nitrato es de 0,00-1000 mg N l⁻¹.



Figura 27. Sonda combinada de amonio y nitrato.

3.2.1.3 Comunicación y monitorización

La planta piloto dispone de un ordenador Intel-pentium de 2,6 GHz con 1 Gb de memoria RAM y sistema operativo Windows XP. Toda la instrumentación instalada en la planta piloto se conectó a 2 controladores digitales SC1000 de la marca Hach-Lange. Estos equipos permiten visualizar las variables in-situ y tienen una tarjeta Modbus que permite establecer la comunicación con el ordenador.

También cuenta con un sistema de control y adquisición de datos SCADA (Supervisory Control And Data Acquisition) desarrollado por el grupo de investigación, el cual fue adaptado de acuerdo con la instrumentación instalada y la configuración utilizada en este estudio (Figura 28).

Se dispone de un controlador lógico programable PLC para la transmisión de datos del resto de equipos de medida y actuadores instalados en la planta piloto al PC. Este autómatas programable, modelo CQM1H-CPU51 de la marca OMRON, contiene 5 módulos que permiten la transmisión de datos de los equipos de medida y actuar sobre los elementos finales de control (Figura 29).

Uno de estos módulos contiene un puerto RS-422. Este puerto se utiliza para establecer la comunicación entre el PLC y el PC. El resto de módulos

integrados en el PLC comprenden una tarjeta de entradas digitales, una tarjeta de salidas digitales, una tarjeta de entradas analógicas y una tarjeta de salidas analógicas. Desde la tarjeta de salidas digitales se conectaban o desconectaban los relés que comandaban los actuadores de la planta piloto.

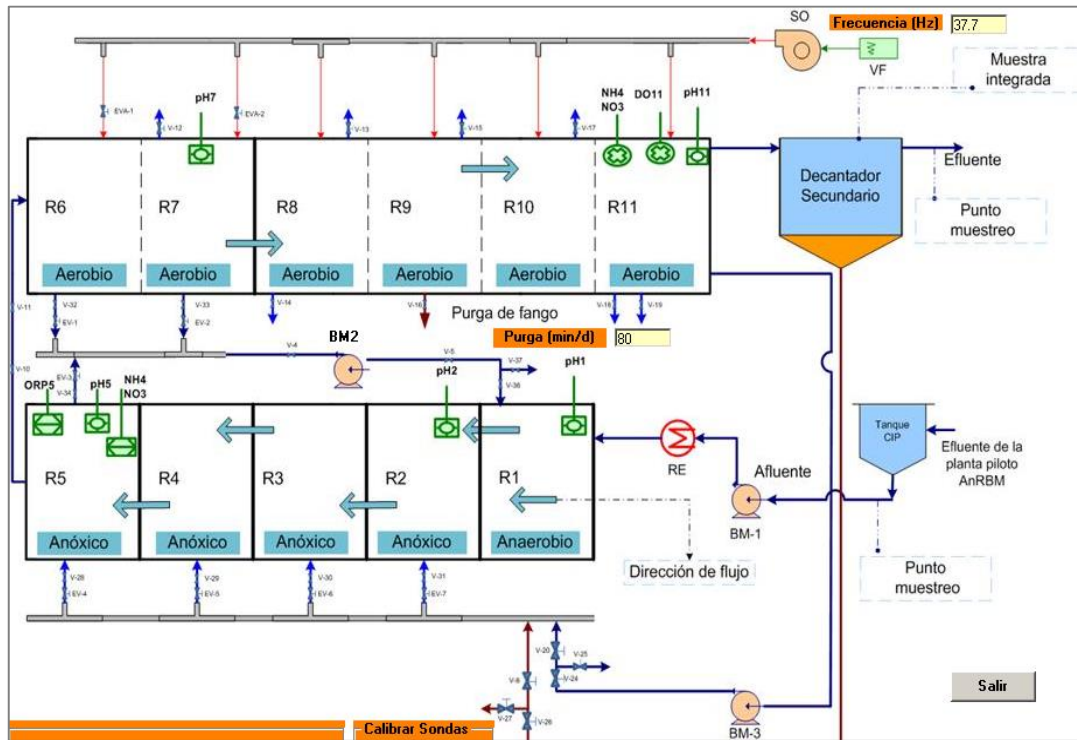


Figura 28. Sistema de control y adquisición de datos SCADA.

La comunicación entre la instrumentación instalada y el SCADA se estableció mediante un servidor OPC instalado en el ordenador. Este servidor permitió tener una interfaz común entre las aplicaciones instaladas, el software de control y el SCADA.

La instalación y comprobación del funcionamiento de todos los elementos de medida, control y adquisición de datos fueron realizadas en este estudio antes de la puesta en marcha con el fin de garantizar el correcto funcionamiento del sistema.



Figura 29. Sistema de comunicación de la planta piloto.

3.2.2 Procedimiento experimental

3.2.2.1 Operación y seguimiento

Como ya se ha mencionado anteriormente el objetivo principal de esta tesis es el estudio del tratamiento del efluente de un reactor anaerobio de membranas sumergidas (SAnMBR) mediante un sistema de fangos activados. Para ello se ha operado una planta piloto con una configuración UCT durante 2 años, concretamente desde el 19/05/2011 al 03/06/2013.

La puesta en marcha y el seguimiento analítico de los principales parámetros se explican a continuación. La operación de la planta piloto se dividió en tres etapas, cada una corresponde a una puesta en marcha. Esta división se realizó en base a los tiempos de experimentación y los periodos vacacionales.

En cada etapa se inculó el sistema con fango procedente del reactor aerobio de la EDAR del Carraixet, con el objetivo de arrancar el sistema con una biomasa establecida. El siguiente paso consistió en fijar el tiempo de retención celular (TRC) y el tiempo de retención hidráulico (TRH) (Tabla 4).

Posteriormente se ajustaron los caudales de recirculación del reactor anóxico al reactor anaerobio (Q_{Rax-an}), del reactor aerobio al reactor anóxico (Q_{Rae-ax}) y del decantador al reactor anóxico ($Q_{Rdec-ax}$), con el fin de mantener aproximadamente una relación de 2 entre los caudales de recirculación y el caudal de entrada.

Una vez todos los reactores estaban a su nivel máximo, se ponían en marcha todos los elementos de medida y control. El agua afluyente provenía del tanque de almacenamiento CIP que era bombeada a un tanque homogeneizador ubicado en la planta piloto de fangos activados que permitía la entrada por rebose a la etapa anaerobia.

Tabla 4. Caudales iniciales empleados durante la operación de la planta piloto.

Caudales	Etapa I	Etapa II	Etapa III
Q entrada ($l \cdot h^{-1}$)	60,0 ± 2,0	34,7 ± 3,9	35,1 ± 11,4
Q AX-AN($l \cdot h^{-1}$)	128,7 ± 12,8	64,7 ± 14,9	68,9 ± 18,0
Q DEC-AX($l \cdot h^{-1}$)	144,9 ± 10,5	103,7 ± 18,4	70,8 ± 19,1
Q AE-AX($l \cdot h^{-1}$)	127,4 ± 6,2	63,7 ± 13,8	68,3 ± 15,7
TRH (h)	13,3 ± 0,5	25,2 ± 2,0	Entre 13 y 30
TRC (d)	25,0 ± 7,6	22,6 ± 12,8	26,3 ± 11,5
T (°C)	19,1 ± 5,4	21,7 ± 4,3	19,8 ± 2,6

Posteriormente el sistema se deja evolucionar y se fijaba un TRC hasta que el sistema alcanzaba un estado estacionario. Durante este periodo se realizaba el seguimiento analítico del proceso. En la Tabla 5 se describen las analíticas rutinarias realizadas 3 veces por semana. La Tabla 6 muestra las analíticas adicionales que fueron realizadas durante el seguimiento exhaustivo llevado a cabo 1 vez por semana durante toda la operación de la planta piloto.

Tabla 5. Parámetros determinados en las analíticas de seguimiento del proceso.
(Analíticas rutinarias)

Parámetros

Sólidos suspendidos totales y volátiles de los reactores y efluente

Amonio (N-NH₄) del afluente, reactores y efluente

Nitratos (N-NO₃) de los reactores y el efluente

Nitrito (N-NO₂) de los reactores y el efluente

Fosfato (P-PO₄) del afluente, reactores y efluente

Sulfato (S-SO₄) del afluente, reactores efluente

Ácidos grasos volátiles del afluente, reactores y efluente

Tabla 6. Parámetros adicionales determinados en las analíticas exhaustivas.

Parámetros

Sulfuro (S-S²⁻) del afluente, reactor anaerobio y anóxico

Tiosulfato (S-S₂O₃) del alimento, reactor anaerobio

Fósforo total (Pt) del reactor aerobio

Nitrógeno total (Nt) del afluente, reactor aerobio y efluente

Demanda química de oxígeno (DQO) total del reactor aerobio

DQO soluble del afluente y efluente

Demanda biológica de oxígeno (DBO) del afluente y efluente

Muestra fijada de la población organismos

3.3 REACTORES A ESCALA LABORATORIO

Los estudios a escala laboratorio se pueden agrupar en tres grupos en base a al objetivo perseguido en cada uno de ellos: el primer grupo de ensayos permitió determinar la viabilidad del proceso de desnitrificación utilizando de manera conjunta diversos dadores de electrones presentes en el efluente del reactor SAnMBR; en el segundo grupo de ensayos se estudió la influencia del sulfuro y del tiosulfato sobre el proceso de nitrificación; y, en el último grupo se estudió el proceso de desnitrificación empleando sulfuro y ácidos grasos volátiles como dadores de electrones.

Para la realización de estos ensayos se emplearon los siguientes reactores:

- **Un reactor SBR** (Sequencing Batch Reactor) alimentado con el efluente procedente de la planta SAnMBR, para el primer estudio. Con este reactor se estudió el potencial de desnitrificación empleando los dadores de electrones presentes en el efluente SAnMBR.
- **Reactores discontinuos para el estudio de la inhibición de la nitrificación con sulfuro y tiosulfato.** En estos ensayos se utilizaron fangos de tres sistemas distintos: Fango de la planta piloto de fangos activados, fango de la EDAR del Carraixet y fango de la EDAR Quart-Benàger.
- **Reactores discontinuos para el estudio del proceso de desnitrificación empleando sulfuro y ácidos grasos volátiles** como dador de electrones. Los ensayos fueron realizados empleando fango procedente de la planta piloto de fangos activados.

A continuación se detalla en primer lugar el reactor SBR y el procedimiento experimental empleado. Posteriormente, se describen los ensayos en discontinuo (Batch) y los montajes utilizados, así como el procedimiento experimental empleado.

3.3.1 Reactor SBR

El reactor secuencial discontinuo “Sequencing Batch Reactor (SBR)”, está hecho en metacrilato transparente con forma cilíndrica y tiene un volumen útil de 7 litros. La parte superior del reactor es cerrada con el objetivo de minimizar la pérdida de gases y la reaireación del sistema. Para controlar la temperatura del proceso el reactor se ubica dentro de una cámara termostática.

El reactor dispone de una entrada en la parte inferior para el ingreso del afluente y una salida en la parte lateral intermedia. Para controlar y asegurar los volúmenes máximos y mínimos de agua residual en el reactor, el sistema tiene dos sensores de nivel.

El llenado se realiza por acción de una bomba peristáltica automatizada, y el vaciado por gravedad mediante la apertura de una electroválvula situada en la conducción de salida. Para dosificar el nitrato (N-NO_3) al inicio de cada ciclo de operación se utiliza un dosificador de alta precisión modelo Liquino 711 (Metrohm). En la Figura 30 se observa el diagrama general del reactor.

La completa homogeneización del fango en el interior del reactor se consigue mediante un agitador mecánico de 50 Hz y 35 – 2800 rpm (velocidad de giro controlada por un regulador de potencia para minimizar la transferencia de oxígeno desde la fase gas a la fase líquida del tanque) marca Heidolph.

Para monitorizar las variables del proceso se emplearon electrodos marca Consort de pH, redox (ORP) y temperatura (T). Para medir la concentración

de oxígeno disuelto (OD) se empleó un oxímetro modelo Oxi 340 de la marca WTW. El oxígeno era monitorizado con el objetivo de garantizar las condiciones anóxicas del reactor. La información obtenida de los electrodos se lee a través de un software de control y adquisición de datos. La información de todas las sondas, excepto la de la sonda de oxígeno disuelto, era transmitida al ordenador a través de un analizador multiparamétrico modelo C832 de la marca Consort. Los registros de las variables monitorizadas eran almacenados cada 30 segundos para su posterior análisis.

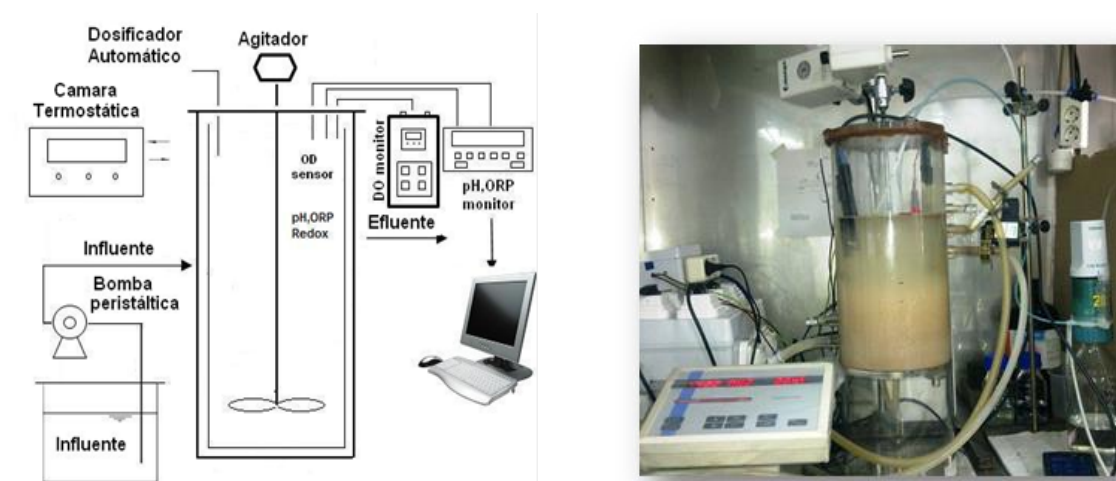


Figura 30. Esquema y fotografía del montaje experimental del reactor SBR.

La principal característica de la operación de un SBR es su flexibilidad y posibilidad de retener biomasa, lo cual es fundamental para la puesta en marcha de procesos en los que intervienen organismos. Además, las variaciones de las variables (pH, ORP, etc.) se muestran de forma más acusada que operando el sistema en continuo y permiten una mejor interpretación de la información obtenida.

El procedimiento experimental seguido en este estudio a escala laboratorio se menciona a continuación:

- Selección de parámetros de operación
- Puesta en marcha
- Operación y seguimiento del proceso
- Análisis de resultados

Dentro de la selección de los parámetros de operación se fijaron las condiciones iniciales de operación (temperatura (T), pH, concentración de oxígeno disuelto (OD), tiempo de retención celular (TRC) y tiempo de retención hidráulico (TRH)). Las ecuaciones utilizadas para calcular el TRC (Ec. 20) y TRH (Ec.21) se describen a continuación:

$$TRH: \frac{V_{reactor}}{Q_{afluente}} * Treacción \quad Ec. 20$$

$$TRC: \frac{V_{reactor}}{Q_{purga}} * Treacción \quad Ec. 21$$

La puesta en marcha consistió en inocular el reactor con 7 litros de fango procedente del reactor aerobio de la EDAR del Carraixet. Se fijaron 4 ciclos al día, cada ciclo con una duración total de 6 horas. El TRC fue de 20 días teniendo en cuenta que el efluente proviene de un reactor de membranas, es decir libre de sólidos, y el TRH se mantuvo en 19 h. Esta distribución se realizó teniendo en cuenta las experiencias obtenidas en otros estudios, desarrollados en el grupo de investigación (Aguado *et al.*, 2009; Acevedo *et al.*, 2012). A continuación se describen cada una de las etapas que componen el ciclo.

Una etapa de llenado, con una duración total de 6 minutos que equivale al 1,6% del tiempo total del ciclo. Una etapa anóxica con una duración total de 5,2 horas, donde se llevaba a cabo el proceso de desnitrificación y que equivale al 86% del ciclo total. Una etapa de decantación con una duración total de 33 min equivalente al 9,2% del tiempo total y finalmente, se procedía a la etapa de vaciado (1,8 litros) del sobrenadante con una duración total de 6 min., equivalente a un 1,6% del tiempo total del ciclo quedando el

reactor listo para un nuevo ciclo (Figura 31). Las variables de operación del SBR se muestran en la Tabla 7.

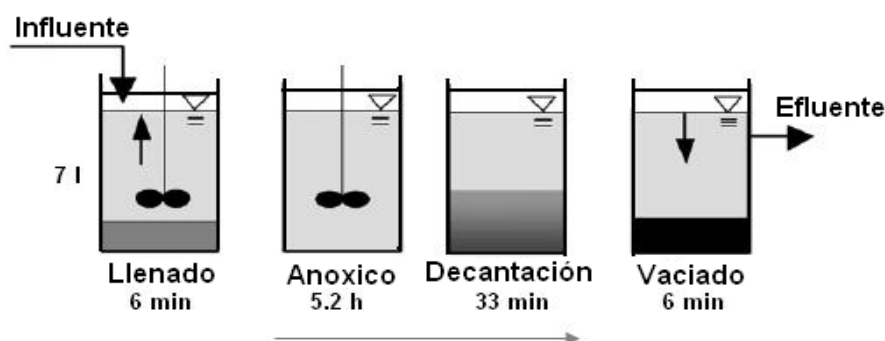


Figura 31. Etapas durante un ciclo de operación.

Tabla 7. Variables de operación del reactor SBR.

Reactor SBR	
Ciclos	4/día
Duración etapa anóxica	5,2 h
Decantación	33 min
T	20 °C
OD	< 1mg l ⁻¹
TRC	20 días
TRH	19 h

El reactor estaba ubicado dentro de una cámara termostática que permitió mantener la temperatura del sistema entre 20-22°C. El afluente era traído diariamente de la planta SAnMBR y se almacenaba en nevera a 5°C en un bidón de 25 litros con el fin de minimizar su degradación y la volatilización de los gases disueltos.

Diariamente se extraía del reactor un volumen de fango correspondiente a la purga de acuerdo al TRC fijado (Ec.20). La limpieza del reactor y la calibración de las sondas se realizaban sistemáticamente una vez por semana.

La operación y seguimiento del proceso fue realizado mediante la monitorización de las distintas sondas de pH, conductividad, ORP, T y OD instaladas en el reactor, así como las analíticas realizadas a los distintos parámetros que garantizaban el correcto funcionamiento del proceso biológico: amonio, nitrato, nitrito, fosfato, sulfato, sulfuro, ácido acético y metano disuelto (apartado 3.4).

3.3.2 Reactores para el estudio de la inhibición de la nitrificación con sulfuro y tiosulfato.

Los ensayos en laboratorio para el estudio de la inhibición de la nitrificación fueron realizados con el fin de determinar la influencia del sulfuro y el tiosulfato sobre este proceso.

Los ensayos se realizaron mediante la aplicación de técnicas respirométricas obteniéndose un registro continuo de la concentración de oxígeno disuelto en un sistema determinado. Del estudio de la variación de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo se determina la velocidad de consumo de oxígeno (OUR, oxygen uptake rate). En función de la disponibilidad de sustrato para el crecimiento de los organismos se obtiene un valor OUR. Cuando todo el sustrato ha sido consumido se alcanza el valor mínimo de OUR constante, que corresponde con el estado endógeno. Durante este estado los organismos que aún permanecen viables utilizan las células muertas como fuente de alimento.

Los ensayos fueron realizados empleando el dispositivo experimental llamado BIOCALIBRA (Ribes *et al.*, 2012) desarrollado por el grupo de investigación CALAGUA (Figura 32). Su funcionamiento se basa en la aplicación de respirometrías sometiendo el fango activado a una gran diversidad de condiciones. El equipo realiza *respirometrías puntuales*, que

permiten obtener la respuesta del fango activado (cambio en la OUR) frente a la adición de una cantidad determinada de sustrato/inhibidor (ΔOUR_i), y *respirometrías continuas*, que permiten obtener la evolución de la OUR con el tiempo (OUR_t).

El dispositivo BIOCALIBRA se compone de: un armario principal (Figura 32), que contiene la mayor parte de los componentes (una placa electrónica, un reactor de respirometrías encamisado, un agitador magnético, dos cilindros inyectoros de sustrato/inhibidor, dos botellas de sustrato, el cuerpo de la bomba peristáltica, una soplante y todas las electroválvulas, tanto de fango como de sustrato/inhibidor); dos tanques externos (de diferente volumen); un agitador de palas; y un ordenador equipado con un software para el control del equipo y el tratamiento de la información obtenida.

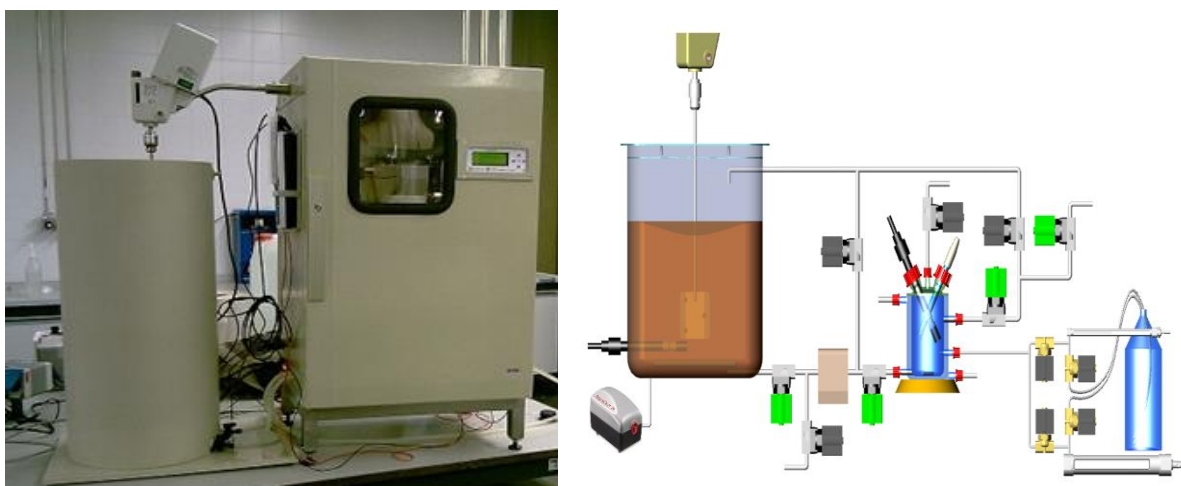


Figura 32. Fotografía y esquema del dispositivo BIOCALIBRA

Para la realización de estos ensayos se escogieron 3 tipos de fango: fango de la planta piloto de fangos activados, fango de la EDAR del Carraixet (Alboraya, Valencia) y fango de la EDAR Quart-Benàger. Ambas EDAR se encuentran situadas en torno a la ciudad de Valencia y en ambos casos el tratamiento empleado es el proceso de fangos activados.

Los ensayos fueron divididos en dos partes: en la primera parte, el objetivo era determinar la velocidad de consumo de amonio en condiciones normales

de operación, es decir sin presencia de sulfuro o tiosulfato; y, en la segunda parte, determinar la velocidad de consumo de amonio en presencia de sulfuro o tiosulfato.

La metodología seguida para la realización del primer grupo de ensayos se describe a continuación y se esquematiza en la Figura 33:

- **Recogida y almacenamiento del fango:** El fango utilizado en cada ensayo era recogido puntualmente del reactor biológico, se almacenaba en bidones de 10 litros y posteriormente era sometido a una serie de análisis para su caracterización.
- **Caracterización del fango:** Sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos volátiles, ácidos grasos volátiles, amonio, nitrito, nitrato, fosfato, sulfato, pH y alcalinidad.
- **Preparación del equipo:** La preparación del equipo consistía en llenar el tanque externo del BIOCALIBRA con 9 litros de fango y asignar las condiciones de cada respirometría en el software del equipo. Inicialmente se asignaba el nombre del archivo, la consigna de oxígeno disuelto inferior y superior ($1 - 2,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), y se verificaba la configuración general del equipo.
- **Selección de la temperatura:** Se realizaron ensayos para dos temperaturas, 13 y 20°C. Se decidió estudiar estas temperaturas teniendo en cuenta el intervalo mínimo y máximo de temperatura de mayor influencia durante la operación de la planta piloto. La temperatura era controlada mediante un baño termostático frío/calor que mantenía la consigna en el valor deseado.
- **Inicio del ensayo:** Una vez puesto el fango y fijada la temperatura en el valor deseado se daba inicio al ensayo respirométrico. Durante la

primera parte se realizaba a modo de respirometría de control el seguimiento analítico hasta el estado endógeno. Los parámetros analizados eran: amonio, nitrito, nitrato, fosfato, sulfato, pH y alcalinidad. Esta información permitía calcular la velocidad de consumo de amonio y la dinámica en la producción de nitrito y nitrato en las condiciones de partida del fango empleado en cada ensayo. Una vez concluido cada ensayo se realizaba el análisis de la información obtenida.

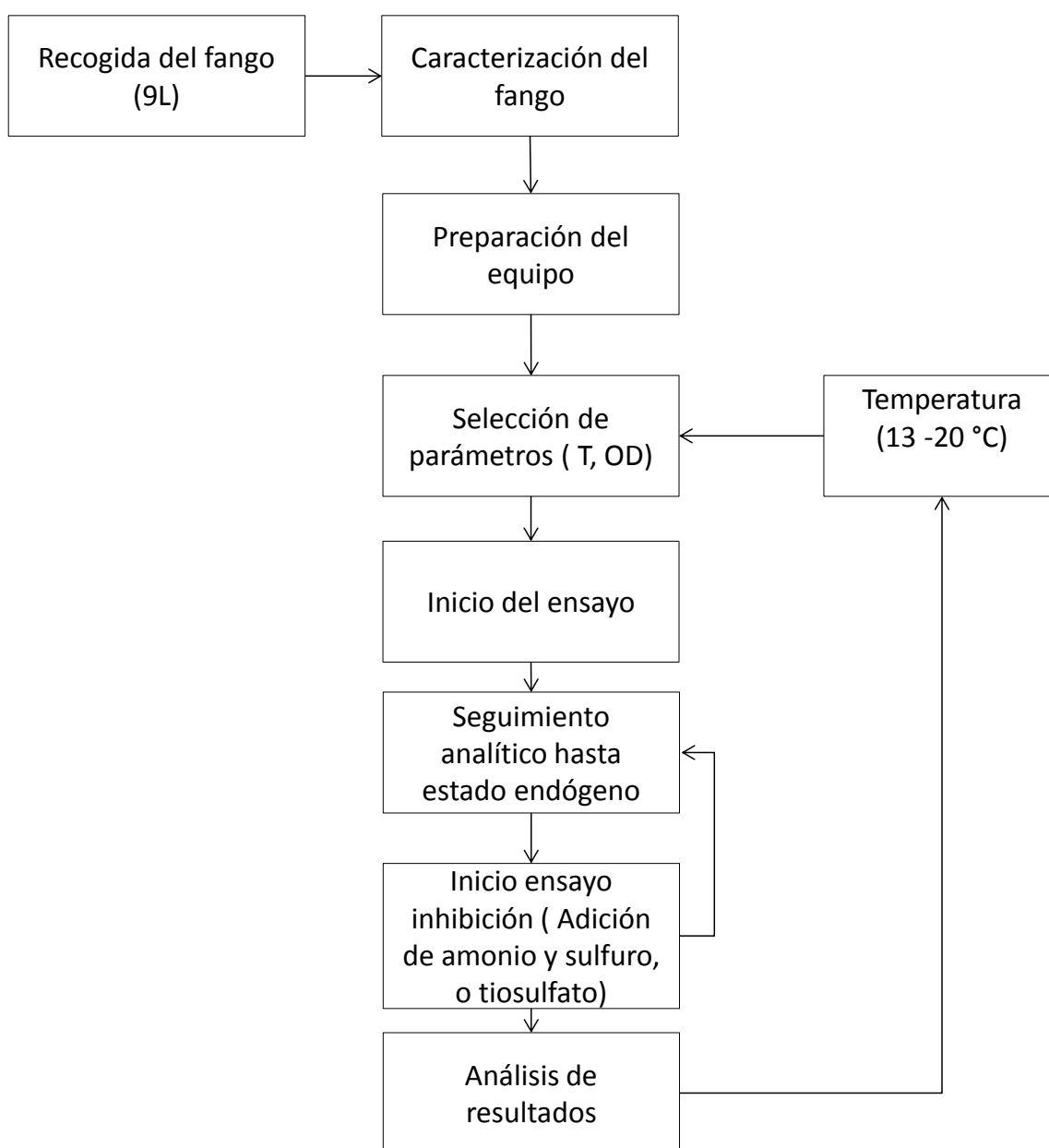


Figura 33. Diagrama de flujo para el estudio de la inhibición de la nitrificación en presencia de sulfuro o tiosulfato.

Para la segunda parte del ensayo (Inhibición en presencia de sulfuro o tiosulfato), una vez que el fango llegaba al estado endógeno, se iniciaba la adición de sulfuro o tiosulfato con el fin de mantener la concentración en el valor deseado. Inicialmente, se adicionaba sulfuro o tiosulfato durante un periodo de tiempo de 3 h para mantener una concentración determinada en el reactor. Para ello se preparaba un patrón de sulfuro de sodio nanohidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) con una concentración de $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ o un patrón de tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), tras una hora del ensayo se adicionaba amonio para obtener una concentración en el reactor de 30 a $40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Después de las 3 h de ensayo, se suspendía la adición de sulfuro o tiosulfato y se dejaba que el fango alcanzara el estado endógeno. Durante todo el ensayo se recogían muestras y se analizaban los parámetros descritos en la primera parte del ensayo, con el fin de determinar la influencia del sulfuro sobre el proceso de nitrificación.

3.3.3 Reactores para el estudio de la desnitrificación.

Para determinar la influencia del sulfuro y los ácidos grasos volátiles sobre el proceso de desnitrificación, se llevaron a cabo una serie de experimentos en reactores agitados discontinuos.

El montaje experimental consistía en 3 reactores de metacrilato de forma cilíndrica con un volumen útil de 7 litros. Cada reactor estaba equipado con un sistema de agitación mecánico y sondas de pH y oxígeno disuelto, conectadas a un programa de ordenador, específicamente diseñado para esta tarea, que permitía registrar de forma continua los datos de pH, oxígeno disuelto y temperatura (Figura 34). Los reactores fueron inoculados con fango procedente de la planta piloto de fangos activados. Posteriormente, la biomasa era sometida a condiciones anóxicas mediante la adición en cada reactor de una concentración conocida de nitrógeno en forma de nitrato, nitrito o ambas especies y la adición de sulfuro o ácido acético.

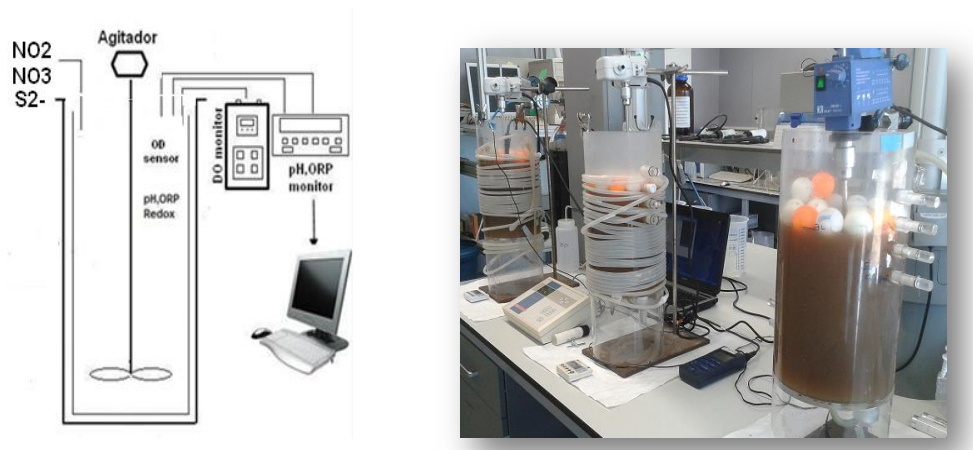


Figura 34. Montaje experimental, ensayos de desnitrificación con sulfuro y ácido acético.

Durante el ensayo se recogían muestras periódicamente de cada reactor con el fin de determinar la concentración del dador de electrones presente (sulfuro o ácido acético) y nitrógeno en forma de nitrato y nitrito. Con esta información se determinaba la velocidad de consumo para cada dador de electrones. La metodología seguida en este grupo de ensayos se describe a continuación y está esquematizada en la Figura 35:

- Recogida y almacenamiento del fango: El fango utilizado en cada ensayo era recogido puntualmente del reactor biológico, se almacenaba en bidones de 10 litros y posteriormente era sometido a una serie de análisis para su caracterización.
- Caracterización del fango: Sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos volátiles, ácidos grasos volátiles, amonio, nitrito, nitrato, fosfato, sulfato, pH y alcalinidad.
- Adición de nitrógeno (nitrato, nitrito): Adición de un patrón de nitrato (NaNO_3) o nitrito (NaNO_2) para obtener una concentración en el reactor al inicio del ensayo entre $15\text{-}30 \text{ mgN l}^{-1}$.

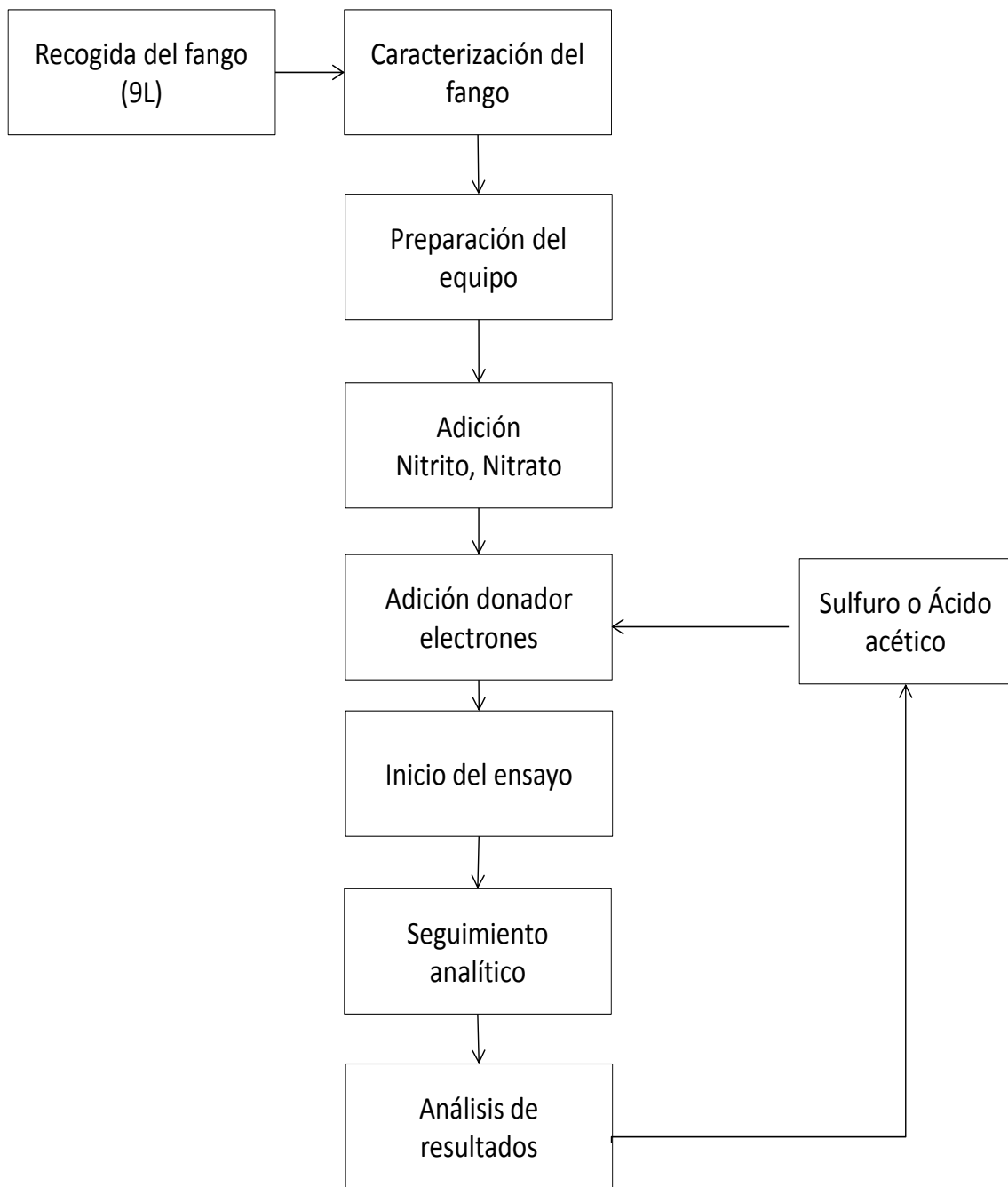


Figura 35. Diagrama de flujo para los ensayos de desnitrificación.

- Adición del donador de electrones (sulfuro o ácido acético): Adición de un patrón de ácido acético para obtener una concentración en el reactor al inicio del ensayo de $100 \text{ mgDQO} \cdot \text{l}^{-1}$. Adición de un patrón de sulfuro de sodio nanohidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) para obtener una concentración en el reactor al inicio del ensayo de 15 a $30 \text{ mgS} \cdot \text{l}^{-1}$.

- Inicio del ensayo: Una vez puesto el fango y realizada la adición de los compuestos de nitrógeno (nitrito o nitrato), ácido acético o sulfuro se iniciaba el ensayo. Durante el ensayo se recogían muestras con el objetivo de realizar el seguimiento analítico del nitrato, nitrito, sulfuro, ácido acético y sulfato. Esta información permite determinar la velocidad de desnitrificación empleando ácido acético, metanol o sulfuro.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS Y MICROBIOLÓGICOS

Durante el seguimiento del proceso se realizaron diversas analíticas que permitieron comprobar el correcto funcionamiento de los procesos estudiados. De manera adicional se obtenía información que era suministrada por las diferentes sondas instaladas en la planta piloto de fangos activados y en los montajes de laboratorio, que permitían observar la tendencia de algunos parámetros. Las diversas técnicas analíticas empleadas se describen a continuación:

Las técnicas analíticas utilizadas en este estudio corresponden con la determinación de amonio (N-NH_4), nitrito (N-NO_2), nitrato (N-NO_3), ortofosfato (P-PO_4), nitrógeno total (NT), fósforo total (PT), sólidos suspendidos totales y volátiles, alcalinidad, ácidos grasos volátiles, sulfuro (S-HS), sulfato (S-SO_4), tiosulfato (S_2O_3), demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO) y metano disuelto (CH_4).

Amonio, nitrito, nitrato, ortofosfato y sulfato

Las concentraciones de amonio, nitrito, nitrato, ortofostato y sulfato, una vez filtradas las muestras por un tamaño de poro $0,45 \mu$, fueron determinadas automáticamente empleando un analizador multiparamétrico

Smartchem 200 de la casa Alliance Instruments. Las técnicas empleadas en este equipo corresponden con las descritas en el Standard Methods (APHA, 2005). En el caso del nitrato corresponde con el método 4500-NO₃-H. Este método tiene interferencias con la presencia de sulfuro en concentraciones superiores a 10 mgS l⁻¹ ocasionando variaciones en la medida de nitrato y nitrito en torno a ±10%.

Nitrógeno total (N_T)

Para la determinación de nitrógeno total se utilizó el test N° 1.14537.0001 de la firma Merck. Los compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno se transforman en nitratos por el método de Koroleff por tratamiento con un oxidante en un termorreactor. Estos nitratos, en solución sulfúrica y fosfórica forman con 2,6-dimetilfenol (DMP) el compuesto 4-nitro-2,6-dimetil-fenol que se determina fotométricamente a 338 nm empleando un espectrofotómetro (Spectroquant VEGA 400).

Fósforo total (P_T)

Normalmente, el fosfato es la forma en la que se encuentra el fósforo en las aguas naturales y residuales. Estos fosfatos se pueden clasificar en ortofosfatos, fosfatos condensados (polifosfatos) y fósforo orgánico. Para la determinación de la concentración de fósforo total es necesaria la conversión previa de los polifosfatos y el fósforo orgánico a ortofosfato.

El método utilizado en esta tesis ha sido la digestión ácida mediante persulfato potásico (APHA, 2005) con un tiempo de reacción de dos horas. Los dos reactivos utilizados en la digestión son el ácido sulfúrico y el persulfato potásico. El primero de ellos es el encargado de transformar los polifosfatos en ortofosfatos y el segundo el fósforo orgánico en ortofosfatos.

Sólidos suspendidos totales y volátiles

La concentración de sólidos suspendidos totales (SST) se determina mediante el paso de una muestra a través de un filtro con tamaño de poro de 0,45 μm . Posteriormente, se pesa el material retenido una vez se haya eliminado la humedad a 105°C en una estufa. El incremento en el peso del filtro representa la cantidad de sólidos suspendidos totales en la muestra. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y los sólidos suspendidos no volátiles (SSNV) se determinan mediante la calcinación de los sólidos suspendidos totales a 550°C (APHA/AWWA/WEF, 2005).

Alcalinidad y ácidos grasos volátiles

Para la determinación de la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles se ha empleado el método de valoración ácido-base propuesto por Moosbrugger *et al.*, (1992). El método consiste en la valoración de una muestra con una concentración conocida de HCl (0,1N) hasta alcanzar valores de pH de 6,7, 5,9, 5,2 y 4,3.

Posteriormente, a partir de cálculos de equilibrio químico que consideran las concentraciones de especies químicas como: fosfato, amonio y sulfuro, pH y temperatura inicial de la muestra, volumen de muestra empleada, y los volúmenes de HCl adicionados para alcanzar los respectivos valores de pH antes citados; se calcula la alcalinidad asociada al carbonato y se expresa como carbonato de calcio (CaCO_3). El equipo utilizado para llevar a cabo este análisis es un valorador (titrador) marca 716 DMS Titrino de la firma comercial Metrohm.

Sulfuro

Tal y como se mencionó en el apartado 1.1.3 la forma en la que el sulfuro está presente en el medio se relaciona con el equilibrio de disociación y éste

está en función del pH de la muestra. A valores de pH mayores a 10 el sulfuro está en mayor porcentaje como ion sulfuro (S^{2-}), siendo la especie más disuelta. Por tanto, una vez tomada la muestra, es posible evitar la pérdida del sulfuro aumentando rápidamente el pH de la muestra.

Para la determinación de la concentración de sulfuro se puso a punto el método estándar del azul de metileno, 4500- S^{2-} D (APHA, 2005). Este método se basa en la reacción del sulfuro con cloruro férrico y dimetil-p-fenilendiamina, para producir azul de metileno. Después de que el color se haya desarrollado, se añade fosfato amónico para eliminar la interferencia por el color del cloruro férrico. Para determinar la concentración del sulfuro, se mide la absorbancia del azul de metileno a 664 nm y se compara con una curva de calibrado. También se utilizó el test N° 1.14779.0001 de la marca comercial Merck el cual está desarrollado usando como referencia el método descrito en el Standard Methods 4500- S^{2-} D (APHA, 2005).

Tiosulfato

La medida de tiosulfato se determinó mediante cromatografía iónica. El equipo empleado fue un IC modelo 761 Compact de la casa comercial Metrohm.

Demanda química de oxígeno (DQO)

Para la determinación de la DQO se han empleado dos métodos analíticos, diferenciados entre sí por el intervalo de concentración de DQO para el cual se aplican. La medida de la DQO en ambos casos se realiza de forma indirecta, determinando el exceso de dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) empleado.

La DQO de las muestras con un elevado contenido en material particulado se determinó mediante el método del reflujó abierto, 5220 B (APHA, 2005), mientras que la DQO de las muestras solubles o con bajo contenido en

material particulado, se determinó mediante el método colorimétrico con digestión mediante reflujo cerrado 5220D (APHA, 2005).

El primero de los métodos empleados o de reflujo abierto (APHA, 2005), diseñado para un intervalo de DQO comprendido entre 50 y 800 mg DQO \cdot l⁻¹. En este método se determina el exceso de dicromato a través de una valoración redox. El segundo método o de reflujo cerrado diseñado para un intervalo de medida comprendido entre 10 y 150 mg DQO \cdot l⁻¹. Este método consiste en una digestión con reflujo cerrado, y determinación del exceso de dicromato por colorimetría.

Demanda biológica de oxígeno (DBO)

Para la determinación de la DBO se ha utilizado un método experimental basado en el respirómetro de Warburg (Metcalf y Eddy, 1995) mediante el montaje experimental OxiTop diseñado por la firma comercial WTW.

Metano disuelto

Para determinar la cantidad de metano disuelto, se utilizó la técnica de análisis del espacio de cabeza mediante cromatografía gaseosa (CG). Esta técnica se basa en el hecho de que los compuestos volátiles en el líquido alcanzarán un equilibrio en el espacio de cabeza del vial. La composición de metano en el espacio de cabeza del vial se determina mediante CG, posteriormente se calcula el equilibrio entre fases empleando la ley de Henry y una constante en función de la temperatura.

Con el fin de comparar y realizar en continuo la medida de la concentración de metano en el biogás, el reactor SAnMBR contaba con un analizador continuo de gases (X-Stream X2, Emerson).

Las ecuaciones empleadas para determinar la concentración de metano disuelto (Ecuaciones 22, 23 y 24), partiendo de la concentración de metano en el espacio de cabeza ($Y_{CH_4}^{EC}$) medido por CG, se presentan a continuación:

Concentración de metano disuelto:

$$C_S\left(\frac{mgCH_4}{L}\right) = [N^{CH_4} \cdot 16 \cdot 1000] \quad \text{Ec. 22}$$

Donde N^{CH_4} es la molaridad del metano en la fase líquida y se calcula como:

$$N^{CH_4} \left(\frac{Mol}{l}\right) = [X_G \cdot 55.6] \quad \text{Ec. 23}$$

Donde X_G es la fracción molar del metano en la fase líquida calculada a partir de:

$$X_G = \frac{Y_{CH_4}^{EC}}{PT(atm) \cdot H(T)} \quad \text{Ec. 24}$$

Donde P es la presión total del sistema y $H(T)$ es la constante de Henry a la temperatura de trabajo que se calcula mediante la ecuación 25:

$$H(T) = 10^{\left(\frac{-675,7}{T(K)+6,88}\right)} \quad \text{Ec. 25}$$

Balance de DQO del efluente de un reactor SAnMBR

El efluente tratado en este estudio proviene de un reactor anaerobio de membranas sumergidas, es decir libre de sólidos suspendidos. Las fracciones que componen la DQO del efluente SAnMBR que servirán como balance global de DQO en este estudio se presentan a continuación:

DQO efluente: $S_I + S_F + S_A + DQO_{S_2} + DQO_{CH_4} + DQO_{H_2}$

Dónde:

- S_F es la fracción soluble fácilmente fermentable.
- S_I es la fracción soluble inerte.
- S_A es la DQO correspondiente a los AGV presentes en el efluente.
- DQO_{S_2} es la DQO correspondiente al sulfuro presente en el efluente.
- DQO_{CH_4} es la DQO correspondiente al metano disuelto en el efluente.
- DQO_{H_2} es la DQO del hidrógeno disuelto en el efluente.

La DQO del hidrógeno será, bajo condiciones normales de operación, despreciable debido a la afinidad de los organismos sulfatorreductores por el hidrógeno y la ausencia de productos intermedios.

El sulfuro disuelto es completamente oxidado durante la determinación de la DQO por lo que es posible asumir una oxidación estequiométrica hasta sulfato, de tal forma que serán necesarios 2 mg de $O_2 \cdot mg^{-1} S^{2-}$, con lo cual, para calcular la DQO asociada al sulfuro será suficiente con multiplicar por 2 el valor de la concentración de sulfuro. De igual forma la DQO asociada al metano disuelto puede calcularse estequiométricamente, es decir serán necesarios 4 mg $O_2 \cdot mg^{-1} CH_4$.

Análisis microbiológico

Para el análisis de la población de microorganismos de interés en el proceso se empleó la técnica de hibridación in situ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) descrita anteriormente. La Tabla 8 muestra las sondas empleadas en este estudio durante el seguimiento microbiológico del fango.

También se empleó la técnica de viabilidad celular que permite identificar los organismos vivos y muertos presentes en una determinada muestra, valorando la integridad de la membrana celular. Se empleó el kit “L-7012 LIVE/DEAD® BacLight viability kit for microscopy and quantitative assays”, el cual utiliza dos fluorocromos: el Yoduro de propidio (PI, tinción roja) y el

SYTO 9 (tinción verde). Cuando la membrana bacteriana se encuentra en buen estado (bacteria viable) la molécula del fluorocromo SYTO9 es capaz de entrar en la célula prevaleciendo una coloración verde. Si la membrana esta alterada o dañada (célula muerta) la molécula PI entra en la célula y presenta una coloración roja.

Tabla 8. Sondas de hibridación empleadas en la técnica FISH.

Sonda	Organismo	Referencia
EUB338I	Eubacteria	Amman <i>et al.</i> ,1990
EUB338II	Plantomycetales	Daims <i>et al.</i> , 1999
EUB338III	Verrucomicrobiales	Daims <i>et al.</i> , 1999
Ma464	Methanotrophs typeII	Eller <i>et al.</i> , 2001
Mg84	Methanotrophs typeI	Eller <i>et al.</i> , 2001
AT1458	Azoarcus-Thaurea-Castellaniella	Rabus <i>et al.</i> , 1999
SRB385	Desulfovibrionales	Amann <i>et al.</i> , 1990
PAO462	C. accumulibacter phosphatis	Crocetti <i>et al.</i> , 2000
PAO651	C. accumulibacter phosphatis	Crocetti <i>et al.</i> , 2000
PAO846	C. accumulibacter phosphatis	Crocetti <i>et al.</i> , 2000
NSO1225	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing	Mobarry <i>et al.</i> ,1996
NMO218	Nitrosomonas oligotropha-lineage	Gieseke <i>et al.</i> , 2001
NTspa712	Most members phylum Nitrospirae	Daims <i>et al.</i> , 2001
G3M123T	Thiothrix	Kanagawa, 2000

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se presentan y se discuten los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis.

En la primera parte se muestran los resultados obtenidos durante la operación de un reactor secuencial discontinuo “sequencing batch reactor (SBR)” a escala laboratorio donde se estudió el proceso de desnitrificación utilizando como dador de electrones los compuestos presentes en el efluente del reactor anaerobio de membranas sumergidas (SAnMBR). En concreto, se estudió la viabilidad del proceso de desnitrificación empleando los ácidos grasos volátiles (AGV), sulfuro y metano disuelto presentes en dicho efluente.

La segunda parte consistió en el estudio del tratamiento del efluente del reactor SAnMBR en una planta piloto de fangos activados donde se desarrollaron procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo. Se determinó el efecto de la temperatura y de las concentraciones de sulfuro, AGV y metano disuelto sobre estos procesos. Así mismo, paralelamente al estudio llevado a cabo en la planta piloto de fangos activados, se realizaron ensayos en discontinuo en laboratorio para evaluar el efecto del sulfuro sobre los procesos de nitrificación y desnitrificación.

Durante los estudios llevados a cabo, tanto en el reactor SBR como en la planta piloto, se realizó la identificación y cuantificación de las especies presentes empleando la técnica FISH.

Los resultados obtenidos en cada una de las partes descritas anteriormente se presentan a continuación.

4.1 REACTOR SBR

El objetivo del trabajo experimental explicado en este apartado consistió en el estudio de la capacidad de desnitrificación utilizando los distintos dadores de electrones disponibles en el efluente del reactor SAnMBR, tales como: ácidos grasos volátiles (AGV), metano disuelto (CH_4) y sulfuro (H_2S).

El reactor SBR se operó durante 210 días (Julio de 2010 hasta Enero de 2011). Durante la operación, el afluente al reactor SBR se tomó del tanque CIP que recoge el efluente generado en el reactor SAnMBR.

Las características físico-químicas del afluente tratado se presentan en la Tabla 9. La concentración de nitrato indicada en la tabla corresponde con el valor obtenido después de adicionar un patrón de nitrato al afluente. Se fijó esta concentración asumiendo que todo el amonio presente en el afluente fuera nitrificado en una etapa previa a la desnitrificación.

Tabla 9. Caracterización del afluente

Parámetro	Unidad	Media	δ
N-NH₄	(mg·l ⁻¹)	49,8	16,6
N-NO₃	(mg·l ⁻¹)	50,0**	1,0
P-PO₄	(mg·l ⁻¹)	4,3	2,1
S-H₂S	(mg·l ⁻¹)	108,3	37,7
S-SO₄	(mg·l ⁻¹)	32,5	8,5
AGV	(mg DQO·l ⁻¹)	35,4	60,6
CH₄ disuelto	(mg DQO·l ⁻¹)	41,6	18,2
Conductividad	(mS cm ⁻¹)	2,0	0,2
Alcalinidad	(mgCaCO ₃ l ⁻¹)	592,5	124,2
DQO	(mg DQO l ⁻¹)	273,1	122,3
pH		7,5	0,3

* δ desviación estándar, **concentración de nitrato adicionada al afluente del reactor SBR.

El estudio fue dividido en cinco periodos, a lo largo de la cuales se fue modificando el tiempo de retención celular (TRC) (Tabla 10). El tiempo de retención hidráulico (TRH) y la temperatura (T) se mantuvieron constantes en 19 h y 20 ± 2 °C, respectivamente. Estos valores se fijaron teniendo en cuenta las experiencias obtenidas con reactores SBR en estudios desarrollados en el grupo de investigación CALAGUA (Aguado *et al.*, 2009; Acevedo *et al.*, 2012).

Tabla 10. Condiciones de operación del reactor SBR.

Periodo	TRC(d)	δ
I	-	-
II	33,9	2,6
III	25,9	2,2
IV	26,3	9,6
V	20,5	1,4

* δ desviación estándar

Después de inocular el reactor con fango procedente de la zona aerobia del reactor biológico de la EDAR del Carraixet (Alboraya, Valencia), el SBR se dejó evolucionar en condiciones anóxicas con el objetivo de adaptar los organismos presentes a las características del afluente y favorecer el crecimiento de los organismos desnitrificantes (Periodo I). Después de observar una mejora en la desnitrificación se ajustó la purga de fango con el objetivo de alcanzar un TRC en torno a 30 días (periodo II).

Posteriormente, se fue modificando la purga de fango hasta alcanzar un TRC de 25,9 días (periodo III). En el periodo IV se intentó ajustar la purga de fango para un TRC en torno a 20 días pero un fallo operacional al inicio del periodo provocó una pérdida de sólidos y el consecuente descenso del TRC, siendo necesario ajustar la purga de fango con el objetivo de recuperar el sistema. El valor medio del TRC en este periodo fue de 26,3 días.

En el periodo V se ajustó nuevamente la purga de fango hasta obtener el TRC deseado de 20,5 días.

La Figura 36 muestra la evolución de la concentración de sólidos suspendidos totales durante el seguimiento del reactor SBR. Tal y como se observa en la figura, durante el periodo I los sólidos aumentaron indicando el crecimiento de la biomasa en el sistema. En los periodos siguientes los sólidos se mantuvieron aproximadamente constantes y en torno a $1300 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, excepto en el periodo IV donde se presentaron algunos fallos operacionales durante el ciclo, que ocasionaron una pérdida de biomasa con el efluente. Ya en la etapa V, y tras varios días de operación, el sistema se recuperó.

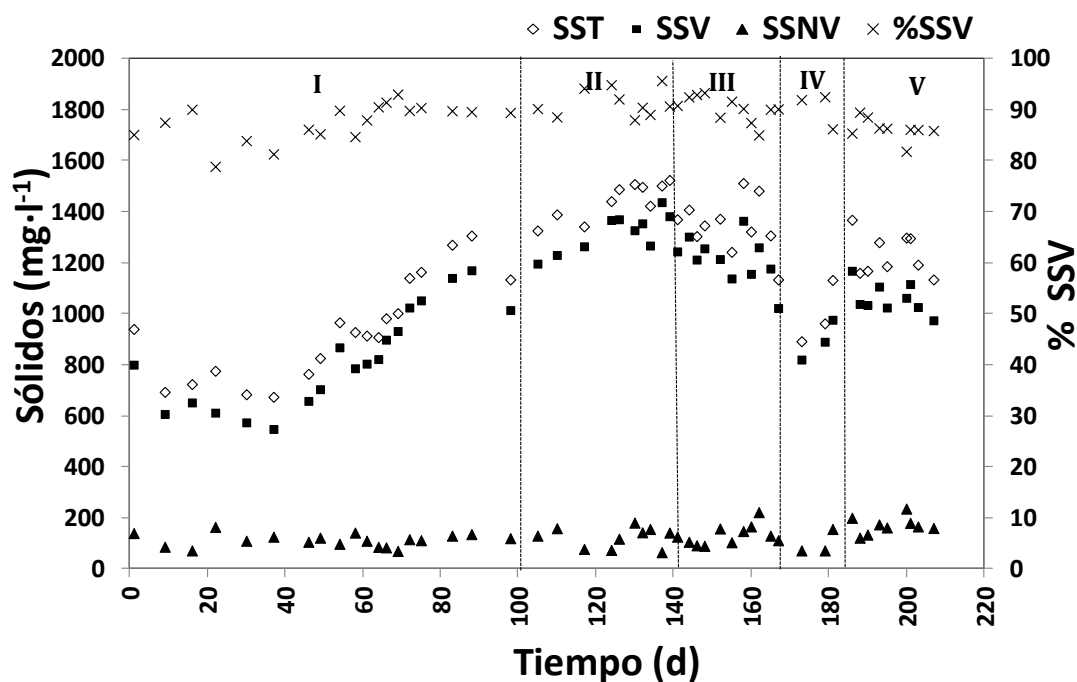


Figura 36. Evolución de la concentración de los sólidos suspendidos totales y volátiles en el SBR.

A partir de todos los datos experimentales recogidos durante el seguimiento del SBR, se calculó el grado de desnitrificación en cada periodo y se evaluó la influencia de la concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto sobre el rendimiento obtenido. Los resultados se presentan y discuten a continuación:

4.1.1 Determinación del grado de desnitrificación

La Figura 37 muestra la evolución de la concentración de nitrato, nitrito y nitrógeno gas durante la operación del SBR, calculada esta última por balance, en cada periodo estudiado. Los valores representados corresponden a las concentraciones medidas al inicio y final del ciclo 2 de operación.

Durante el periodo I, el grado de desnitrificación fue variable debido al arranque del sistema, obteniendo en los primeros 50 días un grado de desnitrificación del 22,4%. Posteriormente se observó un incremento en la actividad desnitrificante alcanzando grados de desnitrificación en torno al 48%.

La evolución de la concentración de nitrato en el periodo II se muestra en la Figura 37. Durante este periodo se puede observar que al inicio se presentó un leve aumento de la concentración de nitrato; sin embargo, al final del periodo el nitrato empezó a descender hasta eliminarse casi por completo del sistema. El grado de desnitrificación en este periodo fue del 69,2%. Un aspecto importante observado en los periodos I y II es la acumulación de nitrito en el sistema.

En los periodos III, IV y V el grado de desnitrificación fue del 86,3%, 90,5% y 94,2%, respectivamente. En la Figura 37 se puede observar que durante estos periodos el nitrato fue eliminado en su mayoría del sistema y en ningún caso se observó acumulación de nitrito.

En los apartados siguientes se discutirá la participación de los dadores de electrones presentes en el afluente sobre el proceso de desnitrificación durante cada periodo.

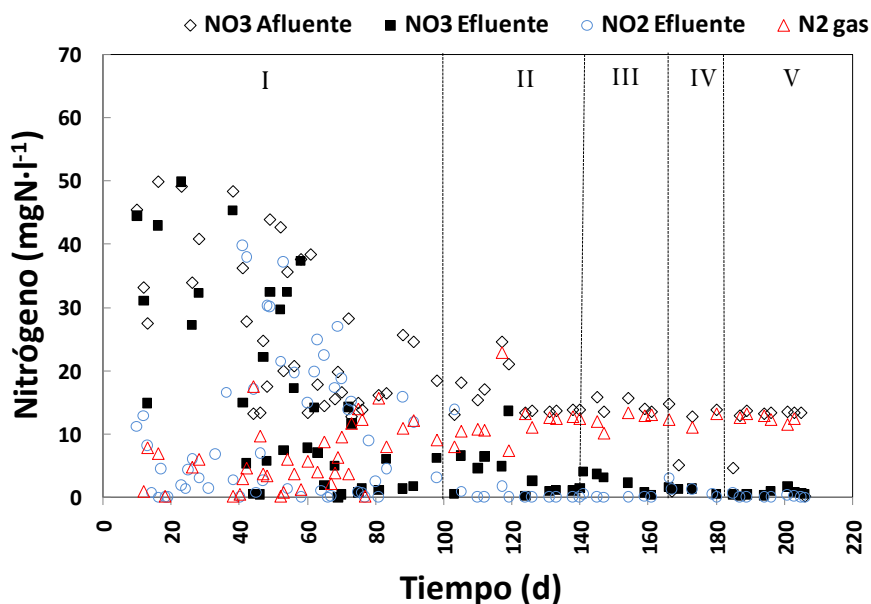


Figura 37. Evolución de la concentración de nitrato, nitrito y nitrógeno gas durante la operación del SBR durante el ciclo 2.

En las Tablas 11, 12, 13, 14 y 15 se presentan para todos los periodos las concentraciones promedio y la desviación estándar obtenidas a partir de los datos tomados al inicio y final del ciclo 2 de operación, de los 4 realizados diariamente en el reactor SBR, y que comprende desde las 9:00 h hasta las 15:00 h.

Periodo I

Durante el periodo I (Tabla 11) se observó una reducción promedio de nitrato en torno a $6,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, indicando que no todo el nitrato fue desnitrificado en este periodo. Durante este periodo, el grado de desnitrificación se situó en torno al 24,6%. La relación molar entre el nitrato y el sulfuro (N/S) al inicio del ciclo fue de 4,9 siendo este valor mayor al valor estequiométrico (N/S=1,6) que se obtiene a partir de la ecuación 7, descrita en el apartado 1.4.2.2. Tal y como se comentó en la introducción, algunos autores (Beristain *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2012) reportaron que cuando la relación molar N/S es mayor a la estequiométrica se presenta una oxidación total del sulfuro hasta sulfato y la acumulación de nitrito en el sistema. La ecuación 9 muestra que cuando la relación molar (N/S=4) se

forma sulfato y nitrito principalmente. En concordancia con lo mencionado en la bibliografía, en la primera parte del periodo I el nitrato no era totalmente reducido y se observaba en el sistema una acumulación de nitrato y nitrito (ver Figura 37).

Tabla 11. Concentraciones y porcentaje de desnitrificación durante el periodo I de operación del reactor SBR

Parámetro	Unidad	Periodo I			
		Inicio ciclo	δ	Final ciclo	δ
N-NH ₄	(mgN·l ⁻¹)	43,1	15,6	47,2	19,4
N-NO ₃	(mgN·l ⁻¹)	26,5	12,8	20,0	15,6
N-NO ₂	(mgN·l ⁻¹)	8,3	8,6	10,4	11,2
P-PO ₄	(mgP·l ⁻¹)	3,5	1,5	3,7	1,5
S-H ₂ S	(mgS·l ⁻¹)	12,3	4,3	0,3	0,4
S-SO ₄	(mgS·l ⁻¹)	72,1	11,9	84,8	13,1
AGV	(mgDQO·l ⁻¹)	13,1	9,4	11,3	9,9
CH ₄ disuelto	(mgDQO·l ⁻¹)	8,4	2,3	0,0	0,0
Eliminación NO₃	%	24,6			

* δ desviación estándar

La concentración media de nitrato que podría obtenerse al inicio de cada ciclo sería de aproximadamente 13 mg l⁻¹ si en el ciclo anterior todo el nitrato hubiera sido desnitrificado. En este periodo y, debido a que el nitrato no era eliminado por completo, éste se acumulaba en el reactor. A medida que el proceso se fue estabilizando, es decir, la actividad desnitrificante aumentó, se observó un descenso en la concentración de nitrato al inicio del ciclo, que alcanzó valores similares al valor teórico mencionado anteriormente.

El valor de la concentración de nitrito que se observa en la Tabla 11 corresponde con los formados en los ciclos anteriores y que no han sido desnitrificados. Es decir, una parte del nitrato reducido se acumula en forma de nitrito en el sistema, y otra parte se elimina presumiblemente en forma de nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno.

Respecto a la concentración de sulfuro al inicio y final del ciclo, se observa que éste se oxida casi en su totalidad. Al realizar el balance de los compuestos de azufre en el SBR durante el periodo, se determinó que casi todo el sulfuro presente fue oxidado hasta sulfato.

En la Tabla 11 también se puede observar como las concentraciones de amonio y fósforo permanecen casi constantes entre el inicio y final de ciclo durante todo el periodo, tendencia que se observará también en el resto de periodos.

Con respecto al metano disuelto presente al inicio del ciclo, se observó que este desaparecía durante el ciclo, probablemente por desabsorción o el consumo por parte de organismos capaces de utilizarlo como sustrato.

Periodo II

La información obtenida en el periodo II se muestra en la Tabla 12. Durante este periodo se observó una reducción promedio de nitrato entre el inicio y final de ciclo de $11,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, lo que llevó a un porcentaje de desnitrificación del 69,2%. La concentración de nitrito fue baja y no se observó acumulación del mismo en el sistema. Estos resultados indican un aumento de la actividad desnitrificante durante este periodo.

En este periodo la relación molar N/S al inicio del ciclo fue de 2,2, siendo este valor más bajo que en el periodo I y mayor al valor estequiométrico (N/S=1,6). Según Moraes *et al.* (2012) en presencia de nitrato, cuando la relación molar es ligeramente mayor al valor estequiométrico (1,6) se obtiene una oxidación completa del sulfuro hasta sulfato. Beristain *et al.* (2006) observó que para relaciones molares de 2,1 el nitrito puede formarse de forma temporal. En este caso, y en concordancia con la bibliografía, se observó una oxidación completa del sulfuro hasta sulfato y una leve acumulación de nitrito en el sistema.

Tabla 12. Concentraciones y porcentaje de desnitrificación durante el periodo II de operación del reactor SBR

Parámetro	Unidad	Periodo II			
		Inicio ciclo	δ	Final ciclo	δ
N-NH ₄	(mgN·l ⁻¹)	30,2	16,3	27,5	17,1
N-NO ₃	(mgN·l ⁻¹)	16,9	3,9	5,2	4,1
N-NO ₂	(mgN·l ⁻¹)	1,2	1,5	1,4	0,5
P-PO ₄	(mgP·l ⁻¹)	5,2	1,7	4,8	1,6
S-H ₂ S	(mgS·l ⁻¹)	17,4	6,8	0,0	0,0
S-SO ₄	(mgS·l ⁻¹)	97,3	12,5	113,7	7,5
AGV	(mgDQO·l ⁻¹)	9,5	3,4	2,0	2,5
CH ₄ disuelto	(mgDQO·l ⁻¹)	9,2	1,9	0,0	0,0
Eliminación NO₃	%		69,2		

* δ desviación estándar

En los datos experimentales que se presentan en la Tabla 12 se puede observar que el incremento de la concentración promedio de sulfato al final del ciclo se aproxima con la concentración promedio de sulfuro oxidado durante el ciclo. Esto indica que la mayor parte del sulfuro presente es oxidado a sulfato. No obstante, tal y como se observa en la Tabla 12, existe una pequeña pérdida de sulfuro que no es oxidado hasta sulfato. Esta desviación puede estar asociada al error experimental en la medida de ambos parámetros, a la oxidación parcial del sulfuro o a pérdidas por volatilización, a pesar de que el sistema estaba cerrado. En el caso de la concentración de fósforo y amonio, en este periodo se observa un leve descenso. La reducción observada de estos parámetros en algunos periodos se asocia con la utilización de estos compuestos como nutrientes por parte de los microorganismos.

Periodo III

La Tabla 13 muestra los resultados obtenidos en el periodo III. La reducción de nitrato durante este periodo fue de 12,6 mg l⁻¹ y el porcentaje de desnitrificación durante este periodo fue del 86,3%. Los resultados obtenidos

indican que la actividad de los organismos desnitrificantes aumentó y se mantuvo constante durante todo el periodo. Dicho aumento puede atribuirse al leve incremento de los AGV en el afluente que fueron consumidos casi en su totalidad durante el periodo. Este aumento contribuyó a que el porcentaje de desnitrificación aumentará en casi un 20% con respecto al periodo anterior, donde la concentración de AGV fue baja. En el periodo III la relación molar N/S fue de 1,9 siendo esta valor cercano al valor estequiométrico (N/S=1,6). En este caso no se observó acumulación de nitrito y prácticamente todo el nitrato fue desnitrificado y el sulfuro oxidado a sulfato. Según Moraes *et al.* 2012 y Beristain *et al.* 2006 cuando la relación molar es igual o cercana al valor estequiométrico todo el sulfuro es oxidado a sulfato y el nitrato reducido a nitrógeno gas.

Tabla 13. Concentraciones y porcentaje de desnitrificación durante el periodo III de operación del reactor SBR

Parámetro	Unidad	Periodo III			
		Inicio ciclo	δ	Final ciclo	δ
N-NH ₄	(mgN·l ⁻¹)	48,7	15,7	45,5	17,6
N-NO ₃	(mgN·l ⁻¹)	13,9	1,0	2,0	1,3
N-NO ₂	(mgN·l ⁻¹)	0,4	0,9	0,6	1,3
P-PO ₄	(mgP·l ⁻¹)	6,9	1,5	6,5	1,5
S-H ₂ S	(mgS·l ⁻¹)	16,3	8,2	0,0	0,0
S-SO ₄	(mgS·l ⁻¹)	76,7	11,1	86,7	13,6
AGV	(mgDQO·l ⁻¹)	18,0	7,8	2,0	2,1
CH ₄ disuelto	(mgDQO·l ⁻¹)	12,8	3,4	0,0	0,0
Eliminación NO₃	%		86,3		

* δ desviación estándar

El balance de los compuestos de azufre en el periodo III permitió determinar que la mayor parte del sulfuro es oxidado durante el ciclo hasta sulfato. Tal y como se mencionó anteriormente, las diferencias obtenidas pueden deberse a pérdidas por volatilización, oxidación parcial del sulfuro o error en la medida. Con respecto a lo mencionado anteriormente, durante el seguimiento del proceso se observó que el aspecto del fango se tornaba

blanquecino y en las paredes del reactor se acumulaban pequeños gránulos blancos, lo que apuntaría a la formación y acumulación de pequeñas cantidades de azufre elemental siendo este uno de los compuestos intermedios en la oxidación del sulfuro (Sierra-Alvarez *et al.*, 2007).

Anteriormente se ha puesto de manifiesto que el metano disuelto desaparece durante el ciclo. Este comportamiento también se observa en el periodo III, pero, en este caso, es de resaltar debido a la mayor concentración de este compuesto al inicio del ciclo. Este descenso en la concentración de metano puede deberse a la desabsorción del metano en el sistema o al consumo del mismo por organismos capaces de utilizar el metano como sustrato.

Periodo IV

Los resultados obtenidos en el periodo IV se presentan en la Tabla 14. La eliminación de nitrato fue casi total sin observarse acumulación de nitrito en el sistema, logrando un grado de desnitrificación del 90,5%. En este periodo la relación molar N/S fue de 2,6 siendo este valor superior al valor estequiométrico. Según Mahmood *et al.* 2007 para relaciones molares N/S de 2,7 en la oxidación del sulfuro se forma inicialmente azufre elemental y posteriormente sulfato. Beristain *et al.* 2006 observó una oxidación completa del sulfuro hasta sulfato y una baja acumulación de nitrito. En este caso el sulfuro presente fue oxidado a sulfato y el nitrato desnitrificado casi por completo, sin acumulación de nitrito en reactor.

Durante este periodo hacia el día 165, se presentaron dos fallos operacionales que dejaron al sistema sin alimento durante 4 ciclos seguidos y que además ocasionaron una pérdida de sólidos en el reactor SBR. Estos hechos provocaron inestabilidad en el proceso y una acumulación puntual de nitrato en el reactor, provocando una disminución del porcentaje de desnitrificación. Sin embargo, en este periodo no se observó acumulación de

nitrito. A pesar de esto, el sistema se recuperó rápidamente y la desnitrificación se estabilizó nuevamente.

Tabla 14. Concentraciones y porcentaje de desnitrificación durante el periodo IV de operación del reactor SBR

Parámetro	Unidad	Periodo IV			
		Inicio ciclo	δ	Final ciclo	δ
N-NH ₄	(mgN·l ⁻¹)	34,4	20,4	35,2	20,3
N-NO ₃	(mgN·l ⁻¹)	14,6	1,0	1,3	0,6
N-NO ₂	(mgN·l ⁻¹)	0,3	0,5	0,5	0,6
P-PO ₄	(mgP·l ⁻¹)	5,8	4,4	5,1	4,4
S-H ₂ S	(mgS·l ⁻¹)	15,2	18,0	0,0	0,0
S-SO ₄	(mgS·l ⁻¹)	66,7	15,7	71,6	19,7
AGV	(mgDQO·l ⁻¹)	61,2	38,8	37,2	14,2
CH ₄ disuelto	(mgDQO·l ⁻¹)	1,54	0,3	0,0	0,0
Eliminación NO₃	%		90,5		

* δ desviación estándar

El aumento en la concentración de sulfato que se observa en el periodo IV al final del ciclo muestra, al igual que en los periodos anteriores, que la mayor parte del sulfuro presente es oxidado hasta sulfato durante el ciclo. Con respecto a la concentración de amonio y fosfato, al igual que en los periodos anteriores, no se observan variaciones importantes.

La concentración de metano disuelto en el periodo IV fue baja debido a un fallo operacional en el reactor SAnMBR, que ocasionó un aumento de la concentración de AGV en el afluente que alcanzó de forma puntual valores de 310 mg CH₃COOH l⁻¹ y una disminución del metano disuelto en el afluente tratado en el reactor SBR.

Periodo V

En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos en el periodo V. Se observa una reducción promedio en la concentración de nitrato en torno a 12,6 mg l⁻¹. El grado de desnitrificación alcanzado en este periodo fue del

94,2%. En este periodo, al igual que en el periodo IV, el nitrito no fue detectado. La relación molar N/S en este periodo fue de 4,1, similar al periodo I, observándose una oxidación completa del sulfuro presente hasta sulfato y la no acumulación de nitrito.

La concentración de sulfuro al inicio del ciclo durante el periodo V fue inferior al valor típico observado en los periodos anteriores. Este hecho concuerda con el aumento en la concentración promedio de sulfato al inicio del ciclo y puede achacarse a una mayor oxidación del sulfuro antes de ser alimentado al SBR o a una menor reducción de sulfato en el reactor SAnMBR debido a algún fallo operacional en este reactor.

En este periodo también se observó un aumento en la concentración de sulfato al final del ciclo ocasionado por la oxidación del sulfuro presente al inicio del ciclo. En la Tabla 15 se observa un descenso de la concentración de sulfuro durante el ciclo que concuerda con el aumento del sulfato observado durante el ciclo. La concentración de amonio y fosfato permaneció casi constante durante el periodo, es decir no se observaron variaciones importantes. En cuanto al metano disuelto también se observa en este periodo un consumo total del mismo.

Tabla 15. Concentraciones y grado de desnitrificación durante el periodo V de operación del reactor SBR

Parámetro	Unidad	Periodo V			
		Inicio ciclo	δ	Final ciclo	δ
N-NH ₄	(mgN·l ⁻¹)	53,3	3,7	52,2	3,3
N-NO ₃	(mgN·l ⁻¹)	13,3	0,2	0,7	0,5
N-NO ₂	(mgN·l ⁻¹)	0,0	0,0	0,0	0,1
P-PO ₄	(mgP·l ⁻¹)	7,1	1,9	6,7	2,2
S-H ₂ S	(mgS·l ⁻¹)	7,3	2,3	0,0	0,0
S-SO ₄	(mgS·l ⁻¹)	101,9	34,1	106,6	32,2
AGV	(mgDQO·l ⁻¹)	38,9	15,3	11,9	20,2
CH ₄ disuelto	(mgDQO·l ⁻¹)	4,4	1,5	0,0	0,0
Eliminación NO ₃	%	94,2			

* δ desviación estándar

En general los resultados obtenidos en el reactor SBR muestran que la relación molar N/S influye notablemente sobre los productos formados en la oxidación del sulfuro y la reducción del nitrato. En este caso la relación molar en todos los periodos varió entre 1,9 y 4,9. Como se ha comentado anteriormente en cada periodo, en la bibliografía se menciona (Beristain *et al.*, 2006; Mahmood *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2012) que para relaciones molares mayores al valor estequiométrico (1,6) se obtiene principalmente sulfato y nitrito. Para valores cercanos al estequiométrico el sulfuro es oxidado a sulfato y el nitrato reducido a nitrógeno gas, sin observarse acumulación de nitrito.

Según la bibliografía para las relaciones molares (N/S) obtenidas en los periodos estudiados en el reactor SBR, se esperaría una acumulación de nitrito, excepto en el periodo III donde la relación (N/S) es cercana al valor estequiométrico. Sin embargo, esta acumulación solo se observó en los periodos I y II. Para los periodos IV y V el nitrito no se acumuló debido principalmente al aumento de los AGV en estos periodos, es decir, en estos periodos existe un consumo simultáneo de los dadores de electrones presentes (sulfuro, ácidos grasos volátiles y metano disuelto) que favorecen la conversión del nitrato a nitrógeno gas. En este caso la presencia de nitrito en el sistema no depende únicamente de la relación molar N/S.

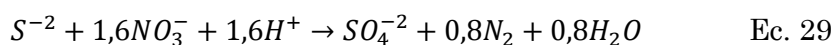
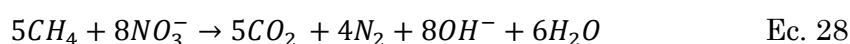
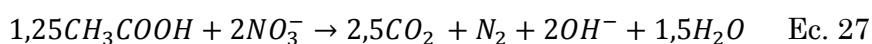
4.1.2 Influencia de la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), sulfuro y metano disuelto en la desnitrificación.

El estudio de la influencia de la concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto sobre el proceso de desnitrificación se realizó mediante el balance de DQO en el sistema. Para ello se calculó, mediante la ecuación 26, la DQO disponible en el afluente, es decir, la DQO asociada a los AGV, sulfuro y metano disuelto.

$$DQO \text{ disponible afluyente: } S_F + S_I + S_A + DQO_{S^{2-}} + DQO_{CH_4} + DQO_{H_2} \quad \text{Ec. 26}$$

Donde, S_F representa la fracción soluble fácilmente fermentable, S_I la fracción inerte y S_A corresponde con los AGV presentes. En este caso se asumió que la concentración de AGV corresponde en su mayoría a ácido acético y que la S_F se considera despreciable ya que corresponde en su mayoría a biopolímeros que se absorben en el interior de la membrana (Giménez, 2014). Tal y como se mencionó en el apartado 3.2.1, el afluente utilizado en este estudio está libre de sólidos ya que proviene de un reactor de membranas, siendo la DQO del afluente totalmente soluble.

Las ecuaciones 27, 28 y 29 describen las reacciones estequiométricas de la reducción de nitrato a nitrógeno gas en presencia de AGV, metano disuelto y sulfuro. Con estas ecuaciones es posible calcular la DQO requerida, es decir, la necesaria para desnitrificar todo el nitrato presente al inicio de ciclo en cada periodo. Esta DQO puede calcularse de forma independiente si sólo se utilizara alguno de los dadores de electrones presentes en el afluente (ácido acético, metano disuelto o sulfuro).



En la Tabla 16 se pueden observar el potencial de desnitrificación de los dadores presentes en el afluente, y que corresponde con los valores medios y la desviación estándar de las concentraciones de los dadores de electrones presentes al inicio de cada periodo (AGV, sulfuro y metano disuelto). También, se muestra el porcentaje de desnitrificación obtenido en cada periodo y la DQO requerida. El potencial de desnitrificación representa la capacidad máxima que se tiene en cada periodo, para desnitrificar todos los nitratos presentes a partir de la concentración de AGV, sulfuro y metano

disuelto al inicio del ciclo. Al comparar la concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto con la DQO requerida, se puede observar que en todos los periodos excepto el periodo I, la DQO presente al inicio de cada periodo es mayor que la DQO requerida. Por tanto, podrían desnitrificarse todos los nitratos presentes al inicio de cada periodo empleando los AGV, sulfuro y metano disuelto.

Para la determinación de la DQO asociada a la concentración de AGV, y asumiendo que estos están compuestos únicamente por ácido acético (CH_3COOH), se asume una oxidación estequiométrica donde son necesarios $1,067 \text{ mgO}_2 \cdot \text{mgCH}_3\text{COOH}$. Para los sulfuros disueltos se asume que es completamente oxidado hasta sulfato, de tal forma que estequiométricamente serán necesarios $2 \text{ mg de O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{S}^{2-}$. De igual forma, la DQO asociada al metano disuelto puede calcularse estequiométricamente, siendo necesarios $4 \text{ mg O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{CH}_4$. De acuerdo a estas reacciones se consumen $2,86 \text{ mg DQO}$ para reducir 1 mg de N-NO_3 .

Tabla 16. Potencial de desnitrificación de los dadores presentes al inicio de cada periodo, DQO requerida y porcentaje de desnitrificación.

Periodo	%Desn	AGV		S^{2-}		CH_4		DQO requerida (mg DQO·l ⁻¹)
		(mg DQO·l ⁻¹)	δ	(mg DQO·l ⁻¹)	δ	(mg DQO·l ⁻¹)	δ	
I	24,6	13,1	9,4	24,6	8,6	8,4	2,3	75,7
II	69,2	9,5	3,4	34,8	13,6	9,2	1,9	48,3
III	86,3	18,0	7,8	32,6	16,4	12,8	3,4	39,7
IV	90,5	61,2	38,8	30,4	6,0	1,5	0,3	41,7
V	94,2	38,9	15,3	14,6	4,6	4,4	1,5	38,0

%Desnit (Desnitrificación), *δ desviación estándar

En el caso de la DQO requerida en cada periodo, se puede observar que, los AGV presentes al inicio de los periodos I, II y III no serían suficientes para desnitrificar todos los nitratos presentes al inicio del ciclo, siendo necesario el aporte extra de DQO por parte de otros dadores de electrones presentes en el afluente, tales como el sulfuro o el metano disuelto. Para el caso de los

periodos IV y V con la concentración de AGV presentes podría desnitrificarse todo el nitrato presente al inicio del ciclo.

La Tabla 17 muestra la DQO degradada en cada periodo en forma de AGV, metano disuelto y sulfuro, la DQO requerida y la DQO demandada. La DQO demandada corresponde con la DQO necesaria para la desnitrificación de los nitratos eliminados en cada periodo. Las concentraciones de AGV, sulfuro y metano disuelto que se muestran en la tabla corresponde con la DQO que fue degradada de cada uno de estos dadores de electrones en cada periodo.

Tabla 17. DQO degradada (AGV, S²⁻, CH₄), DQO requerida y DQO demandada en cada periodo.

Periodo	%Desn	AGV (mg DQO·l ⁻¹)	CH ₄ (mg DQO·l ⁻¹)	S ²⁻ (mg DQO·l ⁻¹)	DQO requerida (mg DQO·l ⁻¹)	DQO demandada (mg DQO·l ⁻¹)
I	24,6	1,8	8,4	24,0	75,7	18,5
II	69,2	7,5	9,2	34,8	48,3	33,4
III	86,3	16,0	12,8	32,6	39,7	34,0
IV	90,5	23,8	1,5	30,4	41,7	38,0
V	94,2	27,0	4,4	14,6	38,0	36,0

*DQO requerida. %Desnit (Desnitrificación)

En la Tabla 17 se observa que la DQO en forma de AGV es menor que la DQO demandada en cada periodo, es decir con los AGV degradados no sería posible desnitrificar los nitratos eliminados realmente. Tal y como se ha comentado anteriormente, es posible que en cada periodo el consumo de AGV, sulfuro y metano disuelto sucediera de forma simultánea, favoreciendo la desnitrificación. Este hecho no permite calcular el aporte exacto de DQO en cada periodo por parte de los compuestos mencionados anteriormente.

En general, si las condiciones de operación tales como TRH y alcalinidad son favorables para el desarrollo de los organismos desnitrificantes y toda la DQO degradada fuera utilizada en la desnitrificación (Tabla 17), todo el nitrato presente al inicio de los periodos II, III, IV y V podría ser desnitrificado. Sin embargo, esto no se observó, la DQO demandada es

menor que la degradada en todos los periodos. En los periodos I y II el porcentaje de desnitrificación fue más bajo que en el resto de periodos. Esto puede ser debido a la menor concentración de AGV en estos dos periodos y porque los organismos capaces de utilizar el sulfuro o el metano disuelto no estaban totalmente establecidos en el sistema, como para desnitrificar todo el nitrato usando estos dadores de electrones. En el caso del sulfuro, la DQO asociada a este compuesto en los periodos I, y II, es suficiente como para desnitrificar todo el nitrato eliminado.

Para determinar el efecto que tiene la variabilidad de la concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto presentes en el afluente sobre el porcentaje de desnitrificación, se calculará la cantidad de nitrato que podría eliminarse a partir de la DQO degradada en cada periodo, en forma de AGV, sulfuro y metano disuelto.

La Tabla 18 presenta el nitrato teórico que podría eliminarse a partir de la DQO degradada de cada uno de los dadores de electrones y el nitrato eliminado experimentalmente en cada periodo. Tal y como se explicó al inicio de este apartado, en el caso de los AGV son necesarios 2,67 mg CH_3COOH (2,86 mg DQO) para reducir 1 mg N-NO_3 . En el caso del sulfuro, se requieren 1,42 mg S-S^{2-} (2,86 mg DQO) para desnitrificar 1 mg N-NO_3 . Por último, para el metano disuelto se requieren 0,71 mg CH_4 (2,86 mg DQO) para desnitrificar 1,0 mg N-NO_3 de nitrato.

Tabla 18. N-NO_3 teórico que podría eliminarse a partir de AGV, sulfuro y metano disuelto eliminado en cada periodo y N-NO_3 eliminado experimentalmente.

Periodo	AGV (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO_3 teórico (mgN·l ⁻¹)	S^{2-} (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO_3 teórico (mgN·l ⁻¹)	CH_4 (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO_3 teórico (mgN·l ⁻¹)	N-NO_3 Eliminado (mgN·l ⁻¹)
I	1,8	0,6	24,6	8,6	8,4	2,9	6,5
II	7,5	2,6	34,8	12,2	9,2	3,2	11,7
III	16,0	5,6	32,6	11,4	12,8	4,5	12,6
IV	23,8	8,3	30,4	10,6	1,5	0,5	9,6
V	27,0	9,4	14,6	5,1	4,4	1,5	12,6

En la Tabla 18 se observa que, en ningún periodo, la concentración de AGV eliminada sería suficiente para desnitrificar todos los nitratos realmente eliminados ($N-NO_3$ eliminado), siendo en los periodos I y II donde existe una menor disponibilidad de AGV, de hecho fue en estos periodos donde se obtuvo un menor grado de desnitrificación.

Tal y como menciona Reyes-Avila *et al.* (2004) es posible llevar a cabo el proceso de desnitrificación empleando varios dadores de electrones y potenciar la desnitrificación. En este estudio, el aporte de varios dadores de electrones pudo ocurrir de forma simultánea pero no se determinó el aporte de cada uno de ellos en el proceso de desnitrificación. Sin embargo, en el seguimiento microbiológico realizado y que se presenta al final de este capítulo se observó la presencia y el crecimiento de organismos capaces de utilizar otros compuestos tales como el metano disuelto. Con respecto a los organismos responsables de la oxidación del sulfuro, se hibridaron dos especies *Thiobacillus desnitrificantes* y *Thiomicrospira desnitrificantes* pero no fueron detectadas. Según Chen *et al.* (2008) existen diversas especies capaces de utilizar el sulfuro como sustrato dentro de las que se encuentran los organismos *Sulfurovum sp* y *Paracoccus*.

En general, la concentración de AGV en este proceso es determinante y presenta gran influencia sobre el rendimiento del proceso. Tal y como se observa en la Tabla 17, los porcentajes de desnitrificación fueron mayores en los periodos en los que existió un mayor consumo de AGV. Sin embargo, la participación de otros compuestos puede estar ocurriendo de forma simultánea y representar un aporte importante.

Esta circunstancia obliga a realizar un análisis más detallado de la participación del sulfuro y el metano disuelto, centrándose en los rendimientos obtenidos en cada periodo. En el caso del metano disuelto, la Tabla 18 muestra que con la concentración disponible de este compuesto no es posible desnitrificar todo el nitrato eliminado. En este estudio el metano

presente no representa una cantidad importante, pero en términos generales puede contribuir en el grado de desnitrificación obtenido, logrando eliminar hasta un 35% del nitrato eliminado, en el caso del periodo III.

Tal y como se ha comentado en la introducción, la oxidación de metano es uno de los procesos más interesantes debido a que no existe un único mecanismo de acoplamiento a la desnitrificación. Ettwig *et al.* 2010 y Wu, 2012 sugieren que, en condiciones anóxicas, el consumo de metano es llevado a cabo principalmente por organismos metanotróficos tipo I y II, capaces de producir compuestos orgánicos fácilmente biodegradables que luego son usados en la desnitrificación por bacterias desnitrificantes.

En la Tabla 18 se puede observar que una parte importante del nitrato podría ser desnitrificado mediante la vía del sulfuro. En la bibliografía existen estudios (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2014) que señalan la posibilidad de realizar el proceso de desnitrificación a partir de sulfuro. Dado que la concentración de sulfuro en el afluente es alta, teóricamente en este reactor en los periodos I, II y IV con el sulfuro eliminado podría desnitrificarse todo el nitrato eliminado. En el caso de los periodos III y V la concentración de sulfuro eliminada no es suficiente siendo necesaria la participación de otros dadores de electrones.

Según lo observado durante el seguimiento del reactor SBR y en concordancia con el ciclo biogeoquímico del azufre que se muestra en el apartado 1.1.3, es posible que una parte importante del sulfuro sea oxidado químicamente en presencia de oxígeno hasta sulfato o compuestos intermedios como el azufre, y otra parte sea oxidado biológicamente con oxígeno o nitrato hasta sulfato. A pesar de que el reactor SBR operaba en condiciones anóxicas, durante la etapa de llenado el oxígeno aumentaba levemente y podría estar oxidando parte del sulfuro presente en el alimento que no estaría disponible para la desnitrificación.

Tal y como se comentó en el apartado 1.4.2.2 algunos estudios mencionan que la oxidación del sulfuro hasta sulfato es llevada a cabo por organismos autótrofos capaces de usar el nitrato como aceptor de electrones y oxidar el sulfuro a sulfato.

Según Márquez *et al.* (2010) y Bejarano (2010), existen diversos organismos capaces de transformar el sulfuro a sulfato en diversas condiciones: (1) anóxicas, en presencia de organismos de los géneros *Thiobacillus*, *Paracoccus* y *Thiospharea* (Kuenen *et al.*, 1981); (2) facultativas, metabolizados por organismos fototróficos de los géneros *Clorobioaceae* y *Chromaticeae*; y (3) aerobias, en presencia de organismos sulfuro oxidantes de los géneros *Beggiatoa*, *Thiosphera* y *Sulfolobus*. El sulfuro que no es oxidado a sulfato por organismos en condiciones anóxicas, facultativas o aerobias, podría ser oxidado químicamente en presencia de oxígeno.

Estos procesos biológicos de oxidación de sulfuro a sulfato son en ocasiones hasta 100 veces más rápidos que los procesos químicos (Lens y Kuenen, 2001).

La Tabla 19 muestra la concentración media de sulfuro y sulfato en cada periodo, al inicio y final de cada ciclo. En general se observa que el sulfuro presente al inicio de ciclo es oxidado a sulfato. En el caso del sulfuro no se determinó el porcentaje de contribución de este compuesto en la desnitrificación, debido a que este era consumido de forma simultánea con los AGV y el metano disuelto. Sin embargo, la concentración de sulfuro al inicio del ciclo representa un aporte importante de DQO. En este caso, y como se ha mencionado anteriormente, en los periodos I, II y IV sería posible desnitrificar todo el nitrato eliminado empleando sólo el sulfuro degradado en estos periodos. Durante el seguimiento del reactor SBR en cada periodo se observó que en su mayoría todos los sulfuros presentes al inicio del ciclo eran oxidados hasta sulfatos al final del ciclo.

Tabla 19. Concentración de sulfuro y sulfato en cada periodo de operación del reactor SBR.

Periodo	Inicio ciclo			Final ciclo		
	S^{2-} (mg S·l ⁻¹)	δ	SO_4 (mgS·l ⁻¹)	δ	SO_4 (mgS·l ⁻¹)	δ
I	12,3	4,3	72,1	11,9	84,8	13,1
II	17,4	6,8	97,3	12,5	113,7	7,5
III	16,3	8,2	76,7	11,1	86,7	13,6
IV	12,7	18,0	66,7	15,7	71,6	19,7
V	7,3	2,3	101,9	34,1	106,6	32,2

* δ desviación estándar

Una de las explicaciones al hecho de que una parte del sulfuro no se oxidara hasta sulfato es la posibilidad de que este formara parcialmente compuestos intermedios como el tiosulfato o el azufre elemental no medidos experimentalmente. En concordancia con esto, durante la operación del reactor se observó la formación de un precipitado de color amarillo, que podría estar relacionado con la presencia de azufre. La Figura 38 muestra una fotografía del reactor SBR en un periodo donde sufrió un cambio significativo de color, apreciándose el color blanco amarillento del fango presente, este fenómeno puede atribuirse a la formación de azufre elemental.



Figura 38. Fotografía del reactor SBR, presencia de azufre elemental.

Algunos de los organismos mencionados anteriormente son capaces de oxidar el sulfuro a azufre elemental y almacenarlo en el interior de la célula, siendo un aspecto apreciable al microscopio y generando cambios en el aspecto del fango. Parte del azufre formado puede ser hidrofóbico, pudiendo explicar este hecho los cambios en el color del reactor. Durante la operación del sistema se observó que el fango tenía un aspecto esponjoso que dificultaba la decantación de la biomasa.

Con el fin de estudiar los fenómenos físicos observados anteriormente y la posible oxidación química del sulfuro en condiciones aerobias y anóxicas sin presencia de organismos se llevaron a cabo dos experimentos en laboratorio:

- En el primero, se estudió la oxidación química de sulfuro en presencia de oxígeno, utilizando el efluente del SAnMBR y un efluente sintético con una concentración de sulfuro similar a la del efluente del SAnMBR (100 mg l^{-1}).
- En el segundo, se estudió la oxidación química del sulfuro en condiciones anóxicas, con una concentración aproximada de nitrato de $100 \text{ mgN-NO}_3 \text{ l}^{-1}$. Para ello se utilizó el efluente SAnMBR y un efluente sintético con una concentración de sulfuro similar a la del efluente SAnMBR (100 mgS l^{-1}).

El efluente sintético se preparó con un patrón de sulfuro de sodio nanohidrato ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) con una concentración aproximada de 1000 mg l^{-1} . Para obtener la concentración de nitrato en el segundo ensayo se utilizó un patrón estándar de nitrato de sodio (NaNO_3) de 1000 mg l^{-1} . Los experimentos fueron realizados en 2 erlenmeyer de 250ml, garantizando un medio libre de organismos. Los erlenmeyer se mantuvieron agitados mediante agitadores de imán y tapados con film para evitar la reaireación superficial.

En el primer grupo de experimentos la concentración inicial de oxígeno disuelto en el Erlenmeyer con efluente SAnMBR fue de 0,5 mg · l⁻¹ y con el efluente sintético fue de 1,0 mg · l⁻¹. El pH de ambos erlenmeyer se ajustó entre 7 y 8. Durante el experimento se realizó el seguimiento de la concentración de sulfuro, sulfato y de los cambios físicos observados en ambos erlenmeyer.

También se realizó el balance de azufre en el sistema con el fin de estimar la cantidad de compuestos intermedios formados. Los resultados obtenidos al cabo de 24 h se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Experimento de oxidación de sulfuro a sulfato en condiciones aerobias.

	Inicio ensayo		Final ensayo		
	S ²⁻ (mg S l ⁻¹)	SO ₄ (mg S l ⁻¹)	S ²⁻ (mg S l ⁻¹)	SO ₄ (mg S l ⁻¹)	Azufre* (mg S l ⁻¹)
Efluente SAnMBR	92,3	5,4	35,1	21,9	40,7
Efluente SAnMBR	103,1	0,78	52,3	31,6	19,9
Efluente sintético	99,4	1,5	33,6	6,9	60,4
Efluente sintético	98,8	1,2	45,7	32,5	21,8

Azufre*: Compuestos intermedios de azufre calculados por balance que no fueron oxidados hasta sulfato.

Los experimentos permitieron determinar que una parte de los sulfuros presentes fueron oxidados a sulfatos, una parte se pierde por volatilización y otra parte forma compuestos intermedios de azufre tales como tiosulfato o sulfito incluidos en el balance de azufre y que no fueron medidos durante el ensayo. Según Janssen *et al.* 1997, el oxígeno es el parámetro que determina el producto final de la oxidación del sulfuro, de tal manera que bajo condiciones limitadas de oxígeno (<0,1 mg · l⁻¹) el azufre elemental es el producto final de la oxidación.

El segundo grupo de experimentos se realizó en condiciones anóxicas. La concentración de oxígeno disuelto se ajustó a valores inferiores a 0,1 mg · l⁻¹ previo burbujeo de las muestras con nitrógeno. El pH se ajustó a valores entre 7 y 8. Los resultados (Tabla 21) muestran que en condiciones anóxicas,

y en ausencia de organismos, el nitrato no es reducido. Sin embargo, según los resultados obtenidos es posible que, debido a la reairección del sistema, parte del sulfuro se volatilizara y/o oxidara a sulfato y compuestos intermedios. La relación molar N/S en este grupo de experimentos fue de 2,5 aproximadamente en ambos casos. Según la bibliografía, para esta relación molar en presencia de organismos todo el sulfuro es oxidado a sulfato.

Tabla 21. Experimento de oxidación de sulfuro a sulfato en condiciones anóxicas.

	Inicio ensayo			Final ensayo			
	S ²⁻	SO ₄	NO ₃	S ²⁻	SO ₄	Azufre*	NO ₃
	(mg S l ⁻¹)	(mg S l ⁻¹)	(mg N l ⁻¹)	(mg S l ⁻¹)	(mg S l ⁻¹)	(mg S l ⁻¹)	(mg N l ⁻¹)
Efluente SAnMBR	98,6	1,3	108,9	58,4	32,7	7,5	112,3
Efluente Sintético	94,1	2,3	97,4	52,6	25,2	16,3	102,6

Azufre*: Compuestos intermedios de azufre calculados por balance que no fueron oxidados hasta sulfato.

La Figura 39 muestra los cambios físicos en cada uno de los erlenmeyer. Se observaron en ambos ensayos cambios de color especialmente en los que contenían el efluente SAnMBR. Inicialmente se observó un cambio de color blanco transparente a amarillo. El color amarillo es característico de la presencia de azufre elemental.

En los ensayos realizados se observó que los cambios físicos ocurren con mayor rapidez en los erlenmeyer con el efluente SAnMBR, debido principalmente a la composición de la misma matriz del agua que favorece la oxidación del sulfuro. En ambos experimentos, y según los resultados obtenidos, el sulfuro se oxida hasta sulfato, una parte se pierde por volatilización y otra parte forma compuestos intermedios tales como el tiosulfato, sulfito o azufre elemental no medidos en estos experimentos. Una conclusión inmediata de estos experimentos es que la vía química no permite la reducción del nitrato en presencia de sulfuro. En ambos casos la volatilización y la oxidación del sulfuro en presencia de oxígeno es posible.

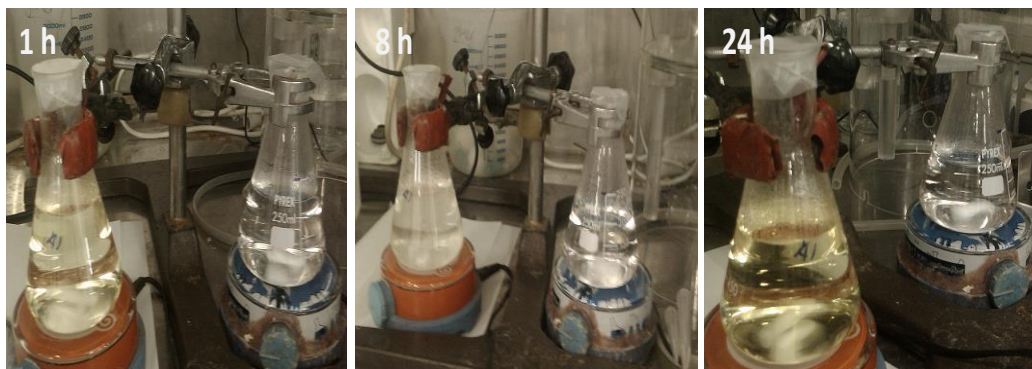


Figura 39. Oxidación química del sulfuro durante 24 h para dos efluentes. Izq (Erlenmeyer con efluente SAnMBR), Dcha (Erlenmeyer con efluente sintético).

4.1.3 Análisis microbiológico.

Con el fin de contrastar los resultados obtenidos en el reactor SBR se realizó en cada periodo el seguimiento microbiológico de las distintas especies involucradas en el proceso de desnitrificación. Para ello se empleó la técnica FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) y la técnica de viabilidad descrita en el apartado de materiales y métodos. Las sondas empleadas en este capítulo se presentan en la Tabla 22.

En el inóculo, el porcentaje de organismos heterótrofos viables fue del 93% y la abundancia de organismos heterótrofos desnitrificantes respecto al total de bacterias hibridadas con la sonda EUBmix fue del $13 \pm 2\%$, que corresponde a los organismos hibridados con las sondas específicas DEN67, PAR651 y AT1458. La abundancia de estos organismos fue de un $4 \pm 2\%$ (DEN67), $1 \pm 1\%$ (PAR651) y $8 \pm 1\%$ (AT1458), respectivamente. Se puede observar que de las tres especies mencionadas, la que presenta mayor abundancia corresponde con la especie hibridada con la Sonda AT1458 que identifica a los organismos *Azoarcus*, *Thaurea* y *Castellaniella*. Según Thompsen *et al.* 2007, los organismos desnitrificantes que se encuentran en mayor abundancia en los sistemas de fangos activados corresponden con las bacterias *Thaurea* y *Azoarcus*. Este tipo de organismos consumen una gama amplia de ácidos grasos volátiles como fuente de carbono (Morgan-Sagastume *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2014).

La abundancia de los organismos metanotróficos tipo I hibridados con la sonda Mg84 fue de $1\pm 1\%$, mientras que los de tipo II no se detectaron en el inóculo. Los organismos metanotróficos son de gran interés en este estudio ya que son capaces de llevar a cabo el proceso de desnitrificación utilizando el metano disuelto como sustrato.

Otra especie que fue detectada en el inóculo fueron los organismos sulfatorreductores hibridados con la sonda SRB385db, con una abundancia del $3\pm 1\%$.

Tabla 22. Sondas específicas empleadas en la técnica FISH.

Sonda	Secuencia	%F	Organismos
Eubmix	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	0-50	Dominio bacteria Planctomycetales y Verrucomicrobiales
Ma 464	TTA-TCC-AGG-TAC-CGT-CAT-TA	20	Tipo II Methylocistaceae
Mg 84	CCA-CTC-GTC-AGC-GCC-CGA	20	Tipo I Methylococcaceae
DEN 67	CAA-GCA-CCC-GCG-CGT-CCG	35	Organismos capaces de utilizar metanol, Cluster desnitrificantes
PAR 651	ACC-TCT-CTC-GAA-CTC-CAG	40	Genus paracocus
AT1458	GAA-TCT-CAC-CGT-GGT-AAG-CGC	50	Azoarcus-Thauera-Castellaniella
TMD131	TCC-CAG-TCT-TTG-AGG-TAC	35	Thiomicrospira denitrificans
TBD1419	CGG-TAC-GTT-CCG-ACG	35	Thiobacillus desnitrificants
SRB385DB	CGG-CGT-TGC-TGC-GTC-AGG	30	Desulfobacteracea

*%F porcentaje de formamida

Teniendo en cuenta que una parte importante del estudio pretende identificar los organismos capaces de utilizar el sulfuro como sustrato, se hibridaron con la sonda TMDB131 los organismos *Thiomicrospira* desnitrificantes y con la sonda TDB1419 los organismos *Thiobacillus* desnitrificantes, pero no fueron detectados en el inóculo ni en el sistema durante el seguimiento del proceso.

La Tabla 23 muestra la abundancia de los organismos presentes en el reactor SBR en cada periodo, en todos los periodos el porcentaje de organismos viables fue superior al 90%, observándose que la especie más abundante en todos los periodos corresponde con los organismos heterótrofos desnitrificantes hibridados con la sonda AT1458. Como se mencionó anteriormente, este tipo de organismos son los responsables del consumo de los ácidos grasos volátiles. La Figura 40 muestra una microfotografía de los organismos desnitrificantes presentes en mayor abundancia en el reactor.

Tabla 23. Abundancia de organismos desnitrificantes, metanotróficos y sulfatorreductores presentes en el reactor SBR en cada periodo.

Abundancia %								
Periodo	Desnitrificantes	δ	Metanotróficas tipoI	δ	Metanotróficas tipoII	δ	Sulfato reductoras	δ
I	11,0	1,0	1,0	1,0	ND	-	5,0	1,0
II	26,0	3,0	5,0	1,0	ND	-	2,0	1,0
III	30,0	7,0	8,0	2,0	1,0	1,0	6,0	1,0
IV	24,0	5,0	3,0	1,0	2,0	1,0	7,0	1,0
V	26,0	4,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

* δ desviación estándar

Durante el estudio, también se observó la presencia y el crecimiento de los organismos metanotróficos tipo I hibridados con la sonda Mg84, que crecen a bajas concentraciones de metano disuelto. Esto sugiere que durante el estudio se presentó un aprovechamiento como sustrato del metano disuelto presente en el afluente. Tal y como se observa en la Tabla 23 la abundancia de los organismos metanotróficos concuerda con la concentración de metano en cada periodo. Es decir, en los periodos I, II y III se observa un mayor porcentaje de estos organismos y corresponde con los periodos con una

mayor concentración de metano. Sin embargo, se observa un descenso importante de estos organismos en los dos últimos periodos, que coincide con la menor disponibilidad de metano disuelto en estos periodos.

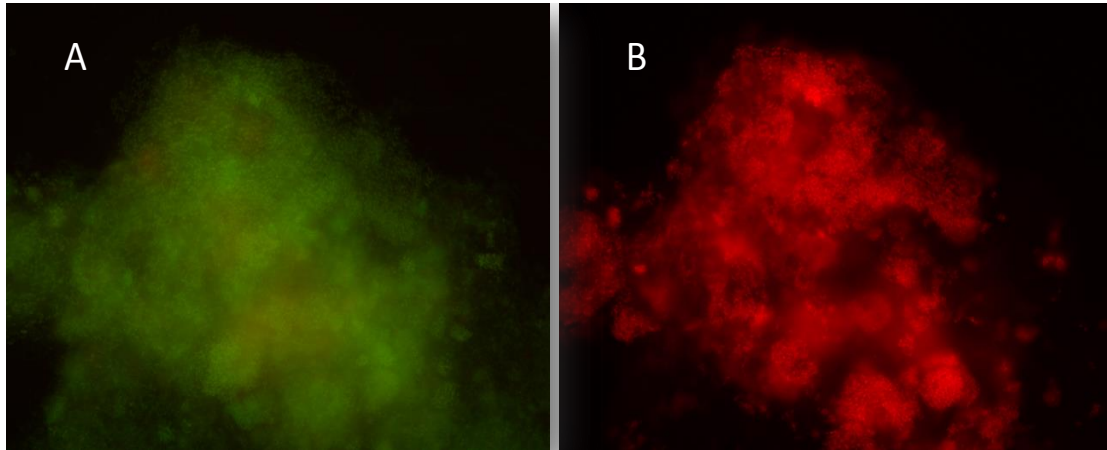


Figura 40. Microfotografía FISH, total de bacterias EUBmix (A), organismos desnitrificantes sonda AT1458 (B).

Según los resultados obtenidos en la operación del sistema y en el estudio microbiológico, el crecimiento de los organismos metanotróficos denota que parte del metano está siendo utilizado como sustrato, contribuyendo en la desnitrificación como un aporte extra de DQO. La Figura 41 muestra una microfotografía de los organismos metanotróficos tipo I identificados en este estudio.

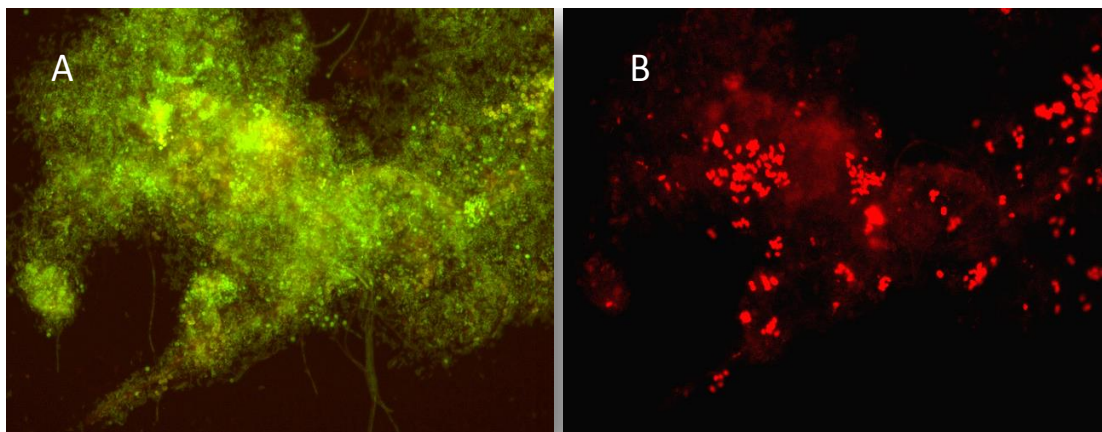


Figura 41. Microfotografía FISH, total de bacterias sonda EUBmix (A), organismos metanotróficos tipo I sonda Mg 84 (B).

Los organismos sulfatorreductores presentes en el inóculo se mantuvieron en el sistema, desapareciendo del sistema en el último periodo, posiblemente por las condiciones de operación del reactor SBR. En el caso de los organismos *Thiobacillus* y *Thiomicrospira desnitrificantes* no se detectó la presencia de estos en ningún periodo. No obstante, los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la oxidación de sulfuro hasta sulfato puede ser llevada a cabo por otro tipo de organismos capaces de oxidar el sulfuro en presencia de nitrato.

4.1.4 Criterios y recomendaciones

En general, el estudio a escala laboratorio permitió determinar que es posible obtener rendimientos en la desnitrificación mayores al 90% utilizando los dadores de electrones presentes en el afluente.

Los resultados obtenidos en el seguimiento del sistema en cada periodo mostraron que en los periodos I y II utilizando solamente los AGV no sería posible alcanzar el grado de desnitrificación obtenido en cada periodo. En el caso del sulfuro en los periodos I y II la concentración sería suficiente para desnitrificar el nitrato presente. En el resto de periodos, tal y como se ha expuesto anteriormente, es necesario el aporte simultáneo de AGV, sulfuro y metano disuelto. En el caso del metano disuelto su desaparición puede deberse a la pérdida del mismo por desabsorción a pesar de tener un coeficiente de transferencia de masa (KLa) bajo a la temperatura del sistema o al consumo por parte de los organismos metanotróficos tal y como se observó en este estudio. Los conocimientos adquiridos acerca de la operación y seguimiento del reactor SBR para el estudio de la desnitrificación utilizando AGV, sulfuro y metano disuelto como dadores de electrones permitieron establecer parámetros operacionales adecuados para el correcto funcionamiento del proceso. De acuerdo a los resultados obtenidos, se logró obtener un porcentaje de desnitrificación superior al 90% trabajando a un TRH de 19h y un TRC entre 20 y 30 días.

Así mismo, el inóculo juega un aspecto importante y determina el desarrollo de los organismos durante la aclimatación. Los resultados obtenidos muestran que es posible adaptar la biomasa procedente de una EDAR convencional para el estudio del proceso de desnitrificación utilizando los dadores de electrones (AGV, sulfuro y metano disuelto) presentes en el efluente de un reactor SAnMBR.

El seguimiento microbiológico que permite la identificación y cuantificación de organismos presentes en el sistema es una herramienta muy útil. El seguimiento periódico del proceso, mediante la aplicación de esta técnica, sería recomendable para estudiar el desarrollo de las poblaciones. Los organismos presentes en el sistema con mayor abundancia fueron los organismos heterótrofos desnitrificantes y los organismos metanotróficos tipo I y II.

4.2 ESTUDIO EN PLANTA PILOTO

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre el postratamiento de efluentes anaerobios se centran en estudiar los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo de forma aislada, incluyendo algunos autores que emplean el sulfuro y el metano disuelto en los procesos de desnitrificación. Sin embargo, el estudio en conjunto de todos los procesos para el tratamiento o postratamiento del efluente real de un reactor anaerobio de membranas sumergidas que trata agua residual urbana no ha sido estudiado.

La planta piloto se operó durante 750 días usando un esquema UCT. Se dividió el tiempo de operación en 3 etapas, controlando en cada una de ellas el tiempo de retención hidráulico (TRH) y el tiempo de retención celular (TRC). En cada etapa, se observó el rendimiento de los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo para las condiciones operacionales (TRC, TRH) y ambientales (temperatura (T), características del agua tratada) existentes. La Tabla 24 muestra los valores del TRC y TRH objetivos basados en la planificación realizada. En cada etapa se controló el caudal de purga con el fin de mantener el TRC en torno a 25 días, excepto en la etapa II donde el TRC se mantuvo en torno a 20 d.

En la etapa I y II (II.1 y II.2), el TRH promedio fue de 13,1 y 26,0 h, respectivamente. Durante el periodo II fue necesario modificar el TRC motivo por el cual esta etapa está dividida en 2 sub-etapas, las cuales serán explicadas con detalle más adelante. En la etapa III se varió el TRH entre 13 y 26 h, con el fin de observar la influencia de este parámetro sobre el proceso de nitrificación.

En las tres etapas, el afluente de la planta piloto se tomó del tanque CIP que recoge el efluente generado en el reactor anaerobio de membranas

sumergidas (SAnMBR) ubicada en la EDAR del Carraixet (Alboraya, Valencia). En cada una de las tres etapas en las que se ha dividido el estudio, el sistema de fangos activados fue inoculado con 200 L de fango procedente de la zona aerobia del reactor biológico de la EDAR del Carraixet. Luego de inocular el sistema, éste se dejó evolucionar hasta observar un comportamiento estable en la eliminación de nutrientes. Para observar y analizar el comportamiento del proceso, cada una de las tres etapas se ha subdividido en periodos de estudio. A continuación se presentarán y discutirán los resultados obtenidos en cada etapa.

Tabla 24. Condiciones de operación en cada etapa.

Etapa	I	II.1	II.2	III
TRH (h)	13	26	26	Entre 13 y 26
TRC (d)	25	22	18	25

4.2.1 Etapa I (0 a 220 días)

Al inicio de la etapa I, la planta piloto se inoculó con fango activado de la EDAR del Carraixet cuyas principales características se indican en la Tabla 25. La determinación y cuantificación de las especies amonioxidantes (AOB), nitritooxidantes (NOB), desnitrificantes (Den), metanotróficas (tipo I y II), sulfatorreductoras (SRB) y organismos acumuladores de polifosfatos (PAO) presentes en el inóculo, que se muestra en la tabla, fue realizada mediante la técnica FISH.

El fango inoculado se mezcló con el efluente del reactor SAnMBR hasta completar el volumen total de la planta piloto de fangos activados, lo que llevó a una concentración de sólidos suspendidos totales en el sistema de 1200 mg l^{-1} .

Tabla 25. Características del inóculo.

Etapa I	
Volumen (l)	200
SST (mg·l⁻¹)	2930
SSV(%)	84,8
AOB (%)	13 ± 2
NOB (%)	2 ± 1
DEN (%)	12 ± 2
SRB (%)	1 ± 1
PAO (%)	1 ± 1
Met tipo I (%)	1 ± 1
Met tipo II (%)	1 ± 1

En la Tabla 26 se muestran los valores medios de los parámetros físico-químicos del afluente utilizado en esta etapa, observándose elevadas concentraciones de nutrientes (nitrógeno y fósforo), sulfuro y metano disuelto. La elevada DQO del afluente es debido a las fracciones que la componen y que se encuentran descritas en el apartado 3.4 de materiales y métodos, donde el aporte de la DQO por parte del sulfuro presente es elevado.

Tabla 26. Parámetros físico-químicos del afluente

ETAPA I			
Parámetro	Unidad	Media	δ
N-NH₄	(mgN·l⁻¹)	43,0	8,4
N-NO₃	(mgN·l⁻¹)	<1	" "
N-NO₂	(mgN·l⁻¹)	<1	" "
P-PO₄	(mgP·l⁻¹)	5,8	1,5
S-H₂S	(mgS·l⁻¹)	96,4	12,5
S-SO₄	(mgS·l⁻¹)	8,6	5,2
AGV	(mg DQO·l⁻¹)	28,7	12,3
DQO	(mg DQO·l⁻¹)	314,7	84,8
CH₄ disuelto	(mg DQO·l⁻¹)	37,3	10,0
ALK	(mg CaCO₃·l⁻¹)	625,4	101,9
p H		7,2	0,1

*δ Desviación estándar

En la Tabla 27 se muestran los valores medios y la desviación estándar (δ), de las condiciones operacionales en la planta piloto durante esta etapa. Para un mejor análisis de los resultados, la etapa I se ha dividido en 4 periodos en función de la temperatura existente y del porcentaje de nitrificación obtenido.

La temperatura no se controló y varió en función de las características del ambiente. El pH al final de la zona aerobia osciló entre 7,0 y 7,5, y la concentración de oxígeno disuelto (OD) se mantuvo entre 1,5 y 2,0 mg·l⁻¹. La Figura 42 muestra la evolución del TRC durante la etapa I. Durante los primeros días de operación (periodo I.1), la purga del sistema se fue ajustando progresivamente con el objetivo de alcanzar el tiempo de retención celular (TRC) definido en esta etapa (en torno a 25 d). En el periodo I.2, el TRC se mantuvo en torno a 26 días (Figura 42), pero se observó un deterioro importante de la nitrificación. En el periodo I.3, el porcentaje de nitrificación siguió reduciéndose posiblemente ocasionado por el descenso de la temperatura.

Tabla 27. Condiciones de operación en la etapa I

Parámetro	Periodo	Media	δ
TRH (h)	I.1	13,6	0,4
	I.2	13,1	0,4
	I.3	12,9	0,2
	I.4	13,1	0,3
TRC (d)	I.1	31,0	6,7
	I.2	26,8	3,3
	I.3	25,4	3,7
	I.4	23,0	2,3
T (°C)	I.1	23,5	1,2
	I.2	20,6	2,2
	I.3	16,4	1,6
	I.4	12,7	0,8
% Nitrificación	I.1	97,2	
	I.2	42,1	
	I.3	38,4	
	I.4	36,3	

* δ Desviación estándar

Durante el periodo I.4, el TRC se mantuvo inicialmente en torno a 25 días, pero al final del periodo se produjo una pérdida considerable de sólidos a través del decantador, que modificó considerablemente el TRC. Los problemas operacionales que conllevaron esta pérdida de sólidos por el efluente del decantador estaban relacionados con la proliferación de organismos filamentosos. Los valores obtenidos al final del periodo han sido eliminados al tratar los datos.

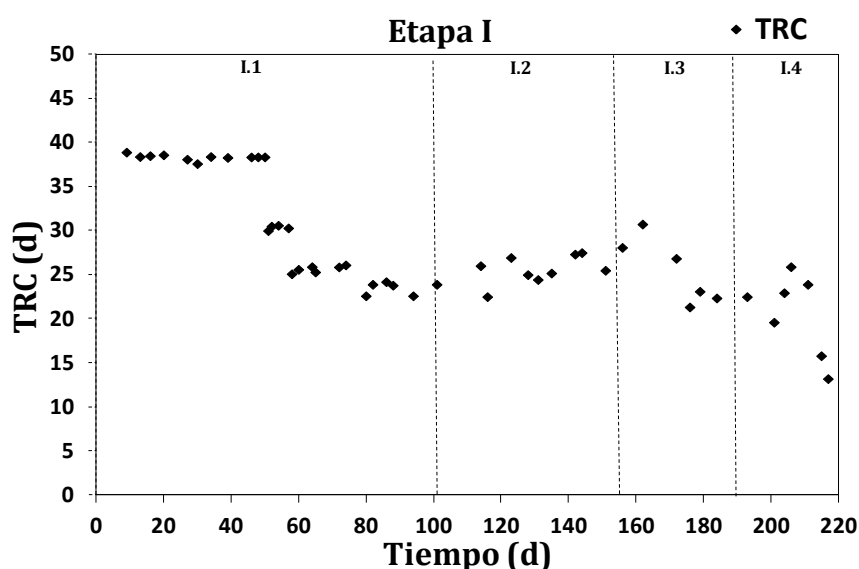


Figura 42. Evolución del TRC durante la etapa I.

A continuación se presentarán y discutirán los resultados obtenidos en el seguimiento de la planta piloto de fangos activados, durante la etapa I, para cada uno de los tres procesos biológicos estudiados (nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo), en función de los cambios de temperatura y de la concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto presentes en el afluente.

4.2.1.1 Nitrificación

El estudio del proceso de nitrificación en la etapa I se realizó mediante el seguimiento en cada periodo de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en la zona aerobia (Figura 43).

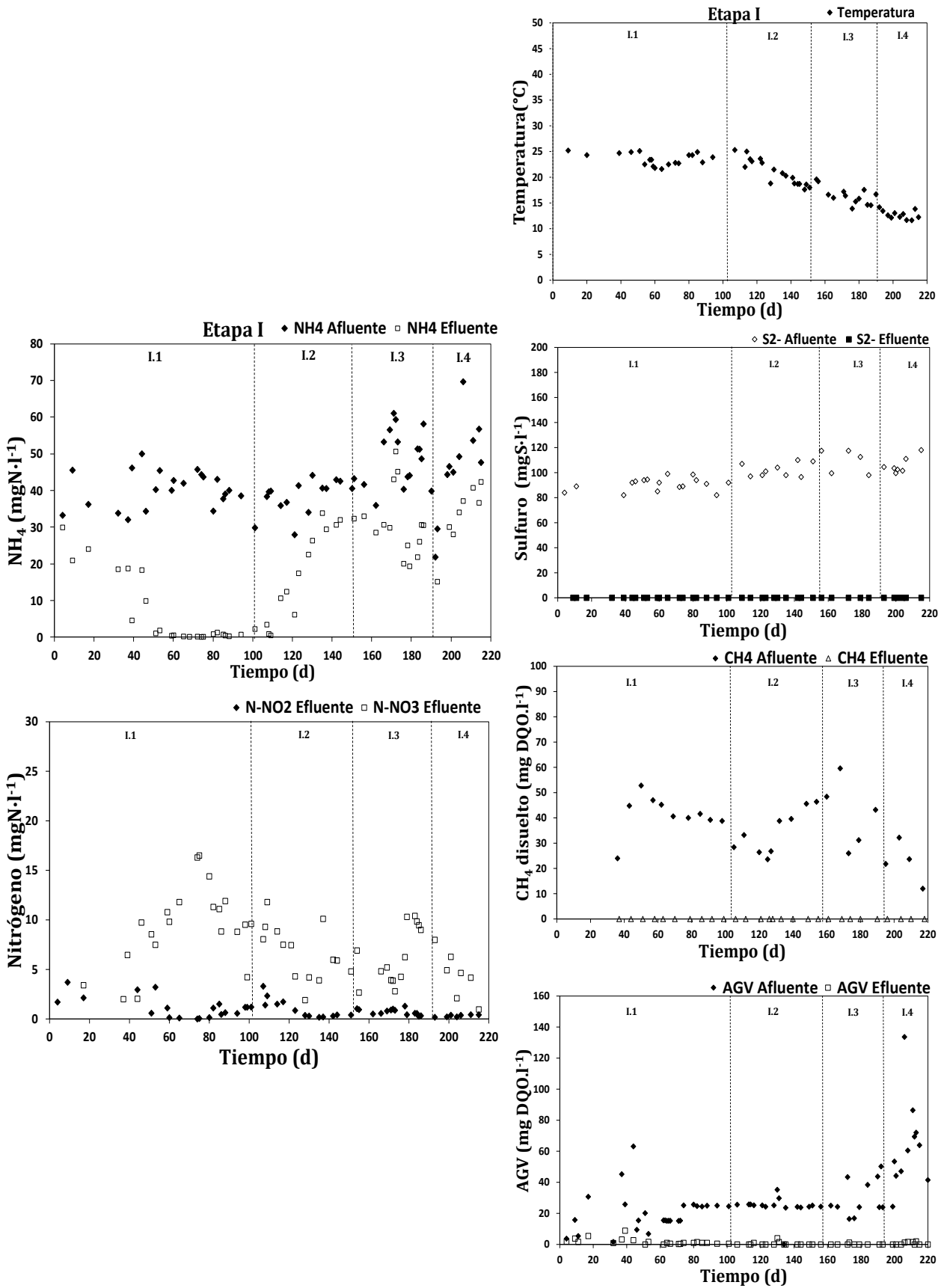


Figura 43. Influencia de las características del afluente sobre la nitrificación.

En el estudio microbiológico realizado, el porcentaje mostrado de organismos hibridados corresponde a un valor medio para cada periodo. El porcentaje de organismos viables en esta etapa fue del 91%. Los organismos AOB fueron hibridados con la sonda NSO1225LNA y los NOB con la sonda Ntspa712, ambas descritas en el capítulo 3 de materiales y métodos. El análisis de la información obtenida se presenta a continuación.

- En el periodo I.1, la nitrificación (Figura 43) logró estabilizarse a partir del día 50, obteniéndose a partir de este momento un porcentaje de nitrificación del 97%. La temperatura durante este periodo fue muy estable y en torno a 25°C, siendo una temperatura óptima para los organismos nitrificantes.
- A partir del día 100 (Periodo I.2) se produjo un claro y progresivo deterioro de la nitrificación, obteniéndose en el efluente, al final del periodo, concentraciones similares a las del afluente (40 mgN · l⁻¹). El grado medio de nitrificación alcanzado en este periodo a pesar del deterioro observado fue del 42%. En el inicio de este periodo, hacia el día 105, se observa que la concentración de nitrato descendió y la concentración de nitrito aumentó de manera puntual (Figura 43). Este aumento en la concentración de nitritos podría estar relacionado con la inhibición de los organismos NOB. Algunos autores mencionan que los organismos NOB son más sensibles a los cambios operacionales como una disminución acusada de temperatura y a la presencia de compuestos tóxicos o inhibidores (Juliette *et al.*, 1993; Sears *et al.*, 2004; Bejarano *et al.*, 2013).
- En el periodo I.3, el proceso no evolucionó favorablemente observándose concentraciones de amonio en el efluente de hasta 45 mg · l⁻¹, descendiendo el grado de nitrificación hasta un 38%. Durante este periodo no se observó acumulación de NO₂. El descenso

acusado de la temperatura en el periodo I.3 parece la principal causa del mayor deterioro del proceso de nitrificación.

- En el periodo I.4, la nitrificación no evolucionó favorablemente y el grado de nitrificación alcanzado fue del 36%. En este periodo se registró un mayor descenso de la temperatura en el sistema, llegando a alcanzar los 11°C, y además, se produjo una pérdida importante de sólidos a través del decantador, pudiendo afectar notablemente al rendimiento del proceso.

Para apoyar los resultados obtenidos en esta etapa, se realizó el estudio microbiológico empleando la técnica FISH. Del estudio microbiológico realizado, se observó un cambio poblacional de organismos amonioxidantes y nitritooxidantes importante respecto al inóculo. En la Figura 44 se puede observar que la abundancia de ambas especies desciende progresivamente a lo largo de la etapa. El descenso de los organismos AOB concuerda con el deterioro de la nitrificación en esta etapa. Por otra parte, la acumulación de nitrito puede ser debida a que la población NOB disminuyó en casi un 60% con respecto al periodo I.1. En general, para esta etapa, los cambios observados en la abundancia de los organismos están en concordancia con el comportamiento del proceso de nitrificación.

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente se pretende a continuación discernir cuáles son los factores que afectaron al proceso de nitrificación. Es posible que el descenso de la nitrificación en este periodo fuera ocasionado por los cambios importantes de temperatura, bajos TRC, la presencia de sulfuro en el sistema o de algún otro compuesto que también actuara como tóxico/inhibidor del proceso de nitrificación. Por tanto, se analizará para cada periodo la influencia de la temperatura y de la concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto.

Abundancia de organismos AOB y NOB etapa I

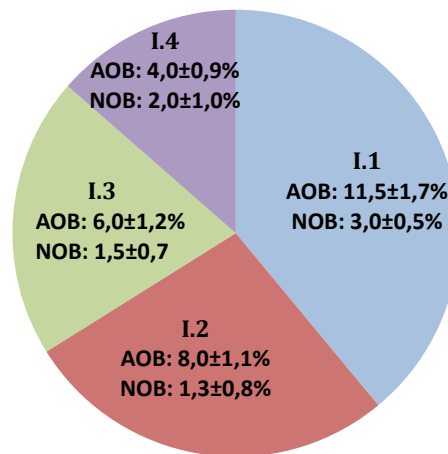


Figura 44. Abundancia de organismos AOB y NOB durante la etapa I.

Temperatura.

- En el periodo I.1, la temperatura media fue de 23,5°C (Figura 43). Esta temperatura estaría por encima de los valores mencionados en la literatura que favorecen el rendimiento de los organismos nitrificantes. Según Hellinga *et al.* 1998, las bacterias amonioxidantes tienen mayor tasa máxima de crecimiento que las bacterias nitritooxidantes a una temperatura de 20°C, mientras que la tasa de crecimiento de las bacterias amonioxidantes es menor que la de las nitritooxidantes a temperaturas inferiores a 15°C. Por lo tanto, temperaturas superiores a 20°C favorece el crecimiento de estos organismos y también incrementa las diferencias entre las tasas de crecimiento de ambos grupos.
- En el periodo I.2, la temperatura media descendió rápidamente debido al cambio estacional hasta 20,6°C y en el periodo I.3 hasta 16,4 °C. En este caso, los rendimientos obtenidos en los periodos I.2 y I.3 fueron de 42% y 38%, respectivamente. Algunos estudios, como los realizados por Harremoës *et al.*, 1998 y Antoniou *et al.*, 1990, mencionan que uno de los parámetros que más afecta la nitrificación

es la temperatura. El descenso observado en estos dos periodos estaría afectando la velocidad de consumo de los organismos nitrificantes. No obstante, los rendimientos obtenidos en estos dos periodos para un TRC aproximado de 25 días son bajos teniendo en cuenta que en estudios realizados por García-Usach, (2002) en un sistema de fangos activados, se obtuvieron rendimientos en la nitrificación en torno al 36% a una temperatura de 13°C y un TRC de 10 días.

- En el periodo I.4, la temperatura media descendió hasta 12,7 °C, debido a la entrada del invierno, y el grado de nitrificación alcanzado fue del 36%. Según Hellinga *et al.* 1998, cuando la temperatura desciende por debajo de 15°C la tasa de crecimiento de los organismos nitrificantes decrece drásticamente y se limita el proceso de nitrificación. Ilies y Mavinic (2001) observaron que a temperaturas cercanas a 10°C y TRC de 20 días el porcentaje de nitrificación se redujo entre un 10% y 30%. García-Usach (2002) menciona que la temperatura es un factor que afecta el TRC mínimo para que se produzca la nitrificación, ya que si el proceso contiene alguna etapa no aerobia, la velocidad de muerte de los organismos autótrofos aumenta respecto a la velocidad de crecimiento, necesitándose un TRC mínimo de 10 días referido a todo el sistema, para temperaturas inferiores a 20°C. En este periodo el TRC promedio fue de 23,2 días, siendo un tiempo de retención en principio adecuado para el desarrollo de los organismos nitrificantes.

Concentración de sulfuro de hidrógeno.

- En el periodo I.1, la concentración media de sulfuro en el afluente fue de $91,4 \pm 6,2 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 43), que corresponde en el reactor anaerobio a una concentración aproximada de $30,6 \text{ mg S}\cdot\text{l}^{-1}$. Según la bibliografía, valores de sulfuro superiores a $5 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$ pueden inhibir el

proceso de nitrificación (Juliette *et al.*, 1993; Sears *et al.*, 2004; Bejarano *et al.*, 2013). En este estudio, la concentración de sulfuro en el afluente es mayor a lo que la bibliografía menciona, pero en este periodo no se observó ninguna inhibición, posiblemente porque el efecto inhibitorio del sulfuro fue compensado con el crecimiento de los organismos nitrificantes debido a la elevada temperatura del sistema en este periodo y al elevado TRC. Tal y como se puede observar en el seguimiento microbiológico (Figura 44), en el periodo I.1 existía una población de organismos nitrificantes bien establecida que favoreció la nitrificación.

- La concentración de sulfuro en el periodo I.2, I.3 y I.4 fue de $101,6 \pm 5,4 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$, $109,0 \pm 9,5 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$ y $105,7 \pm 6,4 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente. En estos periodos la nitrificación sufrió un deterioro importante. La concentración de sulfuro observada en estos periodos es ligeramente superior a la concentración de sulfuro del periodo I.1 ($91,4 \pm 6,2 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$), donde el rendimiento de la nitrificación fue mayor. En este periodo con las condiciones de temperatura, TRC y abundancia de organismos nitrificantes no se observó un efecto negativo sobre este proceso de nitrificación.
- La Figura 45 muestra el seguimiento en la etapa I de la concentración de sulfuro en el afluente y de sulfato en el efluente. La gráfica permite observar que los sulfuros después de pasar por las distintas zonas de la planta piloto de fangos activados eran oxidados en su mayoría a sulfatos, excepto en el periodo I.1 donde se observó una mayor concentración de sulfato en el efluente. Este hecho pone de manifiesto que no existe una pérdida significativa de azufre en el sistema. Según los estudios de laboratorio descritos en el apartado 3.3, la oxidación de sulfuro a sulfato en este proceso puede llevarse a cabo por vía biológica (desnitrificación con sulfuro) o por vía química con oxígeno. Durante el seguimiento de los compuestos de azufre en la

planta piloto se detectaron concentraciones moderadas de sulfato (71 mg S l^{-1}), tiosulfato ($7,6 \text{ mg S l}^{-1}$) y sulfuro ($7,8 \text{ mg S l}^{-1}$) en la zona anaerobia. El tiosulfato y el sulfuro eran oxidados rápidamente en las zonas anóxica y aerobia hasta sulfato. Según los datos obtenidos en el seguimiento del proceso, y tal como se observa en la Figura 45, en el efluente la forma predominante de los compuestos de azufre era el sulfato.

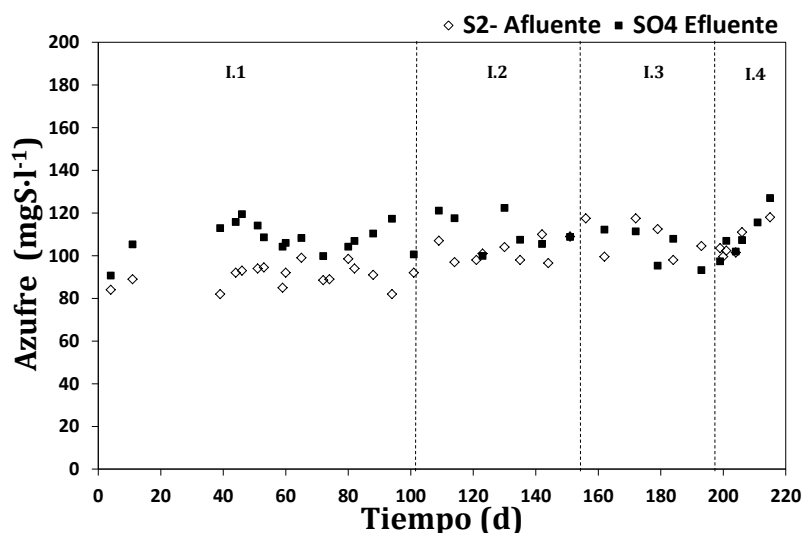


Figura 45. Evolución de la concentración de sulfuro y sulfato en la etapa I.

Concentración de ácidos grasos volátiles y metano disuelto.

La Tabla 28 muestra la concentración media de ácidos grasos volátiles (AGV) y metano disuelto (CH_4) presente en el afluente, durante la etapa I. Se observa un aumento significativo de los AGV y una disminución del metano disuelto en el periodo I.4.

Tabla 28. Concentración en el afluente de CH_4 disuelto y AGV en la etapa I.

ETAPA I				
Periodo	AGV ($\text{mg DQO} \cdot \text{l}^{-1}$)		CH ₄ disuelto ($\text{mg DQO} \cdot \text{l}^{-1}$)	
	Media	δ	Media	δ
I.1	21,7	13,4	40,2	8,1
I.2	27,6	3,4	35,1	8,9
I.3	29,9	10,7	41,7	12,2
I.4	64,8	31,3	25,9	5,5

* δ desviación estándar

- En el periodo I.1, I.2 y I.3, la concentración media de AGV y metano disuelto en el afluente se mantuvo casi constante. Los AGV y el metano disuelto, a pesar de que no participan directamente sobre la nitrificación, actúan como fuente de carbono en otros procesos tales como la desnitrificación o la eliminación biológica de fósforo. En este caso, cualquier aumento significativo de materia orgánica fácilmente biodegradable en presencia de sulfuro puede favorecer el crecimiento de organismos no formadores de flóculos como el caso de las bacterias filamentosas.
- En el periodo I.4 se observó un crecimiento significativo de organismos filamentosos que provocó una pérdida de sólidos a través del decantador que conllevó un deterioro del sistema. Con el objetivo de identificar el organismo presente y relacionarlo con las variables del proceso se empleó la técnica FISH. Los organismos fueron hibridados e identificados como *Thiothrix*, los cuales forman redes interfloculares que contienen azufre elemental en el interior. Estos organismos son capaces de crecer en ambientes con concentraciones elevadas de sulfuro y AGV. En este caso, durante el periodo I.4 se observó un aumento de AGV que, en presencia de sulfuro en el sistema, crearon el medio propicio para el crecimiento de estos organismos.

La Figura 46 muestra una microfotografía de los organismos filamentosos detectados (A), frente al total de bacterias presentes en la muestra (B). En la Figura 46 C y D se observan las redes formadas y los puntos amarillos en el filamento característicos del azufre presente en el interior. A pesar de la presencia de estos organismos filamentosos, la concentración de sulfato en el efluente coincide con el sulfuro afluente.

En general, durante la etapa I, se observó que la nitrificación alcanzó un máximo rendimiento durante el periodo I.1, pero no en el resto de periodos, debido a una posible inhibición de la nitrificación. La alcalinidad, pH y OD en todos los periodos se encontraban dentro de los valores recomendados para no limitar el desarrollo de las bacterias nitrificantes. La temperatura en este caso varió en función de las condiciones ambientales llegando a valores desfavorables para el crecimiento de los organismos nitrificantes.

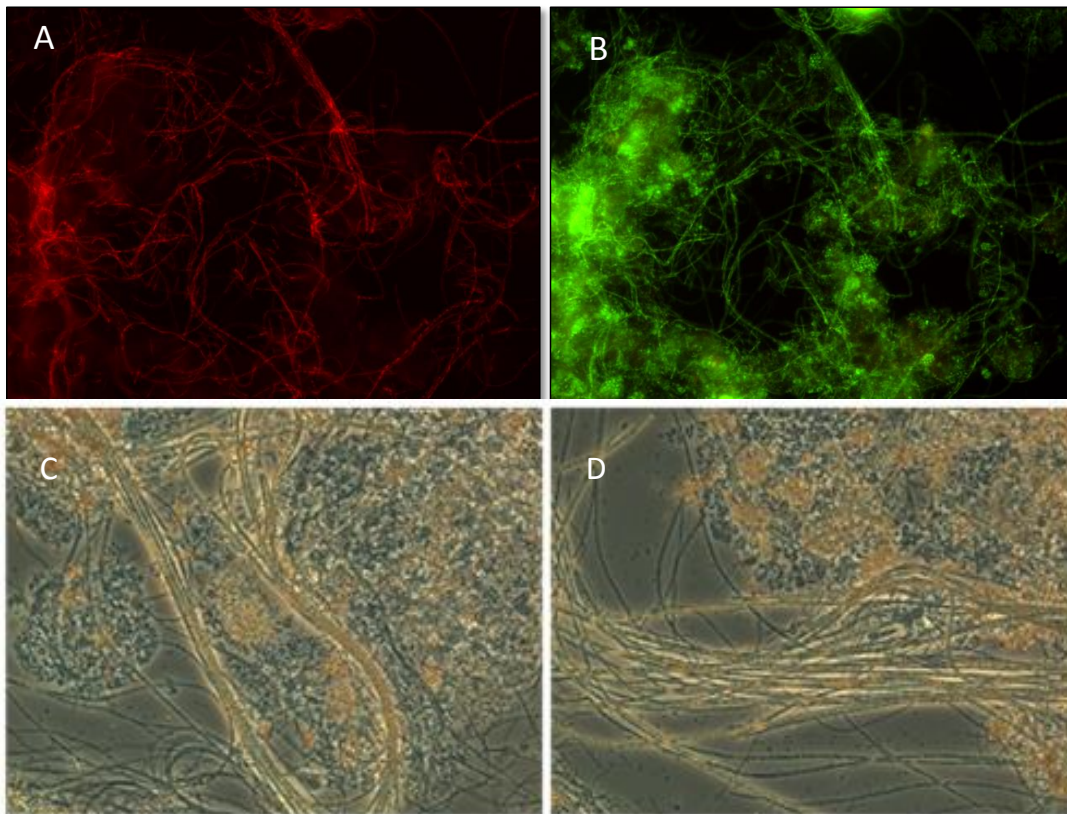


Figura 46. Microfotografía FISH, organismos filamentosos *Thiothrix* (A), total de bacterias sonda EUB mix (B). Morfología en campo claro (C yD).

Tal y como se mencionó anteriormente, cambios importantes de temperatura, presencia de compuestos tóxicos o inhibidores pueden afectar a los organismos nitrificantes. En este caso, durante el periodo I.1 un factor que pudo favorecer la nitrificación fue la elevada temperatura y la abundancia de organismos nitrificantes presentes en el inóculo.

El hecho de que en este sistema el afluente provenga de un reactor de membranas supone que los organismos presentes deben mantenerse y desarrollarse a partir del inóculo inicial. Un aspecto importante son los resultados obtenidos en el periodo I.2, donde a pesar de que la temperatura (20,6°C) y el TRC (26,8 d) eran favorables para el proceso de nitrificación, ésta empeoró.

Según lo expuesto anteriormente, el deterioro progresivo de la nitrificación en esta etapa podría estar favorecido con la presencia de sulfuro en el agua afluente y la inhibición de los organismos nitrificantes por la presencia continuada de este compuesto.

Como parte del estudio en planta piloto, y con el objetivo de estudiar el efecto de la temperatura y la presencia de sulfuro sobre la inhibición de la biomasa nitrificante, se realizaron una serie de ensayos a escala laboratorio los cuales se muestran en detalle en el apartado 4.2.5.

Los ensayos realizados consistieron en extraer biomasa durante los periodos donde se observó la inhibición de la biomasa nitrificante y someterla a una respirometría que permitiera observar la evolución de la concentración de amonio y de la OUR con el tiempo. Los ensayos fueron realizados utilizando el equipo de respirometrías automático BIOCALIBRA descrito en el apartado 3.3.2 del capítulo 3 de materiales y métodos.

La Tabla 29 muestra la evolución de la concentración de amonio, nitrito y nitrato durante uno de los ensayos respirométricos realizados. En ella se puede observar que la biomasa una vez extraída del sistema recuperaba su actividad nitrificante, indicando que el tipo de inhibición era reversible. Se observó también un leve aumento de la concentración de nitrito, siendo este comportamiento similar al observado en la planta piloto en los periodos donde la nitrificación estaba inhibida.

Tabla 29. Concentración de amonio, nitrito y nitrato durante el ensayo.

Tiempo (d)	NH ₄ (mgN·l ⁻¹)	NO ₂ (mgN·l ⁻¹)	NO ₃ (mgN·l ⁻¹)
0,0	29,8	0,4	4,9
0,2	16,2	1,9	20,1
0,4	3,5	0,8	23,2
0,5	0,9	0,3	24,8
0,8	0,2	0,0	26,1

La Figura 47 muestra la evolución de la OUR y de los compuestos de nitrógeno (NH₄, NO₂ y NO₃) durante el ensayo respirométrico. En la figura se puede observar la rápida caída de la OUR transcurridas 9 horas, que corresponde con el agotamiento del amonio en el ensayo.

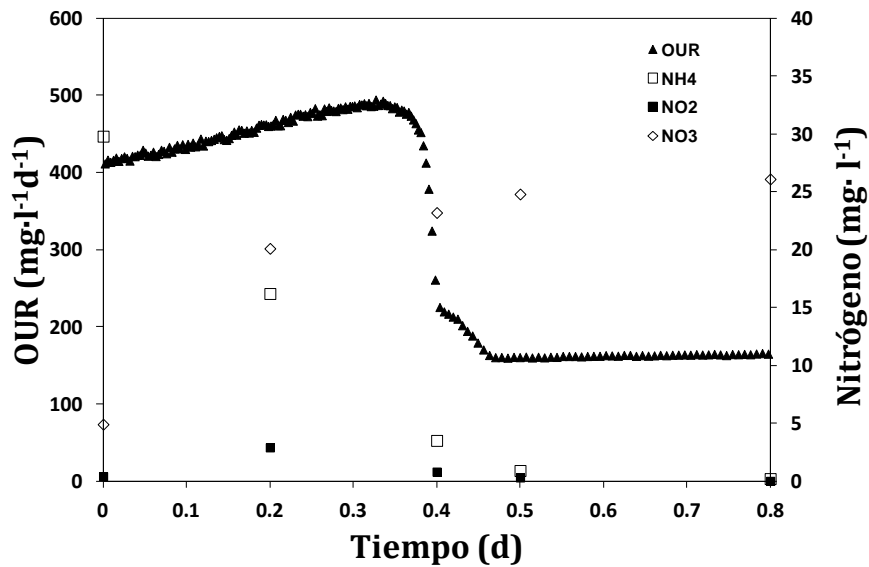


Figura 47. Evolución de la OUR y la concentración de amonio, nitrito y nitrato con el tiempo.

4.2.1.2 Desnitrificación

El estudio del proceso de desnitrificación se realizó mediante el seguimiento en cada periodo de la concentración de nitrito y nitrato en el efluente y en la zona anóxica. Los parámetros de influencia analizados sobre el proceso de desnitrificación son la temperatura y las concentraciones de sulfuro, AGV y metano disuelto.

La Tabla 30 muestra la concentración media de amonio en el afluente y de amonio, nitrito y nitrato en el efluente durante los distintos periodos de la etapa I. También se muestra el porcentaje de nitrógeno eliminado calculado a partir del balance de nitrógeno en el sistema. El porcentaje de desnitrificación también mostrado en la tabla considera que todo el amonio eliminado en el sistema pasa a nitrato o nitrito y una parte de este nitrato es desnitrificado. El amonio utilizado como nutriente se considera despreciable en este balance. Las ecuaciones 30 y 31 describen el balance realizado para calcular el porcentaje de nitrógeno eliminado (%N elim) y el porcentaje de desnitrificación (%Desnit).

$$\%N \text{ Elim} = \frac{NH4\text{afluente} - (NH4\text{efluente} + NO2\text{efluente} + NO3\text{efluente})}{NH4\text{afluente}}$$

Ec. 30

$$\%Desnit = \frac{NH4\text{afluente} - (NH4\text{efluente} + NO2\text{efluente} + NO3\text{efluente})}{NH4\text{afluente} - NH4\text{efluente}}$$

Ec. 31

Tabla 30. Evolución de la concentración de amonio, nitrito y nitrato en el afluente y efluente en la etapa I.

ETAPA I										
Periodo	AFLUENTE (mg N·l ⁻¹)		EFLUENTE (mg N·l ⁻¹)						% N Eliminado	% Desnit
	NH ₄	δ	NH ₄	δ	NO ₂	δ	NO ₃	δ		
I.1	40,4	4,9	6,8	3,6	1,2	1,2	9,5	4,2	56,6	68,1
I.2	38,7	4,0	17,4	12,1	1,0	0,9	6,9	2,6	34,6	62,9
I.3	49,2	7,8	31,0	9,3	0,9	0,9	6,9	2,8	21,1	57,1
I.4	46,4	13,3	33,0	8,7	0,3	0,1	3,9	2,6	19,8	68,6

*δ desviación estándar; %Desnit (Desnitrificación)

La Tabla 31 presenta la concentración de nitrito y nitrato en la salida de la zona anóxica, valores con los que se determina el rendimiento en la zona anóxica en cada periodo.

Tabla 31. Concentración de nitrito y nitrato al final de la zona anóxica.

ETAPA I				
Periodo	NO ₂ (mg N·l ⁻¹)	δ	NO ₃ (mg N·l ⁻¹)	δ
I.1	1,0	1,0	2,3	1,7
I.2	0,0	0,0	1,0	0,4
I.3	0,0	0,0	0,3	0,1
I.4	0,0	0,0	0,8	0,2

*δ desviación estándar

- En el periodo I.1, el porcentaje de nitrógeno eliminado fue del 56,6% y el porcentaje de desnitrificación del 68,1%. Durante el seguimiento en este periodo se observó que la desnitrificación estaba limitada por alguna variable del sistema. Las variables que pueden afectar notablemente la velocidad de consumo de los organismos desnitrificantes son la temperatura y la disponibilidad de materia orgánica u otro dador de electrones. En este caso la materia orgánica fácilmente biodegradable en forma de AGV fue baja, sin embargo, la presencia de sulfuro y metano disuelto, que pueden actuar como dadores de electrones, podría estar aportando DQO para el proceso de desnitrificación. El aporte extra de DQO y la participación de estos compuestos en la desnitrificación se discutirán más adelante.
- En la Tabla 30 se puede observar que en los periodos I.2, I.3 y I.4, el porcentaje de nitrógeno eliminado fue del 34,6%, 21,1% y 19,8%, respectivamente. El porcentaje de nitrógeno eliminado es bajo debido a la alta concentración de nitrógeno amoniacal en el efluente, ocasionada por la baja nitrificación en estos periodos. No obstante, aun siendo baja la cantidad de nitratos recirculados a la zona anóxica, los porcentajes de desnitrificación se mantuvieron entre un 57% y un 68%. El hecho de que todos los nitratos no fueran desnitrificados podría estar relacionado con una baja disponibilidad de materia orgánica u otros dadores de electrones. En este caso, y debido a la configuración del sistema, una parte de los AGV presentes en el

afluente podrían ser consumidos en la zona anaerobia, no estando disponibles para ser consumidos en la zona anóxica por los organismos desnitrificantes.

Sin embargo, para analizar el rendimiento de desnitrificación es necesario evaluar la participación como dadores de electrones de otros compuestos tales como el sulfuro o el metano disuelto. De este modo, se puede considerar que el porcentaje de desnitrificación obtenido en cada periodo podría estar influenciado por la presencia de AGV, sulfuro y metano disuelto en el sistema.

Con el fin de apoyar los resultados comentados anteriormente se realizó el seguimiento microbiológico, empleando la técnica FISH, de los organismos que podrían participar en la desnitrificación. Con el fin de detectar su presencia en el medio, los organismos desnitrificantes fueron hibridados con las siguientes sondas: AT1458, TBD1419, TMD131, Ma464 y Mg84. Durante el seguimiento microbiológico realizado en la etapa I se identificaron organismos heterótrofos desnitrificantes con la sonda AT1458 y organismos metanotróficos tipo I y II con la sonda Mg84 y Ma464, capaces de utilizar el metano disuelto. Los organismos *Thiomicrospira* desnitrificantes y *Thiobacillus* desnitrificantes hibridados con las sondas TBD1419 y TMD131, capaces de utilizar los sulfuros, no se detectaron.

La Figura 48 muestra la abundancia de los organismos mencionados anteriormente en los 4 periodos. Se observa que la abundancia de los organismos metanotróficos aumentó respecto al inóculo, siendo los de mayor abundancia los organismos del tipo I hibridados con la sonda Mg84, que crecen a bajas concentraciones de metano. Así mismo, se puede observar que la abundancia de organismos desnitrificantes disminuye durante la etapa con respecto al inóculo, corroborando la disminución en el porcentaje de eliminación de nitrógeno durante esta etapa.

Abundancia de organismos heterótrofos desnitrificantes y metanótrofos (Tipo I y II)

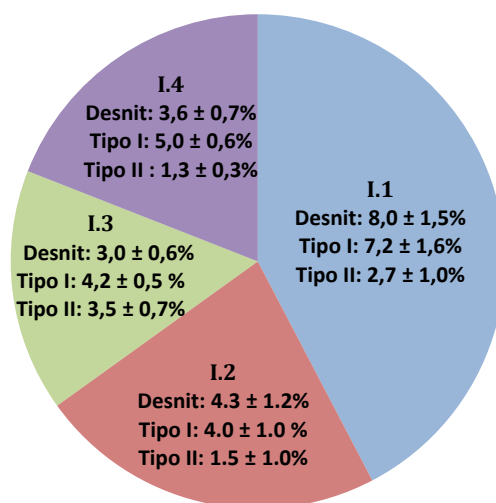


Figura 48. Abundancia de organismos desnitrificantes y metanotróficos durante la etapa I.

La Figura 49 muestra la evolución de la concentración de nitrito y nitrato durante la etapa I y la evolución de la temperatura y de varios compuestos tales como sulfuro, ácidos grasos volátiles y metano disuelto, que puede influir sobre los rendimientos obtenidos. Para los tres compuestos se observa que éstos son totalmente consumidos. A continuación se analizará la influencia de la temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto sobre el proceso de desnitrificación.

Temperatura.

- En el periodo I.1, la temperatura media fue de 23,5°C (Figura 49). Según la bibliografía, la velocidad de crecimiento de los organismos heterótrofos desnitrificantes aumenta con la temperatura obteniéndose velocidades máximas entre 15 – 25°C (Timmermans y Van Haute, 1983; Gujer *et al.*, 1995). Por tanto, se puede considerar que la temperatura del sistema en el periodo I.1 era óptima para alcanzar buenos rendimientos en la reducción de nitrógeno.

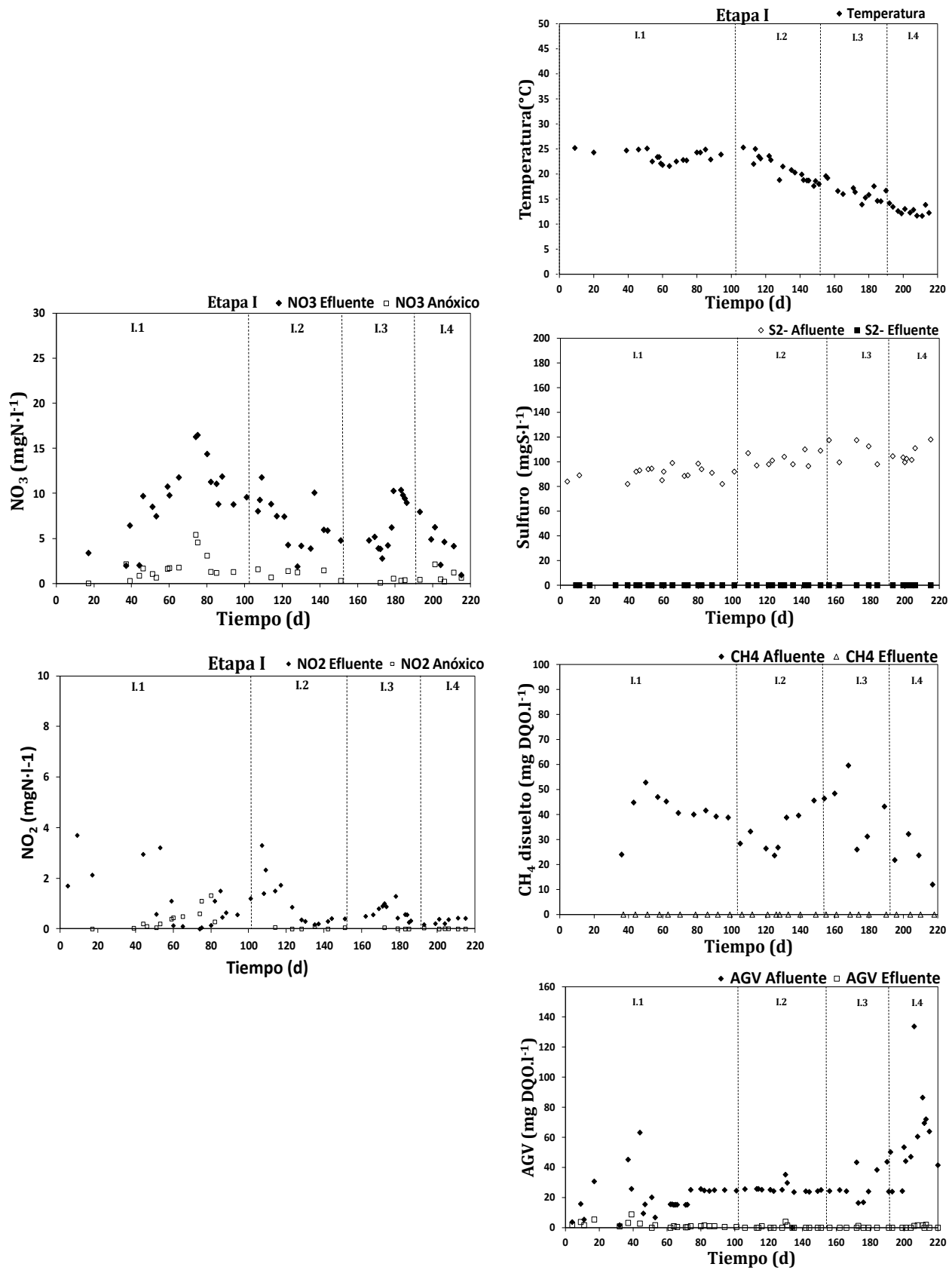


Figura 49. Influencia de las características del afluente sobre la desnitrificación.

- En el periodo I.2, la temperatura media descendió hasta 20,6 °C y en el periodo I.3 hasta 16,4 °C, llegando a valores puntuales al final del periodo hasta 13 °C. El descenso en la temperatura que se inició en el periodo I.2 pudo influir en la velocidad de los organismos desnitrificantes y, por tanto, en el rendimiento del proceso. Sin embargo, la temperatura en los periodos I.2 y I.3 no se considera tan baja como para influenciar sobre el porcentaje de eliminación obtenido, dado el TRC empleado en este periodo. García-Usach (2002) observó que a TRC inferiores a 12 días, se obtienen velocidades de consumo de nitrato similares a 13°C y 20°C con un TRC de 10 y 6 días respectivamente.
- En el periodo I.4, la temperatura continuó descendiendo hasta alcanzar un valor medio de 12,7 °C. En este periodo el porcentaje de nitrógeno eliminado fue del 19,8% y el grado de desnitrificación fue del 68,6%. Ilies y Mavinic (2001) observaron que a temperaturas cercanas a 10°C el rendimiento se ve afectado hasta en un 5%. En esta etapa, a pesar del descenso de la temperatura, no se observó un descenso significativo en el porcentaje de desnitrificación obtenido. Es decir, existen factores como la disponibilidad de materia orgánica o la baja recirculación de nitratos desde la etapa aerobia que podrían influenciar sobre los rendimientos obtenidos.

Concentración de ácidos grasos volátiles, sulfuro y metano disuelto.

Tal y como se explicó en el estudio en laboratorio, en el apartado 4.1.2, la influencia de la concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto sobre el proceso en planta piloto se ha determinado mediante el balance de DQO en el sistema. En el caso de la DQO aportada por la fracción S_F , descrita en la ecuación 26 y que corresponde principalmente con los productos microbianos solubles (PMS) capaces de atravesar la membrana, se considera despreciable su contribución, teniendo en cuenta que este tipo de

biopolímeros solubles se absorben en el interior de la membrana bloqueando los poros. Este hecho fue corroborado por Giménez (2014) en el reactor SAnMBR para TRH entre 5 y 24 horas y TRC entre 30 y 70 días.

La DQO disponible en el afluente corresponde con la DQO asociada a los AGV, sulfuro y metano disuelto. Tal y como se mencionó en materiales y métodos, teóricamente son necesarios $4 \text{ mg O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ CH}_4$ y $2 \text{ mg de O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ S}^{2-}$, por lo que para calcular la DQO del metano y el sulfuro será suficiente con multiplicar la concentración de metano y sulfuro por 4 y 2, respectivamente. En el caso de los AGV son necesarios $1,06 \text{ mg O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$.

También, se calculó la DQO requerida empleando las ecuaciones 27, 28 y 29, de las cuales se deduce que se consumen 2,86 mg DQO para reducir 1 mg de N-NO₃ y 1,73 mg DQO para reducir 1 mg de N-NO₂. El cálculo de la DQO requerida se realizó en base a la DQO necesaria para desnitrificar todo el nitrato y nitrito formado, a partir del amonio eliminado. Se ha despreciado el amonio requerido como nutriente por la biomasa.

El valor de la DQO requerida se comparó con la DQO disponible en el afluente aportada por los AGV, sulfuro y metano disuelto. Esta comparación permite estimar el potencial de desnitrificación del efluente SAnMBR. Es decir si la DQO disponible sería suficiente para desnitrificar todo el nitrato y nitrito formado.

En la Tabla 32 se presentan el porcentaje de nitrógeno eliminado, el porcentaje de desnitrificación, la DQO disponible en forma de AGV, sulfuro y metano disuelto, y la DQO requerida.

En la Tabla 32 se puede observar que en los periodos I.1, I.2 y I.3, la DQO disponible en forma de AGV no sería suficiente para desnitrificar todo el nitrato que se formó en la nitrificación, siendo en estos periodos la DQO

requerida mayor. Por tanto, para poder desnitrificar todo el nitrato formado, sería necesario el aporte extra de DQO por parte de otros dadores de electrones presentes en el afluente como el sulfuro y el metano disuelto.

En el caso de la DQO aportada por el sulfuro, ésta sería suficiente para desnitrificar todo el nitrato y nitrito formado. El metano disuelto también representa un aporte importante de DQO, que supondría más del 40% de la DQO requerida. La contribución de cada dador de electrones presentes en el afluente en términos de DQO, no se determinó debido a que el aporte de cada uno de ellos ocurre de manera simultánea. Tal y como se comentó anteriormente, existen periodos en los cuales, con solo los AGV presentes es suficiente para desnitrificar el nitrato presente (periodo I.4). En cambio en otros periodos es necesario el aporte de otros dadores de electrones.

Particularizando, para el periodo I.1, se observa:

- En este periodo, el porcentaje de eliminación de nitrógeno obtenido fue del 56,6%. En la Tabla 32 se presentan el potencial de desnitrificación de los dadores presentes en el afluente. Se puede observar que la DQO disponible en forma de AGV es de 21,7 mgDQO l⁻¹ y la DQO requerida es de 94,6 mg DQO l⁻¹. Este hecho muestra que en este periodo la concentración de AGV disponible no era suficiente como para eliminar todo el nitrato que se formaría. Esto indica que para eliminar todos los nitratos formados es necesario el aporte de otros dadores de electrones como el sulfuro y el metano disuelto en el proceso de desnitrificación.
- La participación del metano disuelto en esta etapa fue contrastada con el estudio microbiológico realizado (Figura 48), en el cual se observó un crecimiento de organismos metanotróficos tipo I y II. La abundancia de estos organismos en los periodos estudiados fue del mismo orden distribuido en ambas especies. La presencia de los

organismos metanotróficos observada concuerda con los resultados obtenidos en el estudio a escala laboratorio desarrollado en esta tesis y con otros estudios realizados (Costa *et al.*, 2000; Knowles, 2005; Modin *et al.*, 2007).

Tabla 32. Potencial de desnitrificación de los dadores presentes en el afluente.

Parámetro	Periodo	Media	δ
AGV (mg DQO·l ⁻¹)	I.1	21,7	13,4
	I.2	27,6	3,4
	I.3	29,9	10,7
	I.4	64,8	31,3
S-S ⁻² (mg DQO·l ⁻¹)	I.1	182,8	12,4
	I.2	203,2	10,8
	I.3	218,0	19,0
	I.4	211,4	12,8
CH ₄ disuelto (mg DQO·l ⁻¹)	I.1	40,2	8,1
	I.2	35,1	8,9
	I.3	41,7	12,2
	I.4	25,9	5,5
DQO requerida (mg DQO·l ⁻¹)	I.1	94,6	1,1
	I.2	59,7	1,6
	I.3	50,9	1,8
	I.4	37,9	2,3
N Eliminado (%)	I.1	56,6	2,3
	I.2	34,6	1,8
	I.3	21,2	1,9
	I.4	19,8	2,1
Desnit (%)	I.1	68,1	8,3
	I.2	62,9	9,5
	I.3	57,1	6,3
	I.4	68,6	5,6

* δ desviación estándar; %Desnit (desnitrificación)

Analizando el resto de periodos se observa:

- En los periodos I.2, I.3 y I.4, el grado de eliminación de nitrógeno disminuyó considerablemente debido al deterioro de la nitrificación. El porcentaje de desnitrificación en el periodo I.4 aumentó levemente respecto al periodo anterior pasando de un 57 a un 68%. No obstante, en los periodos I.2 y I.3 se puede observar que con solo la DQO aportada por los AGV no podría desnitrificarse todo el nitrato

formado; a diferencia del periodo I.4, donde los AGV son suficientes. Por tanto, sería necesario un consumo simultáneo de AGV, sulfuro y metano disuelto para alcanzar la desnitrificación de todo el nitrato y nitrito formado.

En la Tabla 33 se presenta la cantidad de nitrato que teóricamente podría desnitrificarse con cada uno de los dadores de electrones presentes y que, como se observa en la Figura 49, fueron consumidos casi totalmente en cada periodo. Se observa que solamente en los periodos I.3 y I.4 la concentración de AGV sería suficiente para desnitrificar todos los nitratos eliminados, destacando la mayor disponibilidad de AGV en el periodo I.4.

En el caso del sulfuro, con la DQO aportada por este compuesto en el afluente sería suficiente para desnitrificar tanto los nitratos realmente eliminados en el proceso como incluso todos los formados en todos los periodos. Sin embargo, esto no se observó debido posiblemente a la pérdida de la capacidad de desnitrificación, debido a la rápida oxidación química del sulfuro en la planta piloto en presencia de oxígeno. Con respecto al metano disuelto, la Tabla 33 muestra que con la concentración disponible en los periodos I.1 y I.2 no sería suficiente para desnitrificar el nitrato eliminado.

Tabla 33. Nitrato que teóricamente podría desnitrificarse con cada uno de los dadores de electrones y nitrato eliminado durante la etapa I

Periodo	AGV (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	S ²⁻ (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	CH ₄ (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	N-NO ₃ Eliminado (mgN·l ⁻¹)
I.1	21,7	7,5	182,8	63,9	40,2	14,0	22,9
I.2	27,6	9,6	203,2	71,0	35,1	12,2	13,4
I.3	29,9	10,4	218,0	76,2	41,7	14,5	10,4
I.4	64,8	22,6	211,4	73,9	25,9	9,0	9,2

En general en la etapa I, se observa un mayor grado de desnitrificación durante los periodos I.1 y I.4, a pesar del deterioro de la nitrificación observada. Como se ha comentado anteriormente, en los periodos I.1 y I.2, la

DQO aportada por los AGV fue insuficiente, como para desnitrificar los nitratos eliminados, siendo necesario en estos periodos la contribución de otros dadores de electrones como el sulfuro y/o el metano disuelto. Es necesario tener en cuenta que el sulfuro presente puede estar siendo oxidado por vía química en el sistema y por tanto no todo el sulfuro estará disponible para desnitrificar.

4.2.1.3 Eliminación biológica de fósforo

La eliminación biológica de fósforo fue evaluada con el seguimiento de la concentración de ortofosfato en el afluente y efluente de la planta piloto, y con la concentración de fósforo total en el reactor aerobio. Al igual que en los otros procesos, en cada periodo se evaluó la influencia de la temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto sobre la eliminación biológica de fósforo.

En la Tabla 34 se muestran los valores de todos los parámetros evaluados en el seguimiento del proceso biológico de eliminación biológica de fósforo.

Tabla 34. Evolución de la concentración de fósforo durante la etapa I.

Parámetro	Periodo	Media	δ
P-PO₄ Afluente (mg P-PO₄·l⁻¹)	I.1	5,8	1,4
	I.2	5,5	0,9
	I.3	6,1	1,9
	I.4	6,3	1,9
P-PO₄ Efluente (mg P-PO₄·l⁻¹)	I.1	3,5	1,7
	I.2	2,1	1,1
	I.3	3,1	0,9
	I.4	2,5	1,2
P Total Reactor aerobio (mg P-PO₄·l⁻¹)	I.1	55,5	12,3
	I.2	54,7	10,7
	I.3	75,5	6,3
	I.4	72,4	2,3
%P-PO₄ Eliminado	I.1	49,1	1,8
	I.2	60,3	1,6
	I.3	60,0	1,3
	I.4	64,7	2,1

* δ desviación estándar

- En la Tabla 33 se puede observar que la concentración de ortofosfato en el afluente ha sido muy estable. En el periodo I.1, el porcentaje de fósforo eliminado fue del 49,1%, inferior al observado en el resto de periodos de la etapa. Este menor rendimiento se puede achacar a la concentración de nitratos recirculados desde la zona anóxica hacia la anaerobia desfavoreciendo a los organismos PAO. Si la zona anaerobia recibe abundantes nitratos, las bacterias heterótrofas desnitrificantes consumirán la materia orgánica fácilmente biodegradable destinada a las bacterias PAO. Esta situación podría corregirse modificando el caudal de la corriente de recirculación de la zona anóxica a la anaerobia. Sin embargo, durante esta etapa no se modificó, si bien el resultado no es favorable para la eliminación biológica de fósforo se decidió trabajar en esta condición para mantener una concentración adecuada de sólidos suspendidos en la zona anaerobia.
- En los periodos I.2, I.3 y I.4 el porcentaje de fósforo eliminado aumentó y fue del 60,3%, 60,0% y 64,7%, respectivamente. Paralelamente se observó un aumento en la concentración de fósforo total indicando el crecimiento de organismos PAO. Este aumento se vio favorecido por el deterioro de la nitrificación y a la estabilidad obtenida en el porcentaje de desnitrificación en todos los periodos y la consecuente disminución de la cantidad de nitratos recirculados. Este hecho provoca el crecimiento de los organismos acumuladores de polifosfatos y, por tanto, el aumento del fósforo total en la zona aerobia.

En general, asumiendo que aproximadamente entre un 1,7 – 2,0 % de los sólidos suspendidos volátiles corresponde al fósforo utilizado como nutriente por los organismos presentes en el sistema, podría estimarse el fósforo consumido como nutriente (Metcalf y Eddy, 1991; Ferrer y Seco, 2007). El valor promedio estimado de fósforo como nutriente en esta etapa es de

0,29 mg·l⁻¹, para una concentración promedio de sólidos suspendidos volátiles de 1091 mgSSV·l⁻¹. Este valor es menor que el fósforo realmente eliminado, siendo su valor promedio en esta etapa de 3,1 mg·l⁻¹. Es decir el rendimiento obtenido es mayor que el requisito nutricional, indicando la presencia de organismos PAO. Además, el incremento en la concentración de fósforo total indica una mayor toma de fósforo en la zona aerobia. En la Figura 50 se pueden ver los resultados obtenidos en el análisis microbiológico realizado durante el seguimiento del proceso de eliminación biológica de fósforo. En la figura se puede ver que la abundancia de estos organismos aumentó respecto al inóculo. En los periodos I.1, I.2 y I.3, la abundancia de organismos PAO fue estable. El crecimiento de organismos PAO observado en el periodo I.4 podría estar relacionado con el aumento de la concentración de AGV en el afluente, motivo por el cual aumentó levemente el porcentaje de fósforo eliminado.

Abundancia de organismos PAO etapa I

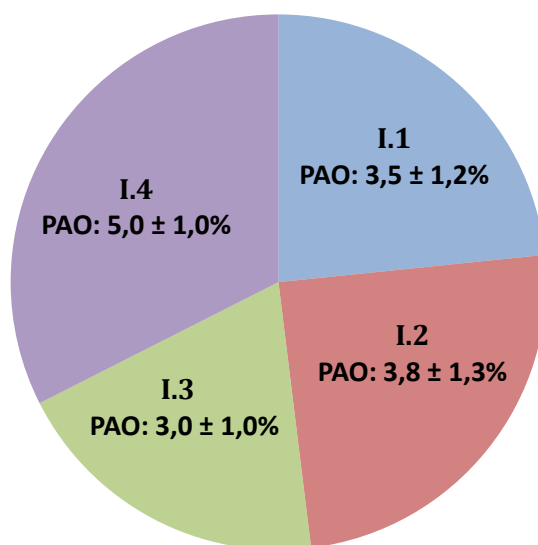


Figura 50. Abundancia de organismos PAO durante la etapa I.

La Figura 51 muestra la evolución de la concentración de ortofosfato, fósforo total, temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto en la etapa I. A continuación se analizará la influencia de la temperatura, ácidos grasos volátiles y sulfuro sobre el proceso de eliminación biológica de fósforo.

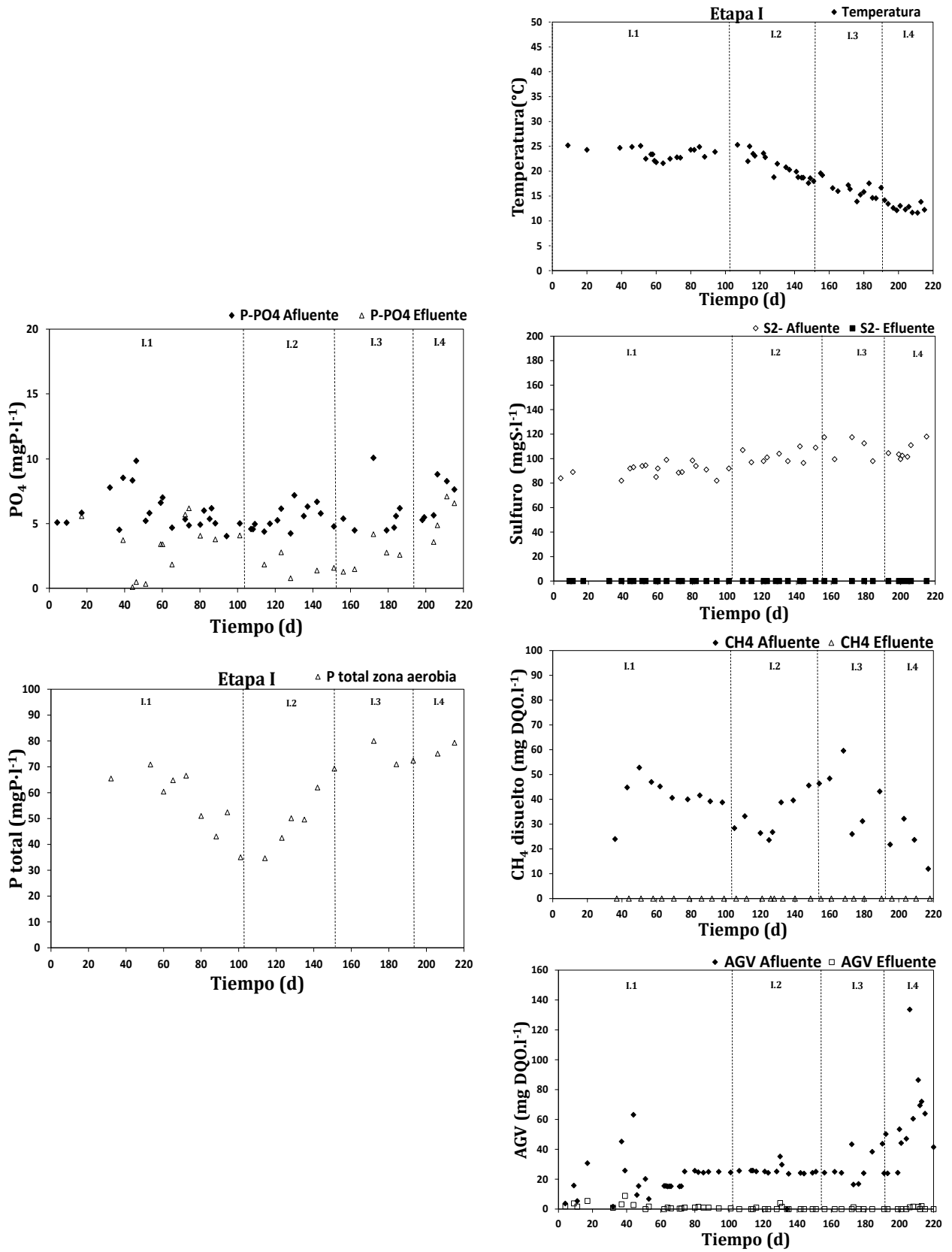


Figura 51. Influencia de las características del afluente sobre la eliminación biológica de fósforo.

Temperatura.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la temperatura es una variable que influye notablemente sobre los procesos biológicos. Sin embargo, estudios realizados por algunos autores mencionan que el descenso de la temperatura hasta 5°C, no posee una influencia significativa en la eficiencia del proceso de eliminación biológica de fósforo. En estudios realizados por Whang y Park (2006) en un reactor discontinuo, observaron que al aumentar la temperatura entre 20 y 30 °C disminuía ligeramente el consumo de AGV por parte de las PAO. En el periodo I.1, la temperatura media fue de 23,5°C (Figura 51), encontrándose dentro de unos valores recomendables para la eliminación biológica de fósforo. Por tanto, la baja eliminación de fósforo obtenida en este periodo debe achacarse a otros factores como la recirculación de nitratos desde la etapa anóxica y la baja disponibilidad de AGV.

- En esta etapa, se observó que a pesar del descenso de temperatura en entre los periodos I.1, I.2 y I.3, la eficiencia del proceso no se vio afectada (Tabla 34).
- Durante el periodo I.4, la temperatura media continuó descendiendo hasta los 12,7 °C. García-Usach (2002) menciona que el proceso de eliminación biológica de fósforo puede verse afectado por el descenso de la temperatura, referido al estudio realizado a un TRC de 10 días y una temperatura de 13 °C. No obstante, existen diversas opiniones sobre la influencia de la temperatura sobre el proceso de EBPR. Según Helmer y Kunt (1998), una bajada de temperatura de 15°C a 10°C y posteriormente a 5°C no posee una influencia significativa sobre el proceso. Marklund y Morling (1994) en un reactor batch, observaron un descenso agudo de la eficiencia cuando la temperatura del agua residual descendía por debajo de 5°C.

En esta etapa se observó que el porcentaje de eliminación de fósforo permaneció casi igual que en los periodos anteriores cuando la temperatura era mayor, indicando que este parámetro no fue determinante sobre la eliminación de fósforo.

Ácidos grasos volátiles y sulfuro.

- Un aspecto importante, que se ha mencionado anteriormente, es que durante el periodo I.1 es donde existe una menor disponibilidad de AGV, lo que contribuye a una reducción en el porcentaje de eliminación de fósforo. La disponibilidad de AGV destinados a los organismos PAO dependerá si existe o no una recirculación de nitratos significativa desde la zona anóxica a la anaerobia. Según Grady *et al.* 1999 existe una relación DQO/P_T en el afluente que se define como la cantidad de materia orgánica necesaria para eliminar una unidad de fósforo. Esta relación marcará el grado de eficacia de dicho proceso. El valor óptimo puede variar según el esquema de tratamiento y las condiciones de operación, encontrándose diversos valores para esta relación según el proceso. Según Grady *et al.* 1999, para esquemas de tratamiento de alta eficacia como el UCT este valor se sitúa entre 26 y 34, para esquemas de moderada eficacia entre 34 y 43, y para esquemas de baja eficacia mayores a 43. En este estudio el valor de la relación DQO_t/P_T fue de 41 siendo mayor que lo reportado por Grady *et al.* 1999. La DQO utilizada en esta relación corresponde con la suma de todos los dadores de electrones presentes en el afluente (Sulfuro, metano y ácidos grasos volátiles). Teniendo en cuenta que en principio las PAO sólo utilizan la DQO aportada por los AGV presentes, la relación AGV/P_T es de 6,0.
- La mayor disponibilidad de AGV para las PAO en la etapa anaerobia debido al aumento de estos en el afluente, ocasionó que en los

periodos I.2, I.3 y I.4, la eliminación biológica de fósforo fuera mayor que en los periodos anteriores (Tabla 34).

- En relación a la influencia del sulfuro sobre la eliminación biológica de fósforo, estudios realizados por Wu *et al.* (2013) durante el estudio del proceso denominado SANI, observaron que la eliminación biológica de fósforo se ve favorecida por la presencia de compuestos de azufre presentes. En el estudio se menciona que en condiciones anaerobias existen organismos capaces de tomar AGV y compuestos de azufre como el sulfato, sulfuro o tiosulfato y almacenarlos en forma de polidroxialcanoato PHA y Poly-S²/S⁰ liberando al mismo tiempo fósforo. En condiciones aerobias estos organismos utilizan el PHA y el Poly-S²/S⁰ como fuente de energía para su crecimiento y para la toma de los polifosfatos.

El proceso SANI que integra eliminación biológica de fósforo permite la absorción de fosfato y la formación de polifosfato en el reactor. Este hecho fue justificado mediante las siguientes observaciones:

- a) La liberación de fosfato asociada al consumo de la materia orgánica (AGV) y compuestos de azufre como el sulfato o tiosulfato en la zona anaerobia, que permitió la formación y almacenamiento de PHA y Poly-S²/S⁰. Por otra parte, el uso como fuente de energía en la zona aerobia del PHA y de los Poly-S²/S⁰ almacenados, para el crecimiento microbiano y la acumulación de los polifosfatos.
- b) El uso de compuestos de azufre fue confirmado por la presencia de PHA, poli-P y glóbulos de azufre (S⁰) en la biomasa.

Un aspecto muy importante observado por este autor es que durante la etapa anaerobia se almacenaba una mayor cantidad de PHA en presencia de compuestos de azufre como sulfuro, tiosulfato y sulfato. En los resultados obtenidos por Wu *et al.* (2014) es posible obtener relaciones de liberación de fósforo y reducción de sulfato en condiciones anaerobias en torno a $1,0 \text{ mgP} \cdot \text{mgS}^{-1}$.

Aunque en este trabajo de tesis no se determinó si los organismos acumuladores de polifosfatos (PAO) presentes en la planta piloto estaban usando los compuestos de azufre, no se descarta que el sulfuro, tiosulfato y sulfato presentes en la etapa anaerobia fueran usados por las PAO para la formación de Poly-S²/S⁰, contribuyendo a la eliminación biológica de fósforo en el sistema.

En general, en la etapa I, la diferencia entre los porcentajes de eliminación de fósforo observados determina que, cuando no existe una recirculación de nitratos significativa hacia la zona anaerobia, la eliminación biológica de fósforo se ve favorecida, debido a que los AGV presentes en el afluente pueden ser utilizados por los organismos PAO.

El descenso de temperatura en esta etapa no fue un parámetro limitante del proceso, ya que se obtuvieron en los periodos estudiados rendimientos de eliminación entre un 49% y 64%. Según Grady *et al.* 1999, el proceso de EBPR se ve favorecido a bajos TRC en la etapa anaerobia, es decir aproximadamente un 25 al 30% del TRC total del sistema. En esta etapa el TRC en la zona anaerobia fue de $2 \pm 0,5$ días aproximadamente, que supone entre un 7 - 10% del TRC total.

Durante el periodo I.2 se observó un incremento en la concentración de fósforo total en el reactor aerobio, que posteriormente se estabilizó en los periodos I.3 y I.4.

4.2.2 Etapa II (310 a 445 días)

Al final de la etapa I se presentó un fallo operacional que produjo una pérdida importante de sólidos a través del decantador. Debido a este fallo, y con el objetivo de mantener el sistema, se realizó un aporte con 100 litros de fango procedente de la EDAR Quart-Benàger, Valencia.

Durante los días 230 al 300 se continuó con el seguimiento del proceso, pero se observó un crecimiento excesivo de organismos filamentosos en el proceso, que generaron problemas de decantación e impidieron obtener resultados significativos, motivo por el cual, estos días no se encuentran representados en la etapa I. Tras los fallos presentados, se decidió parar el sistema e inocular nuevamente antes de empezar la etapa II.

En la etapa II se inculó el sistema con fango procedente de la EDAR del Carraixet (Alboraya, Valencia) con el fin de adaptar nuevamente la biomasa a las características del afluente. En esta etapa y teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta ese momento se decidió operar el sistema a un tiempo de retención hidráulico (TRH) mayor y estudiar el efecto sobre los procesos implicados.

Las características del fango inoculado se presentan en la Tabla 35. El análisis microbiológico del inóculo mostró la presencia de organismos amonioxidantes (AOB), nitritooxidantes (NOB), desnitrificantes (DEN), sulfatorreductoras (SRB), acumuladoras de polifosfatos (PAO) y metanotróficos (Met) del tipo I y II. A diferencia del inóculo empleado en la etapa I, se observó una menor abundancia de organismos AOB y DEN en este nuevo inóculo.

Tabla 35. Características del inóculo durante la etapa II.

Etapa II	
Volumen (l)	200
SST (mg·l⁻¹)	2150
SSV(%)	86,2
AOB (%)	2 ± 1
NOB (%)	3 ± 2
DEN (%)	5 ± 1
SRB (%)	1 ± 1
PAO (%)	1 ± 1
Met tipo I (%)	1 ± 1
Met tipo II (%)	1 ± 1

El fango inoculado se mezcló con el efluente SAnMBR hasta completar el volumen total de la planta piloto, lo que llevó a una concentración de sólidos suspendidos totales en el sistema en torno a 1300 mg·l⁻¹. Los parámetros físico-químicos del afluente a la planta piloto en esta etapa se presentan en la Tabla 36.

Tabla 36. Parámetros físico-químicos del afluente durante la etapa II.

ETAPA II			
Parámetro	Unidad	Media	δ
N-NH₄	(mgN·l⁻¹)	51,8	7,3
N-NO₃	(mgN·l⁻¹)	<1	" "
N-NO₂	(mgN·l⁻¹)	<1	" "
P-PO₄	(mgP·l⁻¹)	7,3	1,4
S-H₂S	(mgS·l⁻¹)	105,5	13,0
S-SO₄	(mgS·l⁻¹)	6,6	3,1
AGV	(mg DQO·l⁻¹)	27,1	5,4
DQO soluble	(mg DQO·l⁻¹)	279,6	42,5
CH₄ disuelto	(mg DQO·l⁻¹)	41,4	11,8
ALK	(mg CaCO₃·l⁻¹)	675,4	89,6
pH		7,3	0,2

*δ desviación estándar

En esta etapa se trabajó a un TRH en torno a 26h, que supone aproximadamente el doble del TRH de la etapa I, aunque la relación entre la concentración de sulfuro y amonio ($S^2/N-NH_4$) se mantiene aproximadamente constante e igual que en la etapa I. Este aumento se realizó utilizando los resultados obtenidos en la etapa I y en el ensayo respirométrico realizado en la etapa I, donde se observó que los organismos nitrificantes recuperaban la actividad nitrificante cuando la concentración de sulfuro disminuía o desaparecía del sistema. El aumento del TRH permitiría determinar si el efecto inhibitorio del sulfuro sobre la nitrificación desaparecería al disminuir la carga de sulfuro al sistema, permitiendo obtener mayores rendimientos en la eliminación de nitrógeno.

En esta etapa, la temperatura no se controló y varió en función de las características del ambiente. El pH al final de la zona aerobia osciló entre 7,1 y 7,7 y la concentración de OD se mantuvo entre 1,5 y 2,0 mg l^{-1} .

En la Tabla 36 se muestran los valores medios y la desviación estándar de las condiciones operacionales en esta etapa. La etapa II se dividió en 2 periodos (II.1 y II.2) en función de la temperatura y el tiempo de retención celular (TRC).

La Figura 52 muestra la evolución del TRC durante esta etapa. Durante el inicio del periodo II.1 se ajustó la purga de fango del sistema para un TRC en torno a 20 días. Con las condiciones operacionales que se muestran en la Tabla 37 el porcentaje de nitrificación alcanzado en este periodo fue del 99,3%. Teniendo en cuenta que la nitrificación estaba bien establecida y la temperatura del sistema seguía una tendencia ascendente, en el periodo II.2 se decidió disminuir el TRC hasta 18 días, con el fin de determinar la influencia de este parámetro sobre el proceso. Con estas condiciones de operación el porcentaje de nitrificación alcanzado en este periodo fue del 83,2%.

En general, se observó que en la etapa II la nitrificación estaba bien establecida con rendimientos en la nitrificación superiores al 80%. El aumento en el TRH pudo ser un parámetro determinante en esta etapa que favoreció el proceso de nitrificación.

Tabla 37. Condiciones medias de operación en la etapa II.

Parámetro	Periodo	Media	δ
TRH (h)	II.1	24,3	0,8
	II.2	25,1	0,2
TRC (d)	II.1	22,5	2,1
	II.2	18,0	2,6
T (°C)	II.1	14,9	2,2
	II.2	22,0	2,1
% Nitrificación	II.1	99,3	
	II.2	83,2	

* δ desviación estándar

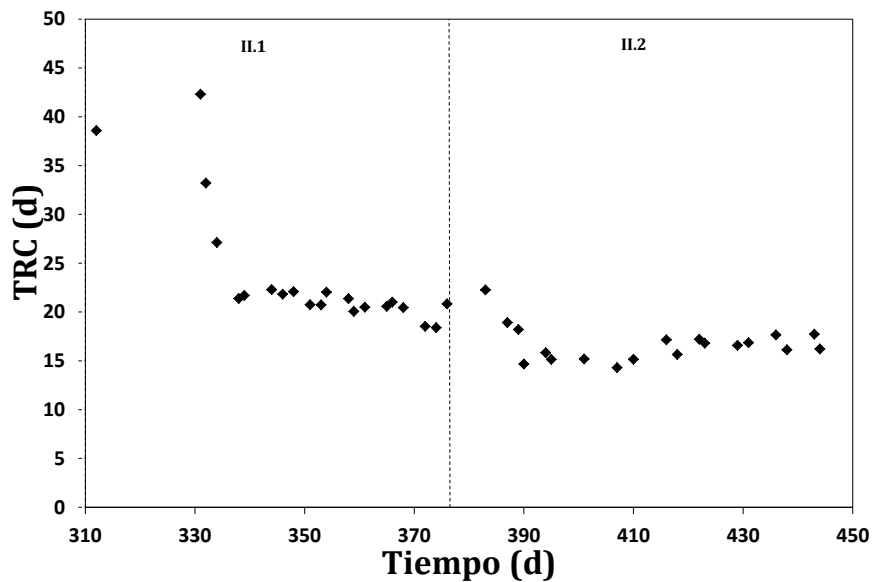


Figura 52. Evolución del TRC durante la etapa II.

El seguimiento analítico y la discusión de los resultados obtenidos en cada proceso estudiado (nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo) se presentan a continuación. La Figura 53 muestra las concentraciones de todos los parámetros analizados.

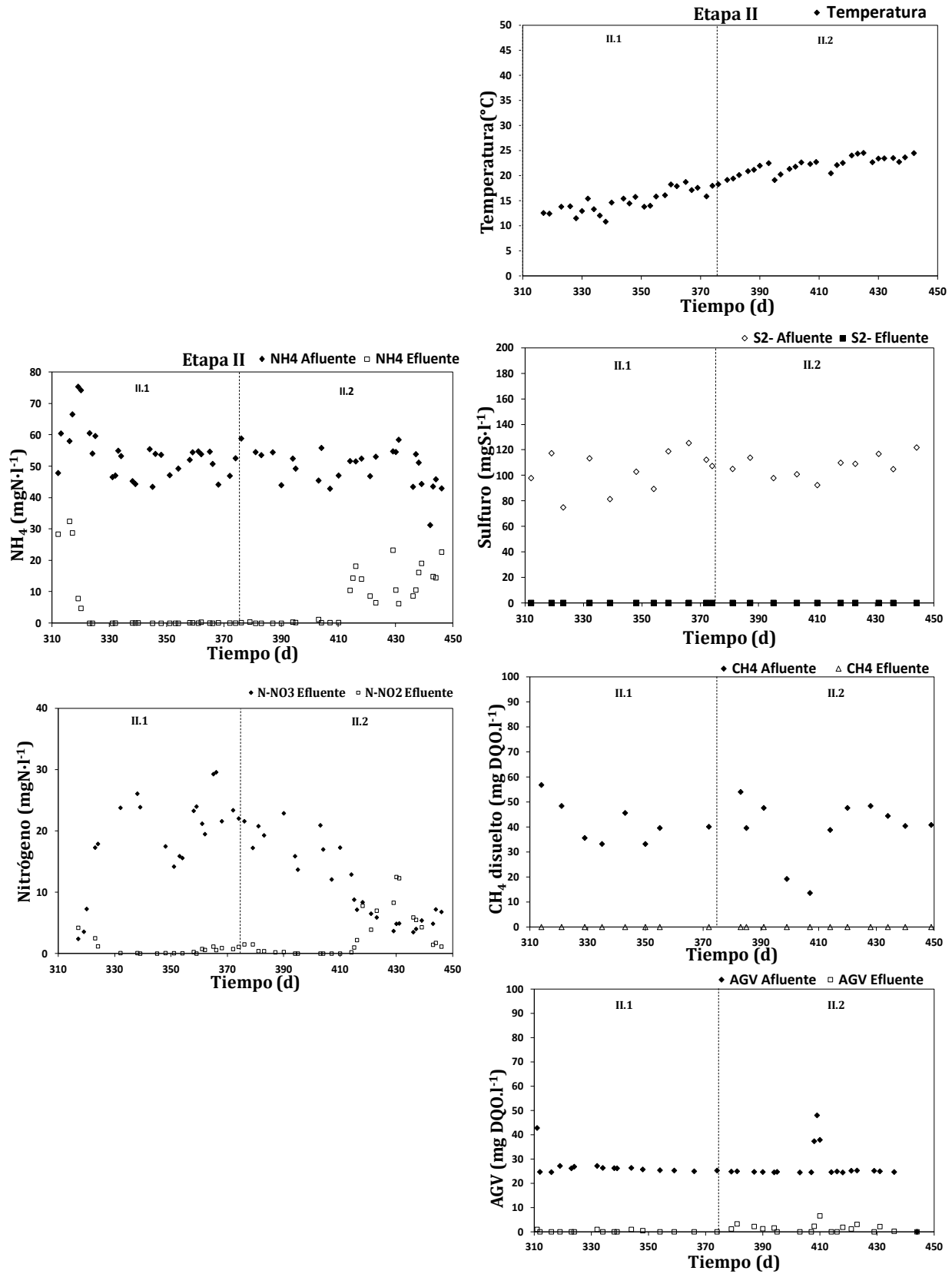


Figura 53. Influencia de las características del afluente sobre la nitrificación.

4.2.2.1 Nitrificación

El estudio del proceso de nitrificación en la etapa II se realizó mediante el seguimiento en cada periodo de la concentración de amonio, nitrito y nitrato en el afluente y en el efluente de la planta piloto (Figura 53).

Los datos obtenidos en el estudio microbiológico realizado corresponden con valores medios en cada periodo. Las sondas empleadas en la técnica FISH están descritas en el apartado 3.2.1.

El análisis de la información obtenida se discute a continuación:

- Durante el periodo II.1 se observó que la nitrificación se estabilizó rápidamente, obteniéndose un porcentaje de nitrificación del 99,3% a partir del día 320. Esta rápida estabilización de la nitrificación podría estar relacionada con el TRH empleado en esta etapa y el nuevo inóculo empleado. Al aumentar el TRH y disminuir la carga de sulfuro al sistema, se observó que el efecto inhibitor del sulfuro sobre los organismos nitrificantes desapareció.
- Durante el periodo II.2 se disminuyó el TRC hasta 18 días, con el objetivo de comprobar si el comportamiento de la nitrificación era estable a menores TRC. Inicialmente no se observaron cambios importantes en la nitrificación, hasta que el día 410 se presentaron problemas operacionales en la planta SAnMBR que dejaron al sistema sin afluente durante 2 días, provocando que el proceso de nitrificación se desestabilizará. A pesar de esto, el porcentaje de nitrificación obtenido hasta antes del problema operacional fue superior al 90%, con un valor promedio en todo el periodo del 83%. Después del fallo se observó un aumento de la concentración de nitritos en el sistema, debido a que los organismos nitritooxidantes (NOB) no consumían todo el nitrito producido, indicando que frente a

este tipo de fallos operacionales estos organismos parecen ser más sensibles. Al final de este periodo a pesar de que la temperatura estaba aumentando y el TRC fijado era adecuado para la nitrificación, no se observó un funcionamiento óptimo de la nitrificación.

- Para apoyar los resultados obtenidos en esta etapa, se realizó el estudio microbiológico con el objetivo de identificar y cuantificar los organismos nitrificantes presentes en el sistema. El porcentaje de organismos viables en esta etapa fue del 92%. Los resultados que se presentan en la Figura 54 muestran que, con respecto al inóculo, el porcentaje de organismos amonioxidantes (AOB) y nitritooxidantes (NOB) aumentó en ambos periodos, corroborando el comportamiento de la nitrificación observado en esta etapa. Sin embargo, la abundancia de organismos NOB disminuyó en el periodo II.2 respecto periodo II.1, lo cual corrobora la acumulación de nitrito observada en este periodo.

Abundancia de organismos AOB y NOB etapa II

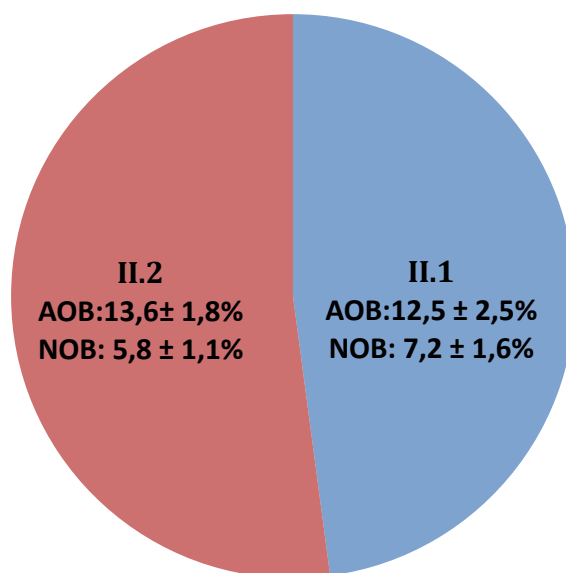


Figura 54. Abundancia de organismos AOB y NOB durante la etapa II.

Según los resultados expuestos hasta el momento, se pretende a continuación estudiar para esta etapa el efecto de la temperatura, la concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto sobre la nitrificación.

Temperatura.

- En el periodo II.1, se observa un incremento paulatino de la temperatura ambiente que pasa de 13,6°C en el inicio del periodo hasta 19,4 °C al final del periodo (Figura 53). Tal y como se mencionó en la etapa anterior, los cambios de temperatura afectan notablemente el rendimiento de los organismos nitrificantes. La temperatura seguía una tendencia ascendente desde el inicio, lo que favoreció el desarrollo de estos organismos. Comparando estos resultados con los obtenidos en la etapa I, se observa que la nitrificación en el periodo II.1 fue buena desde el principio a pesar de que la temperatura al inicio era baja y similar a las obtenidas en los periodos de la etapa I. Esto permite indicar que la temperatura en el periodo II.1 no fue la variable limitante del proceso o al menos la única. Algunos autores afirman que para poder llegar a disminuir drásticamente la velocidad de los organismos nitrificantes se necesitan temperaturas inferiores a 15 °C (Hellings *et al.* 1998).
- La temperatura en el periodo II.2 fue superior a 20°C siendo un valor recomendable para llevar a cabo el proceso de nitrificación.

Concentración de sulfuro de hidrógeno.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los periodos de la etapa II con respecto al sulfuro:

- En el periodo II.1 la concentración media de sulfuro fue de $103,8 \pm 16,2 \text{ mgS} \cdot \text{l}^{-1}$. Teniendo en cuenta que en esta etapa el caudal de

entrada fue de $32 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$, la concentración de sulfuro calculada por balance en la zona anaerobia es de aproximadamente $33,4 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$. Comparando con la etapa I esta concentración en la zona anaerobia es similar ya que se mantiene la misma relación de caudales. Según lo mencionado por algunos autores, concentraciones superiores a $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ puede inhibir el proceso de nitrificación. En este caso, a pesar de ser una concentración elevada y que podría llegar a inhibir a los organismos nitrificantes no se observó ninguna inhibición. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que el sulfuro podría estar oxidándose rápidamente a sulfato a lo largo de las zonas anaerobias y anóxicas en presencia de microorganismos antes de llegar a la zona aerobia donde se lleva a cabo la nitrificación.

- En el periodo II.2, la concentración media de sulfuro de hidrógeno fue de $107,3\pm 8,9 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$ similar al periodo II.1 tal y como se observa en la Figura 53. A pesar de ser una concentración elevada no se observó inhibición de la nitrificación.
- La Figura 55 muestra el seguimiento en la etapa II de la concentración de sulfuro en el afluente y la concentración de sulfato en el efluente. Al igual que en la etapa I, la gráfica permite observar que una vez el sulfuro entra al sistema en presencia de organismos y pasa por las distintas zonas es oxidado casi en su totalidad a sulfato.

En la etapa I se ha comentado que el sulfuro presenta una elevada influencia sobre la nitrificación llegando a inhibir a los organismos nitrificantes. Los resultados obtenidos durante el seguimiento del proceso y en el ensayo explicado al final del apartado 4.2.1.1 mostraron que los organismos nitrificantes recuperan la actividad nitrificante cuando dejan de estar expuestos a una concentración constante de sulfuro. También se observó que el sulfuro presente en el medio desaparece o se transforma a sulfato. Las condiciones fijadas en la etapa I no permitieron obtener los

máximos rendimientos en el proceso de nitrificación. Sin embargo, en la etapa II, con el aumento del TRH se observaron mejores rendimientos en la nitrificación. Comparando las concentraciones de sulfuro medidas en la zona anaerobia en la etapa I ($9,3 \text{ mgS l}^{-1}$) y II ($7,8 \text{ mgS l}^{-1}$) se observó que en la concentración en la etapa II es levemente menor, indicando una mayor oxidación del sulfuro en la etapa anaerobia. Es decir, el aumento del TRH en la etapa II permitió una mayor oxidación del sulfuro antes de llegar a la zona anóxica y posteriormente a la aerobia.

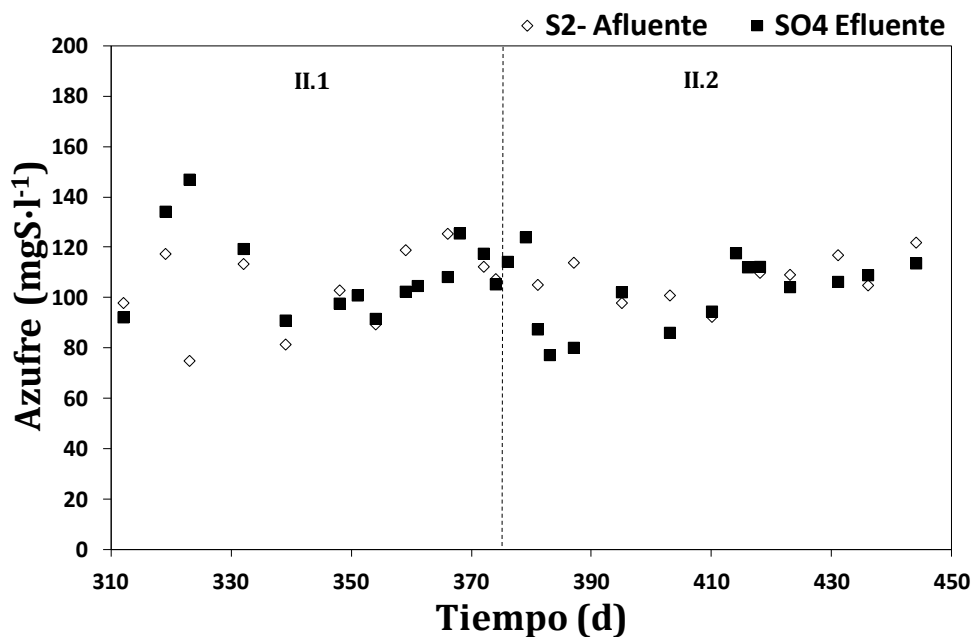


Figura 55. Evolución de la concentración de sulfuro y sulfato en el afluyente y efluente, etapa II.

Para complementar el estudio llevado a cabo hasta el momento y obtener resultados concluyentes con respecto al sulfuro, se plantearon unos experimentos que permitieron profundizar en el tema. Los experimentos planteados fueron llevados a cabo en laboratorio, sometiendo a la biomasa activa de la planta piloto a concentraciones de sulfuro similares a las encontradas en el proceso. Los resultados obtenidos en los experimentos se presentan en el apartado 4.2.5 (Ensayos en laboratorio).

Concentración de ácidos grasos volátiles y metano disuelto

- La concentración de AGV y metano disuelto en esta etapa, al igual que en la etapa I fue baja (Tabla 39), y no se observaron problemas de organismos filamentosos durante el seguimiento del proceso. La importancia que tiene la presencia de estos compuestos sobre los procesos de desnitrificación y eliminación biológica de fósforo se discutirán más adelante.

En general, durante la etapa II, se observó que el grado de nitrificación en ambos periodos fue muy estable y superior al 80%. Este hecho podría estar relacionado con el aumento del TRH en esta etapa, que conllevó una disminución de la concentración de sulfuro en la zona anaerobia. Este aumento del TRH permitiría que el sulfuro fuera oxidado rápidamente antes de inhibir a los organismos nitrificantes. Con respecto al cambio en el TRC no se observó un efecto negativo importante sobre el proceso, a pesar de la inestabilidad en la nitrificación observada al final del periodo II.2, atribuida principalmente a los problemas operacionales en la planta SAnMBR. El TRH y la temperatura en esta etapa fueron favorables para el crecimiento de los organismos nitrificantes.

Una conclusión inmediata, obtenida a la vista de los resultados comentados anteriormente, es que con el aumento del TRH en esta etapa se logró aumentar el porcentaje de nitrificación.

4.2.2.2 Desnitrificación

El estudio del proceso de desnitrificación en la etapa II se realizó mediante el seguimiento en cada periodo de la concentración de nitrito y nitrato en el efluente y en la etapa anóxica. Se analizará en este apartado la influencia de la temperatura, la concentración de sulfuro, ácidos grasos volátiles (AGV) y metano disuelto sobre la desnitrificación. En la Tablas 38 se muestran las

concentraciones medias de los compuestos de nitrógeno en el afluente y efluente durante los dos periodos estudiados en esta etapa. La Tabla 39 muestra la concentración media de nitrito y nitrato al final de la etapa anóxica.

También, se presenta en la Tabla 38 el porcentaje de nitrógeno eliminado y el grado de desnitrificación obtenido en cada periodo. Los rendimientos fueron obtenidos con el balance de nitrógeno realizado en el sistema y considerando que todo el amonio que desaparece ha sido nitrificado.

Tabla 38. Concentración media de amonio, nitrito y nitrato en el afluente y efluente en la etapa II.

Periodo	AFLUENTE (mg N·l ⁻¹)		EFLUENTE (mg N·l ⁻¹)							
	NH ₄	δ	NH ₄	δ	NO ₂	δ	NO ₃	δ	% N _{Eliminado}	% Desnit
II.1	54,0	7,8	3,8	8,3	1,8	3,6	18,2	7,8	55,9	60,1
II.2	49,2	5,9	8,5	7,8	3,0	3,8	12,1	9,7	52,0	62,8

*δ desviación estándar, %Desnit (Desnitrificación)

Tabla 39. Concentración media de nitrito y nitrato al final de la etapa anóxica.

ETAPA II				
Periodo	NO ₂ (mg N·l ⁻¹)	δ	NO ₃ (mg N·l ⁻¹)	δ
II.1	5,4	3,4	3,8	3,0
II.2	0,9	1,5	1,6	1,5

*δ desviación estándar

- En el periodo II.1, el porcentaje de nitrógeno eliminado fue del 55,9% y el porcentaje de desnitrificación alcanzado del 60,1%. Como se puede observar en la Tabla 39, no todo el nitrito y nitrato fueron eliminados en la etapa anóxica. Este hecho pudo haber sido provocado por varios factores, tales como una baja abundancia de organismos desnitrificantes o una baja disponibilidad de materia orgánica en forma de AGV u otros dadores de electrones tales como el sulfuro y el metano disuelto.

- Durante el periodo II.2, el porcentaje de nitrógeno eliminado fue del 52,0% y el porcentaje de desnitrificación fue del 62,8%, similar a los del periodo anterior.

No obstante, en ambos periodos de esta etapa no se observó una elevada concentración de materia orgánica en forma de AGV (Figura 53), por lo que también se hace necesario evaluar la participación de otros dadores de electrones tales como el sulfuro y el metano disuelto en el proceso de desnitrificación.

Por otro lado, los resultados obtenidos fueron contrastados con el seguimiento microbiológico realizado en esta etapa empleando la técnica FISH. Los organismos desnitrificantes y metanotróficos tipo I y II fueron hibridados con las sondas AT1458, Mg84 y Ma464 respectivamente. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 56. Se observa que los organismos desnitrificantes y metanotróficos aumentaron respecto al inóculo en el periodo II.2 que corresponde con el periodo donde se obtuvo un mayor porcentaje de desnitrificación. También, se observó en el periodo II.2 que la abundancia de organismos tipo I disminuyó respecto al periodo anterior y los organismos tipo II aumentaron levemente.

En general, en esta etapa se observa que el total de organismos metanotróficos se mantiene en ambos periodos, distribuidos entre los organismos tipo I y II. Cabe recordar que son los del tipo I los que crecen a bajas concentraciones de metano. La presencia y el crecimiento de estos organismos respecto al inóculo, indica que el metano disuelto está siendo empleado como sustrato por estos organismos.

Abundancia de organismos heterótrofos desnitrificantes y metanótrofos (Tipo I y II)

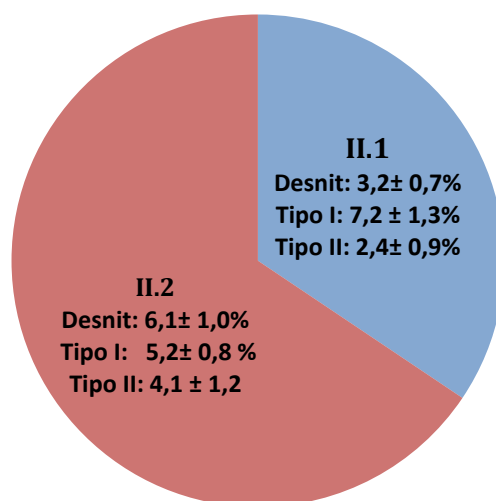


Figura 56. Abundancia de organismos desnitrificantes y metanotróficos etapa II.

A continuación se analizará la influencia de la temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto sobre el proceso de desnitrificación. La Figura 57 muestra la evolución de los parámetros medidos durante el seguimiento del proceso.

Temperatura.

- En la Figura 57 se puede observar que desde el inicio de la etapa II, la temperatura seguía una tendencia ascendente, alcanzando al final del periodo II.1 valores cercanos a 20°C y del periodo II.2 cercanos a 25°C. Según Gujer *et al.* (1995), el aumento de la temperatura favorece la velocidad de crecimiento de los organismos heterótrofos desnitrificantes en un intervalo de temperatura entre 15-25°C. Este hecho podría explicar que la abundancia de los organismos desnitrificantes en el periodo II.2 fuera mayor respecto al periodo anterior tal y como se muestra en la Figura 56.

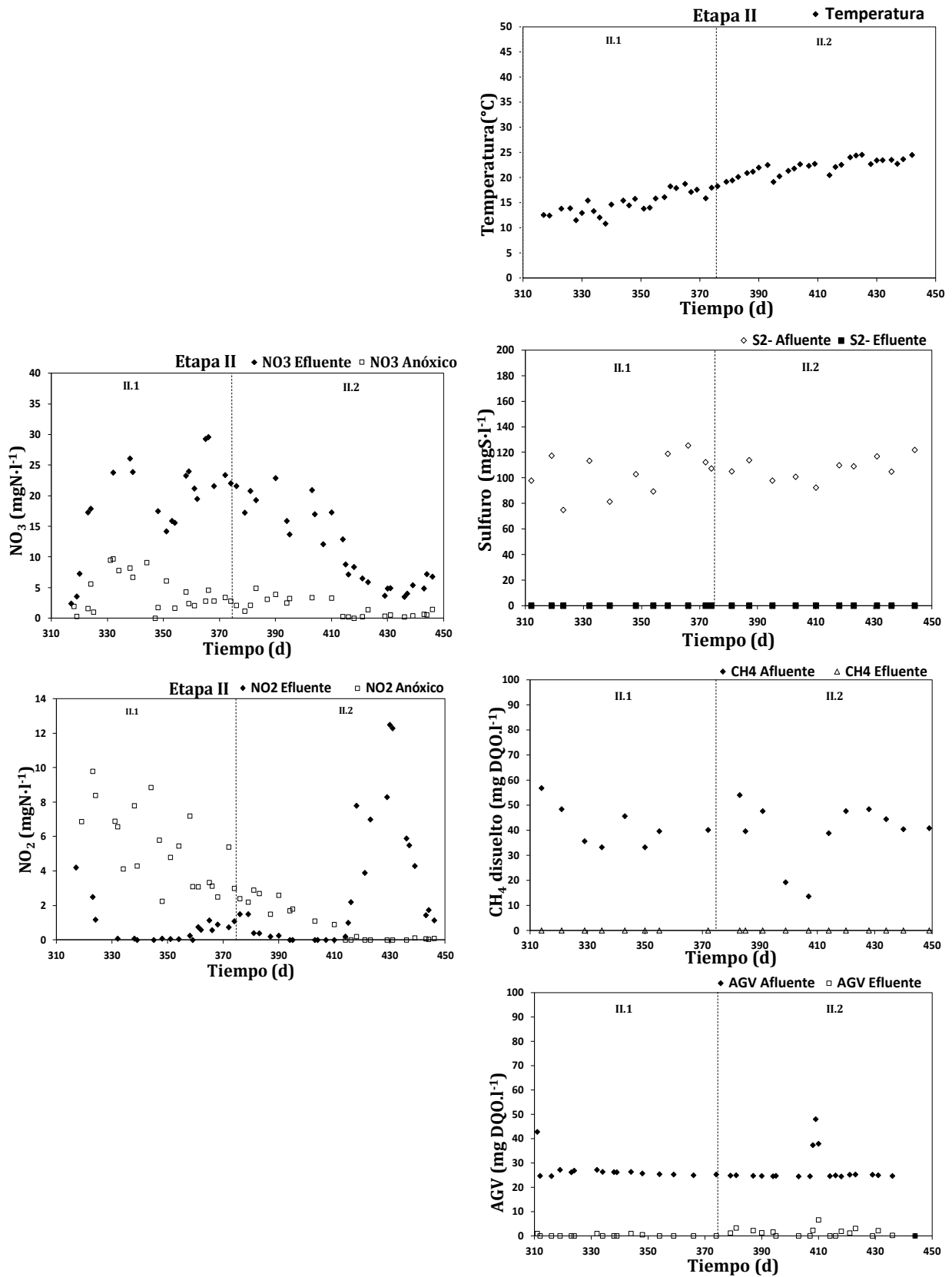


Figura 57. Influencia de las características del afluente sobre la desnitrificación en la etapa II.

Concentración de ácidos grasos volátiles, sulfuro de hidrógeno y metano disuelto.

La Tabla 40 muestra los valores medios de la concentración de la DQO disponible en el afluente aportada por los AGV, sulfuro y metano disuelto. También, se muestra la DQO requerida, el porcentaje de nitrógeno eliminado y de desnitrificación en cada periodo.

Tabla 40. Concentración de AGV, sulfuro y metano presentes en el afluente, DQO requerida, nitrógeno eliminado y porcentaje de desnitrificación en la etapa II.

Parámetro	Periodo	Media	δ
AGV (mg DQO·l ⁻¹)	II.1	26,9	4,2
	II.2	27,3	6,4
S-S ⁻² (mg DQO·l ⁻¹)	II.1	207,6	32,4
	II.2	214,6	17,8
CH ₄ disuelto (mg DQO·l ⁻¹)	II.1	44,1	10,5
	II.2	39,3	13,0
DQO requerida (mg DQO·l ⁻¹)	II.1	141,4	2,8
	II.2	112,9	3,1
N Eliminado (%)	II.1	55,9	14,6
	II.2	52,0	7,7
Desnit (%)	II.1	60,1	6,3
	II.2	62,8	4,8

* δ desviación estándar, %Desnit (Desnitrificación)

La DQO requerida se calculó empleando las ecuaciones 27, 28 y 29 tal y como se explicó en la etapa I. El valor de la DQO requerida se comparó con la DQO disponible en el afluente. Esta comparación permitió estimar el potencial de desnitrificación del efluente SAnMBR. Es decir, si la DQO disponible en el afluente sería suficiente para eliminar todo el nitrato formado en esta etapa, es decir todo el amonio nitrificado.

- En los periodos II.1 y II.2, el porcentaje de nitrógeno eliminado y de desnitrificación obtenido se mantuvo en torno al 55% y 60% respectivamente. En la Tabla 40 se puede ver que la DQO disponible

en forma de AGV es menor que la DQO requerida en ambos periodos. Según esto, la concentración de AGV en estos periodos no era suficiente para desnitrificar todo el nitrato formado en estos periodos. Al igual que en la etapa I, se presume que es necesaria la contribución de otros dadores de electrones tales como el sulfuro o el metano disuelto en la desnitrificación. Como se puede ver en la Tabla 40, con solo la concentración de sulfuro presente podría desnitrificarse todo el nitrato formado en cada periodo, sin embargo esto no se observó. Este hecho podría explicarse debido a que el sulfuro presente puede estar oxidándose rápidamente en presencia de oxígeno hasta sulfato perdiendo el sistema capacidad de desnitrificación.

En la Tabla 41 se presenta la concentración de nitrato teórico que podría llegar a eliminarse usando cada uno de los dadores de electrones (AGV, sulfuro y metano disuelto) degradados en cada periodo. También se muestra el nitrato que fue realmente eliminado en cada periodo.

Tabla 41. Nitrato que teóricamente podría desnitrificarse con cada uno de los dadores de electrones y nitrato eliminado durante la etapa II.

Periodo	AGV (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	S ²⁻ (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	CH ₄ (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	N-NO ₃ Eliminado (mgN·l ⁻¹)
II.1	26,9	9,4	207,6	72,5	40,2	14,0	30,2
II.2	27,3	9,5	214,6	71,0	35,1	12,2	25,6

En esta etapa se observa que con la concentración de AGV presentes no podría desnitrificarse el nitrato eliminado en los periodos II.1 y II.2. Al igual que en la etapa I, la concentración de sulfuro sería suficiente para desnitrificar todo el nitrato eliminado. Con el metano disuelto podría desnitrificarse aproximadamente el 45% de los nitratos eliminados. Por lo tanto, los resultados muestran que el nitrato que no fue eliminado

empleando AGV como único dador de electrones, pudo ser desnitrificado empleando sulfuro o metano disueltos presentes en el sistema. El consumo de los dadores presentes pudo llevarse a cabo de forma simultánea.

En general, en la etapa I y II el grado de desnitrificación fue similar y en torno al 60% en todos los periodos, a pesar de la inestabilidad de la nitrificación que se presentó al final del periodo II.2, y donde se recirculaban menos nitratos hacia la zona anóxica. Este hecho puede ser debido a una mayor disponibilidad de materia orgánica o la participación de otros dadores de electrones en el proceso. Dicho esto, la deficiencia de materia orgánica en forma de AGV que pueda presentarse en este proceso y que afecta el rendimiento de la desnitrificación, podría contrarrestarse con solo el aporte de DQO por parte del sulfuro o de forma simultánea con el metano disuelto.

Antes de inocular la planta piloto para el estudio en la etapa II, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la etapa I con respecto a la dinámica del sulfuro en el sistema, se decidió comprobar si la oxidación química del sulfuro era mayor a la asociada a la oxidación biológica (desnitrificación con sulfuro) en presencia de organismos. Para esto, se llenó la planta piloto con solo el afluente y se analizó la concentración de los compuestos de azufre presentes tales como el sulfuro, tiosulfato y sulfato en cada zona, en función del tiempo de retención hidráulico en cada tanque (Figura 58).

Para las condiciones de TRH de la etapa I sin presencia de organismos, los resultados obtenidos mostraron que el balance de azufre en la planta piloto no se cumple, es decir, la concentración de sulfato al final de la zona aerobia para un TRH de 13 horas es menor que el total de azufre afluente. Por tanto, existe la formación de compuestos intermedios de azufre en la planta piloto (aprox. 40%) que no alcanzan a ser completamente oxidados hasta sulfato. Estos resultados son interesantes teniendo en cuenta que en la etapa I prácticamente todo el sulfuro afluente era oxidado hasta sulfato y la concentración de sulfuro medidas en la zona anaerobia y anóxica eran

menores (Figura 59). Este hecho indica que la velocidad de oxidación del sulfuro es mayor en presencia de organismos.

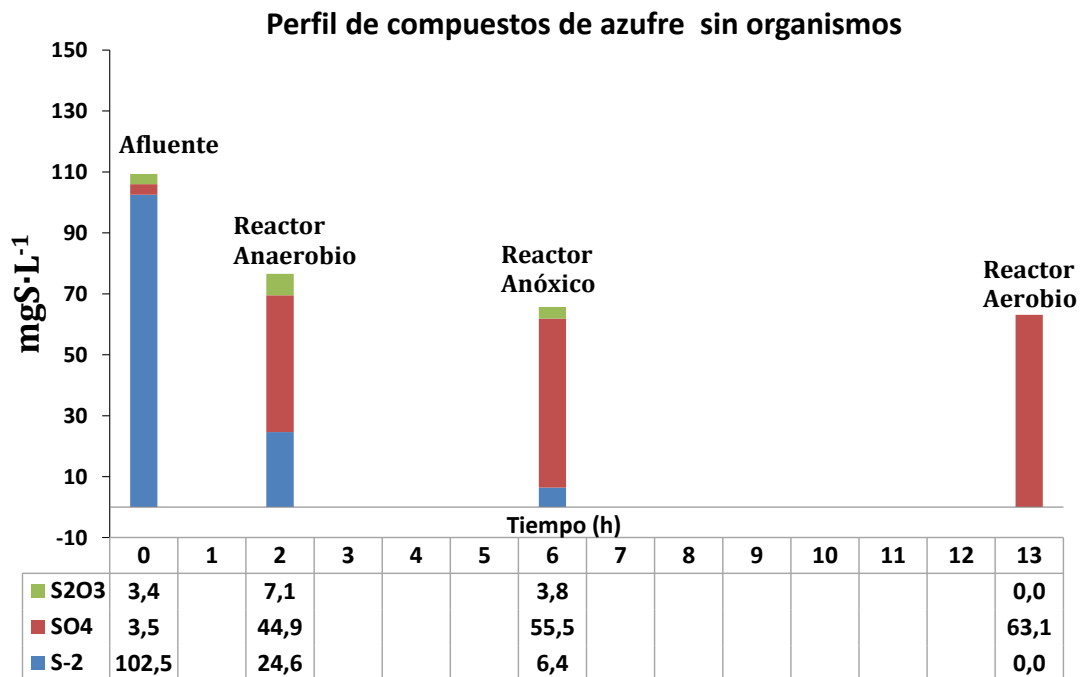


Figura 58. Perfil de compuestos de azufre en la planta piloto sin presencia organismos (TRH: 13 h).

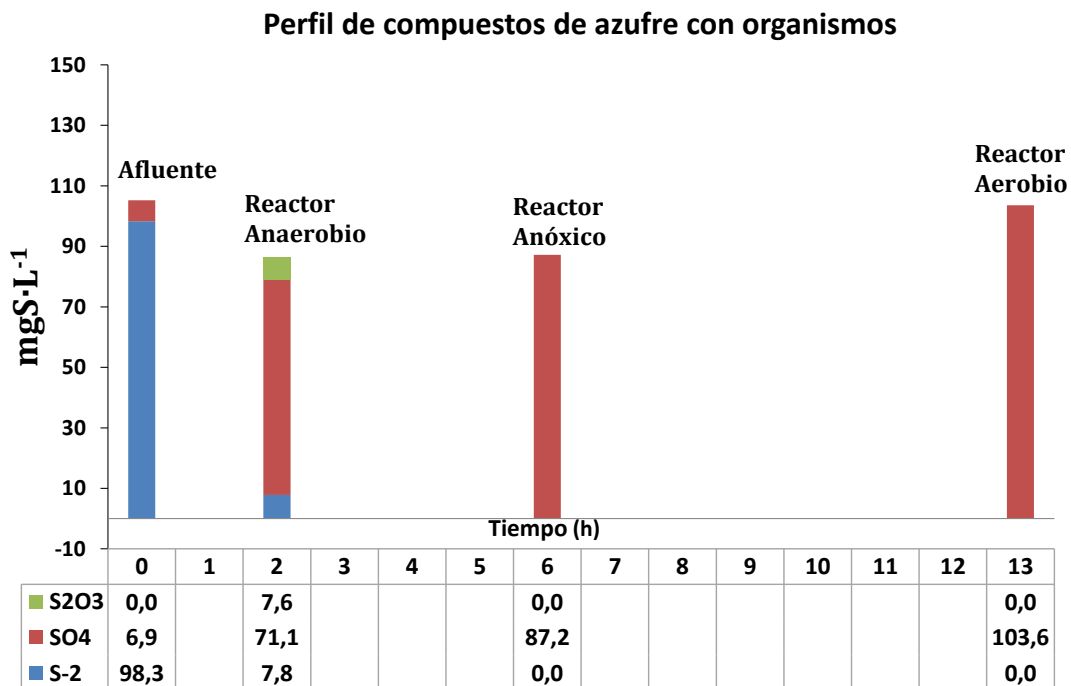


Figura 59. Perfil de compuestos de azufre en la planta piloto con presencia organismos (TRH: 13 h).

4.2.2.3 Eliminación biológica de fósforo

La eliminación biológica de fósforo fue evaluada con el seguimiento de la concentración de ortofosfato en el afluente y efluente de la planta piloto, y con la concentración de fósforo total en el reactor aerobio. Al igual que en los otros procesos, en cada periodo se evaluó la influencia de la temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto sobre la eliminación biológica de fósforo.

En la Tabla 41 se presentan las concentraciones medias de ortofosfato en el afluente y en el efluente. También se presenta la concentración de fósforo total y el porcentaje de fósforo eliminado, obtenidos en el seguimiento del proceso de eliminación biológica de fósforo durante esta etapa. Tal y como se muestra en la Tabla 42, la concentración de ortofosfato en el afluente y efluente ha sido muy estable. Este hecho permitió obtener en ambos periodos un porcentaje de eliminación de fósforo con un valor medio en torno al 42%.

En esta etapa la recirculación de nitrato o nitritos recirculados desde la zona anóxica a la anaerobia, influyó notablemente sobre los rendimientos del proceso de eliminación biológica de fósforo, debido a que modifica el comportamiento de la zona anaerobia.

Tabla 42. Evolución de la concentración de fósforo durante la etapa II.

Parámetro	Periodo	Media	δ
P-PO₄ Afluente (mg P-PO₄·l⁻¹)	II.1	6,9	1,7
	II.2	7,7	1,0
P-PO₄ Efluente (mg P-PO₄·l⁻¹)	II.2	4,7	1,7
	II.2	4,2	1,4
P Total Reactor aerobio (mg P-PO₄·l⁻¹)	II.1	42,3	8,6
	II.2	30,5	9,5
%P-PO₄ Eliminado	II.1	41,7	8,9
	II.2	44,2	9,7

* δ desviación estándar

Tal y como se mencionó en la etapa I, asumiendo que aproximadamente entre un 1,7 – 2,0 % de los sólidos suspendidos volátiles corresponde al fósforo empleado como nutriente (Metcalf y Eddy, 1991; Ferrer y Seco, 2007), para una concentración promedio de SSV de 1230 mg·l⁻¹, el valor estimado de fósforo como nutriente es de 0,55 mgP·l⁻¹ siendo este valor menor que el realmente eliminado de 3,0 mgP·l⁻¹, con lo cual, al igual que en la etapa I, en esta etapa se observa que el rendimiento obtenido es mayor que el requisito nutricional, indicando que la eliminación de fósforo es llevada a cabo por la presencia de PAO.

La Figura 60 muestra la evolución de la concentración de ortofosfato, fósforo total, temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto en la etapa II. Se puede ver en la figura que la evolución de la concentración de fósforo en el efluente fue muy estable excepto al final del periodo II.2, donde la concentración disminuyó debido a que se presentó un aumento significativo de la concentración de AGV (día 410), hecho que favoreció la actividad de las PAO alcanzándose al final de este periodo un porcentaje de eliminación promedio del 62%. Este hecho también puede contrastarse con el aumento del fósforo total en la zona aerobia.

El seguimiento de los organismos PAO a lo largo de toda la etapa (Figura 61) muestra que la abundancia de estos organismos aumentó respecto al inóculo y fue muy estable. Estos resultados concuerdan con lo esperado ya que en esta etapa no se observaron diferencias significativas en la eliminación de fósforo. El comportamiento de la eliminación biológica de fósforo en la etapa I y II es similar. Cuando el proceso de nitrificación está bien establecido aumenta la recirculación de nitratos hacia la zona anóxica, de tal modo que, si estos nitratos no son eliminados completamente, parte de ellos se recirculan a la zona anaerobia modificando las condiciones de esta zona, afectando el metabolismo de los organismos PAO. En el caso de la disponibilidad de materia orgánica, la concentración de AGV en ambos periodos fue similar.

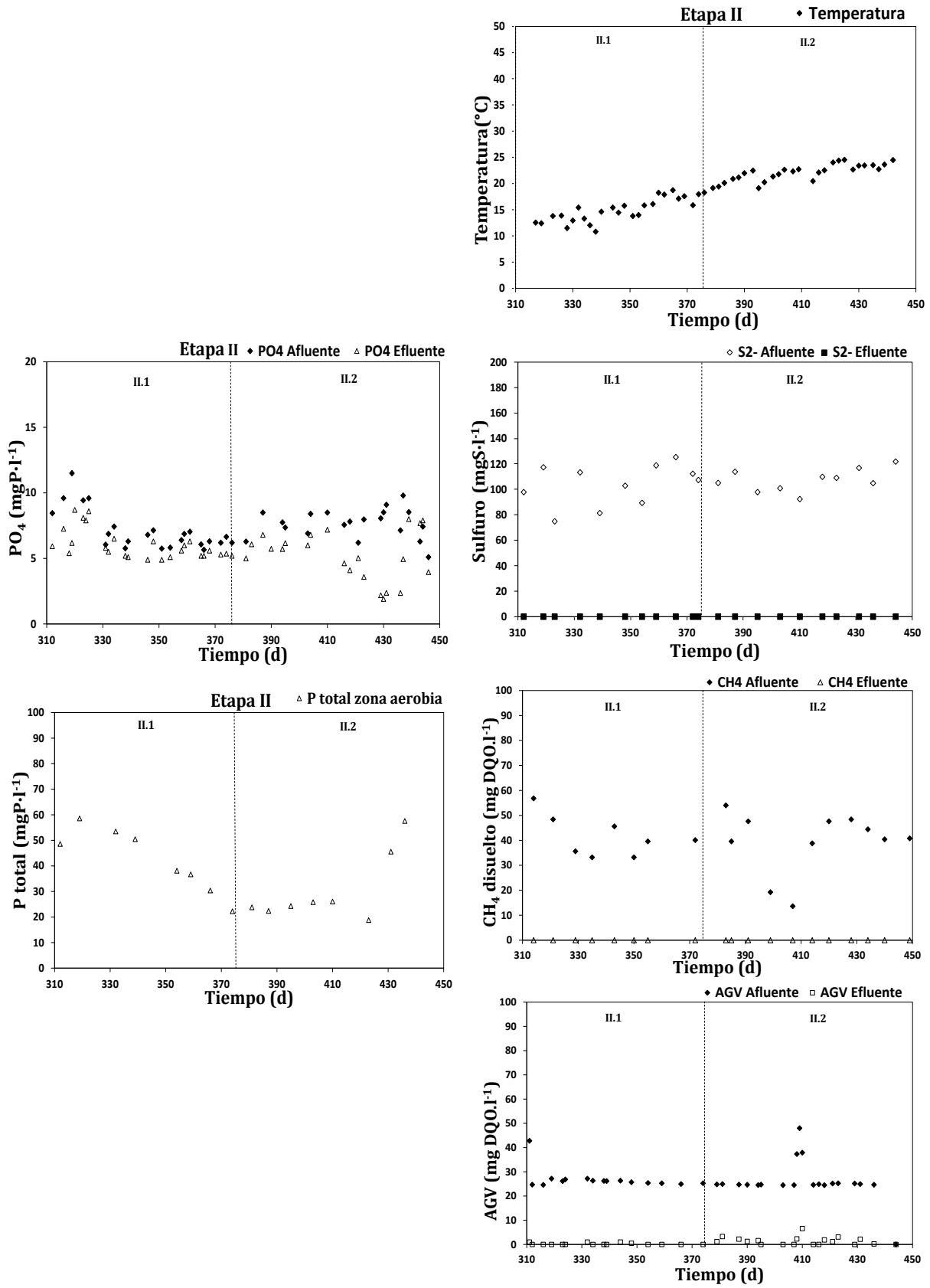


Figura 60. Influencia de las características del afluente sobre la eliminación biológica de fósforo.

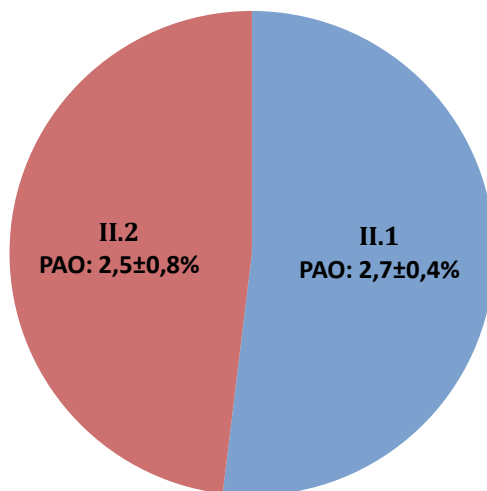
Abundancia de organismos PAO etapa II

Figura 61. Abundancia de organismos PAO durante la etapa II.

A continuación se analizará en cada periodo la influencia de la temperatura, AGV y sulfuro sobre el proceso de eliminación biológica de fósforo.

Temperatura.

- Como se puede observar en la Figura 60, en esta etapa la temperatura siguió una tendencia ascendente aumentando en promedio del periodo II.1 al periodo II.2 de 14,9 °C hasta valores cercanos a los 24,0°C. Según Brdjanovic *et al.*, 1997 las velocidades de los procesos de eliminación biológica muestran valores máximos entre 20 y 30°C, y la velocidad de los procesos en la fase aerobia aumentan con la temperatura. En general el comportamiento de la temperatura en esta etapa fue favorable para el crecimiento de las PAO. El bajo porcentaje de eliminación de fósforo obtenido, comparado con la etapa I pudo estar influenciado por la mayor recirculación de nitratos desde la etapa anóxica y la baja disponibilidad de AGV. Al igual que en la etapa I (Periodo I.1) cuando la nitrificación está bien establecida, existe una mayor recirculación de nitratos y el proceso de EBPR se ve desfavorecido.

Ácidos grasos volátiles y sulfuro.

- En el periodo II.2, la eliminación biológica de fósforo fue un poco mayor que en el periodo II.1. Este hecho podría explicarse debido a la mayor disponibilidad de AGV para las PAO en la etapa anaerobia generada por la menor concentración de nitratos recirculados desde la etapa anóxica. No obstante, se obtuvieron rendimientos similares en ambos periodos.
- En relación al sulfuro, y tal y como se ha comentado en la etapa anterior, la presencia de este compuesto puede favorecer la eliminación biológica de fósforo, aumentando el almacenamiento de poli-P o poly-S/S^o por parte de los organismos PAO, según explica Wu *et al.* (2014) en los estudios realizados.

Los resultados obtenidos en las etapas I y II muestran que en este proceso, los organismos PAO presentan una elevada tolerancia a los cambios operacionales. Es decir, a pesar de los cambios observados en ambas etapas en el TRH, TRC o temperatura, las PAO no necesitaron grandes periodos de aclimatación para eliminar el fósforo presente.

4.2.3 Etapa III (480 a 750 días)

La etapa III se inició tras una parada técnica debida al mantenimiento de los módulos de membrana instalados en el reactor SAnMBR. Este hecho obligaba a que durante 15 días la planta piloto de fangos activados estuviera sin alimento, y debido a ello se decidió parar el proceso e inocular nuevamente el sistema tras el periodo vacacional. Posteriormente, se siguió la evolución del proceso hasta alcanzar el estado estacionario.

La planta piloto se inculó con fango activado de la EDAR del Carraixet cuyas características se indican en la Tabla 43. El análisis de la población microbiana se realizó empleando la técnica FISH. Una vez inculado el sistema, se empezó a alimentar con el efluente del reactor SAnMBR hasta completar el volumen total, alcanzando una concentración de sólidos suspendidos totales de aproximadamente $1200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

En la Tabla 44 se presentan los valores medios de los parámetros físico-químicos del afluente en la etapa III. Después del llenado total del sistema, éste se dejó evolucionar y al cabo de 20 días, cuando se observó un descenso de la concentración de amonio en el efluente, se empezó a ajustar el tiempo de retención celular (TRC) (ver Figura 62).

Tabla 43. Características del inóculo.

Etapa III	
Volumen (l)	200
SST ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	2230
SSV(%)	81,5
AOB (%)	6 ± 1
NOB (%)	4 ± 1
DEN (%)	5 ± 1
SRB (%)	1 ± 1
PAO (%)	1 ± 1
Met tipo I (%)	<1
Met tipo II (%)	<1

Tabla 44. Parámetros físico-químicos del afluente durante la etapa III.

ETAPA III			
Parámetro	Unidad	Media	δ
N-NH₄	(mgN·l⁻¹)	54,1	10,7
N-NO₃	(mgN·l⁻¹)	0,0	0,0
N-NO₂	(mgN·l⁻¹)	0,0	0,0
P-PO₄	(mgP·l⁻¹)	6,5	1,5
S-H₂S	(mgS·l⁻¹)	107,0	23,5
S-SO₄	(mgS·l⁻¹)	9,9	7,6
AGV	(mg DQO·l⁻¹)	49,1	64,6
DQO soluble	(mg DQO·l⁻¹)	362,4	90,5
CH₄ disuelto	(mg DQO·l⁻¹)	27,3	16,7
ALK	(mg CaCO₃·l⁻¹)	641,9	74,7
p H		7,3	0,2

*δ desviación estándar

El objetivo principal de esta etapa era que una vez estabilizado el proceso a un TRH y un TRC en torno a 26 h y 25 d respectivamente, variar el TRH entre los valores evaluados en las etapas I y II (entre 13 y 26 h) y corroborar el efecto de este parámetro sobre la inhibición de la nitrificación.

En esta etapa la temperatura tampoco se controló y varió en función de las características del ambiente. El pH de la zona aerobia osciló entre 7,0 y 7,6 y la concentración de OD se mantuvo entre 1,5 y 2,0 mg·l⁻¹.

La Tabla 45 muestra los valores medios y la desviación estándar de las condiciones operacionales durante esta etapa. La etapa III se dividió en 4 periodos (III.1 – III.4) controlando en cada una de ellas el TRH y el TRC. Esto permitió evaluar el rendimiento de los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo. En esta etapa los periodos III. 2 y III.3 no estaban planificados, surgieron durante el seguimiento del proceso como consecuencia de la bajada repentina de la temperatura en estos periodos.

Tabla 45. Condiciones medias de operación en la etapa III

Parámetro	Periodo	Media	δ
TRH (h)	III.1	28,7	0,6
	III.2	29,4	2,9
	III.3	29,8	4,2
	III.4	Entre 13 y 26	
TRC (d)	III.1	24,2	2,8
	III.2	23,2	1,7
	III.3	38,6	1,7
	III.4	23,7	2,4
T (°C)	III.1	17,2	4,1
	III.2	12,3	1,5
	III.3	13,5	1,6
	III.4	16,0	1,4
% Nitrificación	III.1	92,0	
	III.2	68,6	
	III.3	42,6	
	III.4	71,4	

* δ desviación estándar

En todos los periodos, el TRC se mantuvo en torno a 25 días, excepto en el periodo III.3 donde fue necesario aumentar el TRC hasta 40 días, con el objetivo de favorecer el crecimiento de los organismos nitrificantes y mejorar el proceso de nitrificación, contrarrestando la fuerte disminución de la temperatura que tuvo lugar.

Cuando la nitrificación estaba nuevamente establecida, hecho que ocurrió al final del periodo III.3, se decidió ajustar nuevamente la purga de fango para un TRC en torno a 25 días, tal y como se muestran en la Tabla 45. Posteriormente en el periodo III.4, se procedió a estudiar el efecto del TRH sobre los distintos procesos biológicos implicados, variando este parámetro entre 13 y 26 h.

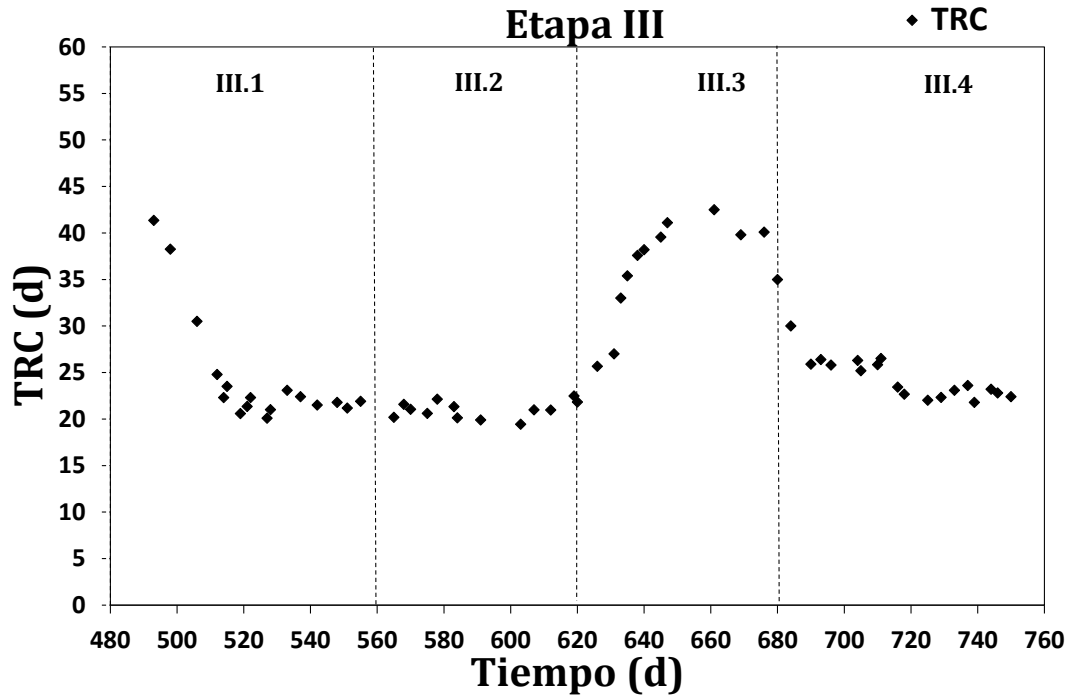


Figura 62. Evolución del TRC durante la etapa III.

Los resultados obtenidos en cada periodo se presentarán y discutirán a continuación. Para cada proceso (nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo) se discuten los resultados en función de los cambios de temperatura, y en la concentración afluente de AGV, sulfuro y metano disuelto.

4.2.3.1 Nitrificación

El estudio del proceso de nitrificación se llevó a cabo mediante el seguimiento en cada periodo de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en la etapa aerobia. El estudio microbiológico se realizó empleando la técnica FISH. La Figura 63 muestra la evolución de los principales parámetros analizados.

- En el periodo III.1 se puede observar que desde el inicio la nitrificación estaba bien establecida, alcanzándose en este periodo un porcentaje de nitrificación promedio del 92%. En la Figura 63 se puede observar la baja concentración de amonio en el efluente.

- En el periodo III.2, se presentó un fuerte descenso de la temperatura en los primeros días. Este descenso de la temperatura provocó una reducción del porcentaje de nitrificación, el cual se situó en valores en torno al 68% entre los días 560 al 600. A lo largo de este periodo, se alcanzaron valores mínimos de temperatura de 11°C, pero esta aumentó levemente estabilizándose alrededor de 14°C. En este periodo el TRH y el TRC se mantuvieron en torno a 30 h y 23 días respectivamente. Durante este periodo, la nitrificación siguió empeorando alcanzándose al final del periodo concentraciones de amonio similares a las del afluente. También, se observó acumulación de nitrito en el sistema en este periodo.
- Al inicio del periodo III.3 no se observó una mejora de la nitrificación a pesar del aumento de temperatura del sistema que pasó en promedio de 14°C hasta 15°C. Debido a esto, se decidió aumentar en este periodo el TRC a 40 días, con el objetivo de favorecer rápidamente el crecimiento de los organismos nitrificantes. Al final de este periodo, tal y como se puede ver en la Figura 63, la nitrificación se recuperó alcanzando un porcentaje de nitrificación del 65%. El porcentaje de nitrificación promedio alcanzado en este periodo fue del 42%.
- En el periodo III.4, tras observar que la nitrificación se había recuperado totalmente se decidió modificar nuevamente la purga de fango para alcanzar un TRC promedio de 25 días. El TRH al inicio de este periodo se mantuvo en 30 h con el fin de favorecer la nitrificación. El objetivo principal en este periodo era modificar el TRH entre 26 y 16 horas con el fin de estudiar la respuesta del proceso de nitrificación a los cambios de esta variable, probando en total cinco TRH distintos incluyendo el inicial de 30 h (30, 13, 26, 20, 16 y 13 horas). Los TRH probados corresponden con valores que se encuentran dentro de los TRH en que fue operada la planta piloto.

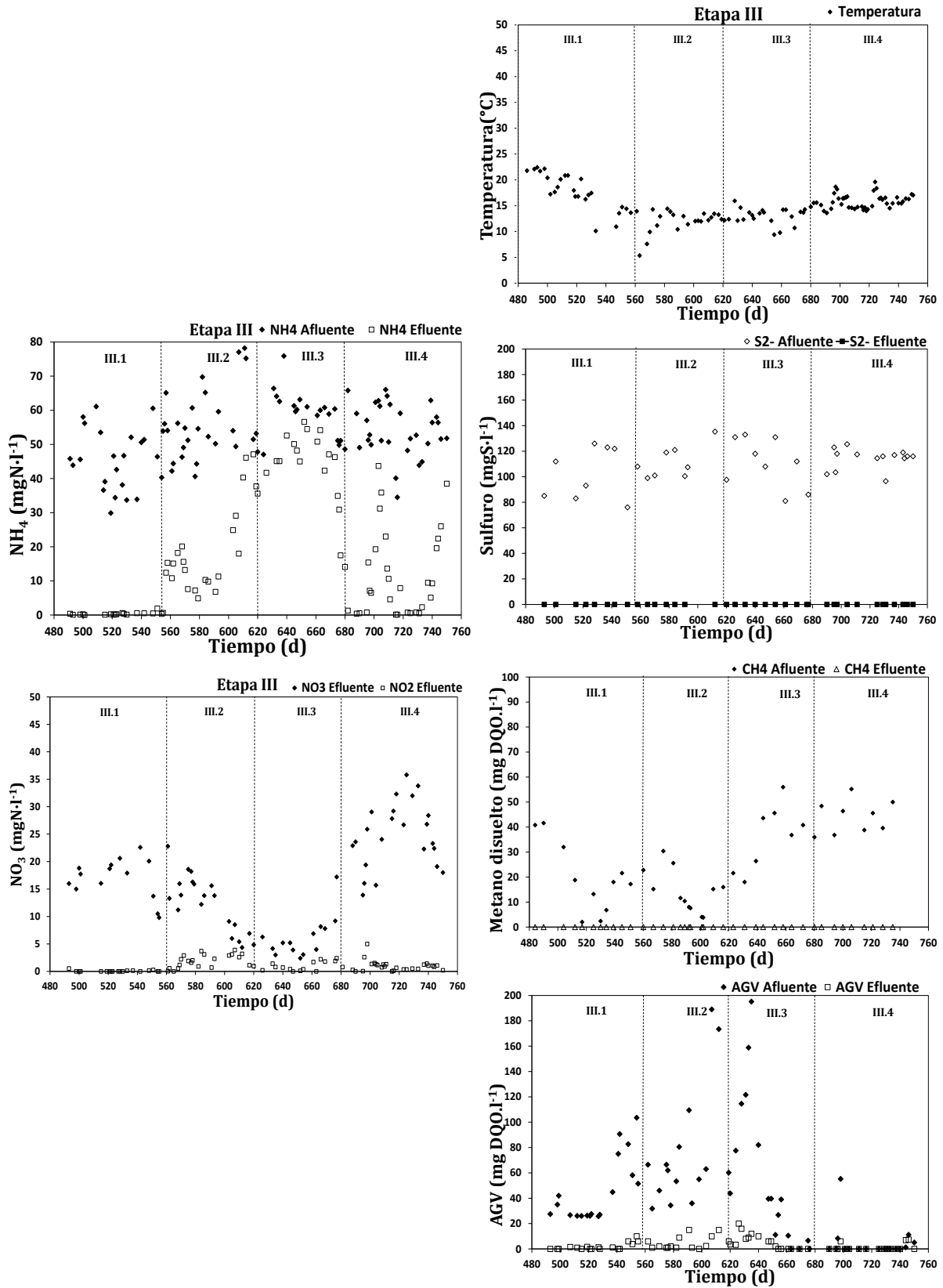


Figura 63. Influencia de las características del afluente sobre la nitrificación en la etapa III.

- La Figura 64 muestra la evolución de la concentración de amonio en el afluente y el efluente en el periodo III.4, en función del TRH estudiado. Para cada TRH estudiado se realizó el seguimiento de la concentración de amonio para determinar el grado de nitrificación alcanzado. Inicialmente, y como se comentó anteriormente este periodo se inició con un TRH de 30 h, que permitió determinar que para este TRH (III.4.a) todo el amonio presente en el afluente era nitrificado. Posteriormente, se modificó el caudal afluente para un TRH de 13 h (III.4.b), observándose que el amonio empezaba a acumularse en el sistema indicando el deterioro de la nitrificación. Después, se modificó el TRH para 26h (III.4.c) y se observó que la nitrificación se recuperaba. Con el fin de comprobar cómo se comportaba el proceso a otros TRH se ajustó el proceso para un TRH 20 h (III.4.d), observándose una nitrificación estable con rendimientos superiores al 90%. Posteriormente, se ajustó el caudal para un TRH de 16h (III.4.e), observándose que la nitrificación empezaba a desestabilizarse acumulándose amonio en el sistema. Sin embargo el porcentaje medio de nitrificación fue del 80%. Finalmente, se ajustó el caudal para un TRH de 13h (III.4.f), observándose un claro deterioro de la nitrificación a TRH bajos.

Los resultados obtenidos muestran que, en este proceso, cuando se trabaja a TRH superiores a 16h, es posible obtener rendimientos en la nitrificación superiores al 80%. También se observó que a bajos TRH (<16 h) la biomasa nitrificante sufre un tipo de inhibición reversible, ya que cuando se aumenta nuevamente el TRH los organismos recuperan la actividad nitrificante rápidamente. De hecho, y teniendo en cuenta los resultados de la etapa I y II, esta inhibición puede relacionarse con la presencia de sulfuro en el sistema. De los resultados obtenidos se puede deducir que a TRH menores a 16 h el grado de nitrificación disminuye y a TRH mayores a 16 h, el proceso se ve favorecido y el grado de nitrificación aumenta.

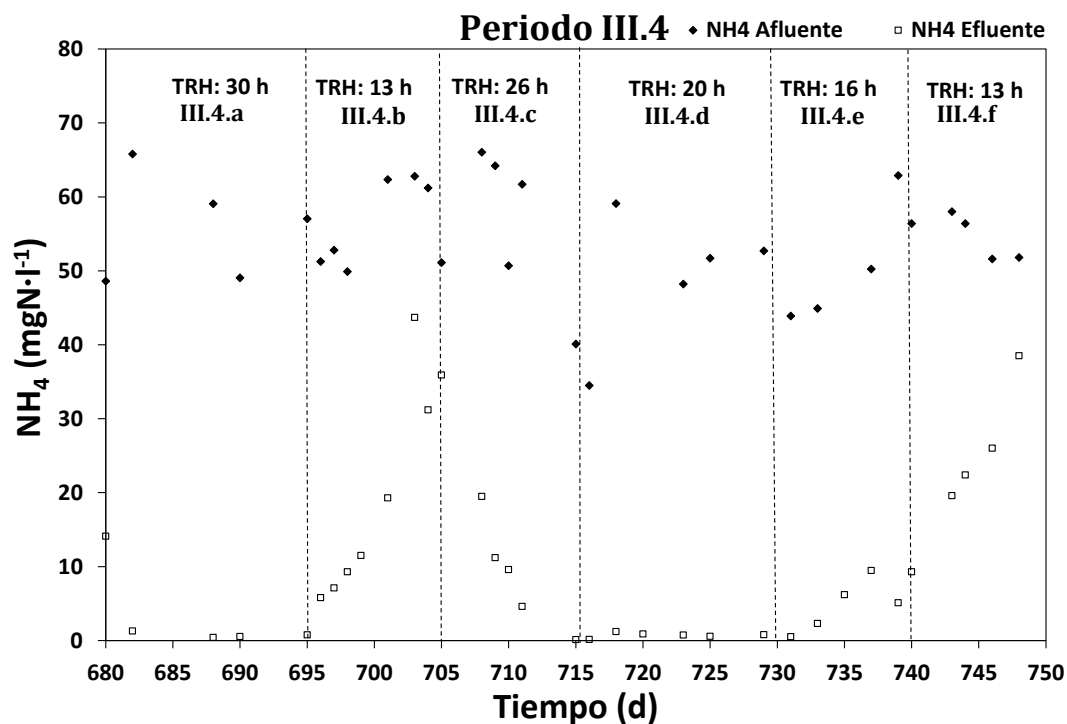


Figura 64. Evolución de la concentración de amonio durante los cambios del TRH realizados.

- Los resultados mencionados anteriormente fueron contrastados con el seguimiento microbiológico realizado en esta etapa y que se muestra en la Figura 65. El porcentaje de organismos viables en esta etapa fue del 94%. Se puede observar que la abundancia de organismos AOB y NOB aumentó respecto al inóculo. Desde el inicio de la etapa, los organismos nitrificantes aumentaron en los periodos III.1 y III.2. Estos resultados coinciden con el comportamiento de la nitrificación en estos periodos, donde la nitrificación estaba bien establecida. En el periodo III.3 se observa un fuerte descenso de estos organismos, que coincide con el deterioro de la nitrificación en dicho periodo. Al final de la etapa, en el periodo III.4, se observa un crecimiento importante de los organismos AOB y NOB que concuerda con la mejora de la nitrificación observada.

Abundancia de organismos AOB y NOB etapa III

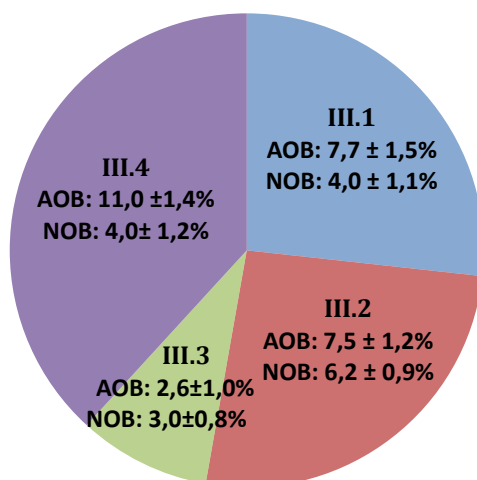


Figura 65. Abundancia de organismos AOB y NOB etapa III

Al igual que en las etapas anteriores, a continuación se analizará para cada periodo la influencia de la temperatura, concentración de AGV, sulfuro y metano disuelto sobre el proceso de nitrificación.

Temperatura.

- Durante la etapa III la temperatura fue baja debido a las condiciones ambientales propias de la época de invierno. En el periodo III.1 la temperatura empezó a descender llegando a un valor mínimo de 15°C al final del periodo. A pesar de esto, la temperatura media en este periodo fue de 17,2°C.
- En el periodo III.2 la temperatura descendió considerablemente al inicio del periodo, situándose el valor medio en 14 °C. Este fuerte descenso ocasionó una disminución importante del grado de nitrificación. Según Hellinga *et al.* 1998, cuando la temperatura desciende por debajo de 15°C la tasa de crecimiento de los organismos nitrificantes decrece y se limita el proceso de nitrificación siendo necesario trabajar a mayores TRC.

- En el periodo III.3 tras observar el deterioro de la nitrificación ocasionado por el fuerte descenso de la temperatura se aumentó el TRC. Esto permitiría compensar la baja temperatura y favorecer el crecimiento de los organismos nitrificantes. Al final del periodo se observó que la nitrificación se recuperó.
- En el periodo III.4 tras observar que la nitrificación se estabilizó nuevamente y que la temperatura no continuó descendiendo se decidió ajustar nuevamente el caudal de purga para alcanzar un TRC en torno a 25 d. La temperatura en este periodo se estabilizó en 16°C.

Concentración de sulfuro de hidrógeno.

- En el periodo III.1 la concentración media de sulfuro fue de 102,7 mgS l⁻¹, que corresponde en el reactor anaerobio a una concentración aproximada de 34,2 mgS l⁻¹. Tal y como se ha comentado en las etapas anteriores, concentraciones mayores a 5 mgS l⁻¹ pueden inhibir el proceso de nitrificación. Sin embargo, en este periodo no se observó ninguna inhibición, posiblemente a que las condiciones de T y TRH eran favorables para el proceso de nitrificación.
- En los periodos III.2 y III.3 la concentración media de sulfuro fue de 111,7 mgS l⁻¹ y 100,2 mgS l⁻¹, respectivamente. En estas etapas se observó un deterioro importante de la nitrificación que llegó a inhibir por completo a los organismos nitrificantes en el periodo III.3. Teniendo en cuenta que la concentración de sulfuro y el TRH en estos periodos son similares a las del periodo III.1, se considera que el sulfuro no fue el culpable del deterioro de la nitrificación. Por tanto, la inhibición se atribuye al fuerte descenso de la temperatura en estos periodos. En la Figura 66 se muestra la evolución de la concentración

de sulfuro en el afluente y de sulfato en el efluente, observándose que casi todo el sulfuro afluente es oxidado hasta sulfato.

- En el periodo III.4 la concentración media de sulfuro fue de $113,3 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$, similar al resto de periodos. En este periodo la nitrificación llegó a estabilizarse obteniéndose porcentajes de nitrificación en torno al 80% para TRH superiores a 16 h y temperaturas en torno a 16°C . Por tanto, a TRH por encima de 16 h disminuye el efecto inhibitor del sulfuro sobre la nitrificación. También, se observó que la inhibición de la biomasa nitrificante es reversible tal y como se había apuntado ya en las etapas anteriores.
- La información obtenida en esta etapa permitió corroborar los resultados obtenidos en etapas anteriores, donde se observó que en este sistema cuando se aumenta el TRH, es decir se disminuye la carga de sulfuro, manteniéndose la relación entre la concentración de sulfuro y de amonio ($\text{S}^2/\text{N-NH}_4$), se minimiza la inhibición de los organismos nitrificantes.

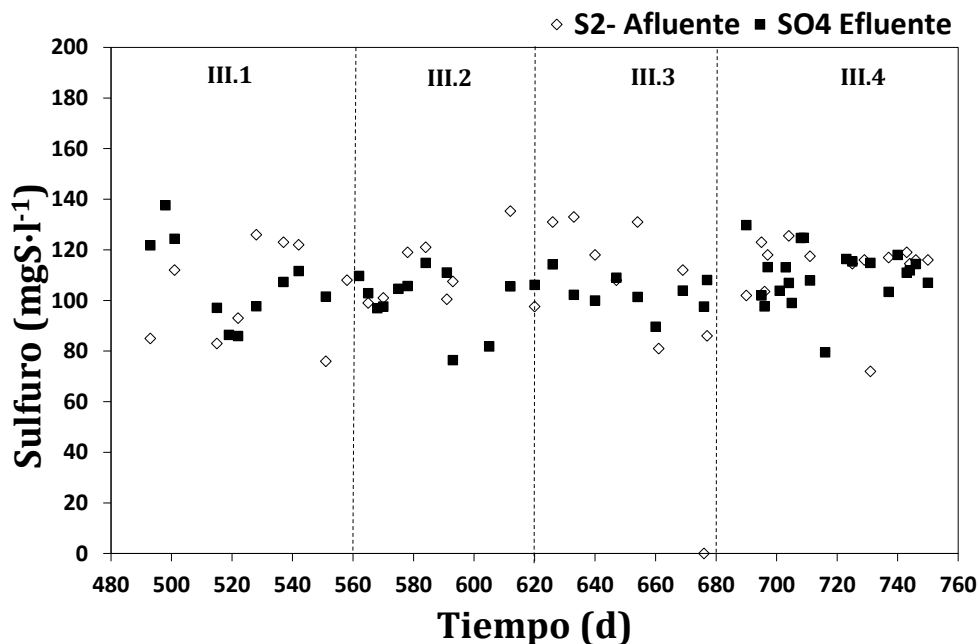


Figura 66. Evolución de la concentración de sulfuro en el afluente y en el efluente, etapa III.

Concentración de metano disuelto y ácidos grasos volátiles.

En la etapa III se presentaron elevadas concentraciones de AGV principalmente en los periodos III.2 y III.3, que alcanzaron valores en el afluente hasta de 190 mg DQO l^{-1} . Este aumento en la concentración de AGV es atribuido a los problemas operacionales que se presentaban en el proceso SAnMBR. El incremento excesivo de AGV y la presencia de sulfuro en el afluente pueden favorecer el crecimiento de organismos filamentosos, principalmente *Thiothrix*. En este caso no se observó el crecimiento de estos organismos. La influencia de los AGV y el metano disuelto se discutirá en el apartado de la desnitrificación.

En resumen, durante la etapa III (periodos III.1, III.2 y III.4) se obtuvieron porcentajes de nitrificación superiores al 60%. El descenso de la temperatura fue un factor determinante en el rendimiento del proceso y que fue controlado con el aumento del TRC. También, se observó que la inhibición de los organismos nitrificantes era reversible. Este hecho se corroboró en el periodo III.4, observándose que al aumentar el TRH por encima de 16 h el sistema recuperaba la actividad nitrificante. Es probable que el sulfuro presente fuera oxidado en las zonas previas o al inicio de la zona aerobia hasta sulfato, antes de inhibir a los organismos nitrificantes.

4.2.3.2 Desnitrificación

El estudio del proceso de desnitrificación en la etapa III se realizó con el seguimiento en cada periodo de la concentración de nitrito y nitrato en el efluente y en la etapa anóxica. Los parámetros analizados en este apartado son la temperatura, la concentración de sulfuro, ácidos grasos volátiles (AGV) y metano disuelto. En las Tablas 46 y 47 se muestran las concentraciones medias de los compuestos de nitrógeno en el afluente, efluente y etapa anóxica, durante los distintos periodos estudiados en esta etapa.

Los rendimientos que se muestran de nitrógeno eliminado y desnitrificación fueron obtenidos a partir del balance de nitrógeno realizado en el sistema y considerando que todo el amonio que desaparece ha sido nitrificado. A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada periodo.

- En el periodo III.1 el porcentaje de nitrógeno eliminado fue del 57,2% y el porcentaje de desnitrificación obtenido fue del 61,5%. Estos resultados se vieron favorecidos por la alta eficiencia en la nitrificación en este periodo.

Tabla 46. Concentración de amonio, nitrito y nitrato en el afluente y efluente en la etapa III.

ETAPA III										
Periodo	AFLUENTE (mg N·l ⁻¹)		EFLUENTE (mg N·l ⁻¹)							
	NH ₄	δ	NH ₄	δ	NO ₂	δ	NO ₃	δ	% N _{Eliminado}	% Desnit
III.1	47,3	9,1	3,3	1,5	1,0	0,1	15,9	3,5	57,2	61,5
III.2	56,0	10,8	17,6	6,4	1,7	1,4	14,3	2,7	39,8	57,9
III.3	61,8	7,9	36,3	9,2	1,0	1,0	10,8	1,0	21,6	52,2
III.4	53,8	7,8	14,1	4,3	1,2	1,4	24,5	6,2	26,7	36,7

*δ desviación estándar, %Desnit (Desnitrificación)

Tabla 47. Concentración de nitrito y nitrato al final de la etapa anóxica.

ETAPA III				
Periodo	NO ₂ (mg N·l ⁻¹)	δ	NO ₃ (mg N·l ⁻¹)	δ
III.1	0,9	1,1	3,0	2,4
III.2	0,6	0,8	2,1	1,4
III.3	0,4	0,6	2,6	1,6
III.4	0,5	1,1	2,6	1,5

*δ desviación estándar

- En los periodos III.2 y III.3 no se observó un descenso importante del porcentaje de desnitrificación, con valores medios de 57,9% y 52,2% respectivamente. No obstante, el porcentaje de nitrógeno eliminado disminuyó pasando de un 57,2% a un 39,8% y 21,6%, respectivamente, debido al deterioro de la nitrificación en estos periodos.

- En el periodo III.4 el porcentaje medio de nitrógeno eliminado y de desnitrificación fue de 26,7% y 36,7% respectivamente. Este periodo fue muy inestable ocasionado por los cambios que se realizaron al TRH, por lo que los valores medios de la Tabla 45 no son representativos.
- La Figura 67 presenta los resultados del seguimiento microbiológico realizado, donde se muestra que la abundancia de los organismos desnitrificantes y metanotróficos en todos los periodos aumentó respecto al inóculo. En cada periodo se observan pequeñas variaciones manteniéndose el valor medio en todos los periodos. La abundancia de organismos metanotróficos tipo I y II en los periodos III.2, III.3 y III.4 disminuyó respecto al periodo III.1. Tal y como se ha comentado anteriormente los organismos metanotróficos más abundantes son los de tipo I, que crecen en ambientes con concentraciones bajas de metano y que concuerda con lo obtenido en las etapas anteriores.

Abundancia de organismos heterótrofos desnitrificantes y metanótrofos (Tipo I y II)

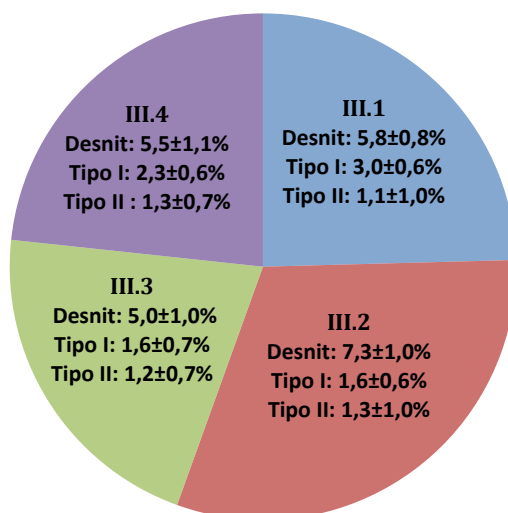


Figura 67. Abundancia de organismos desnitrificantes y metanotróficos tipo I y II en la etapa III.

A continuación se analizará la influencia de la temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto sobre el proceso de desnitrificación. La Figura 68 muestra la evolución de los parámetros medidos durante el seguimiento del proceso.

Temperatura.

- En la Figura 68 se puede observar la evolución de la temperatura en esta etapa. En el periodo III.1 la temperatura descendió y alcanzó valores por debajo de 15°C al final del periodo.
- En el periodo III.2 la temperatura sufrió un fuerte descenso alcanzando valores cercanos a 6°C pudiendo afectar algunos procesos biológicos. En el periodo III.3 la temperatura se estabilizó levemente con un valor medio de 15°C. En el caso de la desnitrificación y como se ha expuesto en las etapas anteriores la bibliografía menciona, que a temperaturas inferiores a 10°C la velocidad de consumo de los organismos desnitrificantes disminuye drásticamente.
- Durante el periodo III.4 se observó un aumento de la temperatura con un valor medio en este periodo de 16,0°C.
- En general, en esta etapa se observa que los porcentajes de desnitrificación obtenidos se mantienen en valores entre un 50-60%, excepto en el periodo III.4 debido principalmente a la inestabilidad de este periodo y la baja disponibilidad de AGV. Los porcentajes de desnitrificación son similares a los obtenidos en las etapas anteriores cuando la temperatura era más elevada. Esto parece indicar que la temperatura no influyó negativamente sobre la desnitrificación en esta etapa.

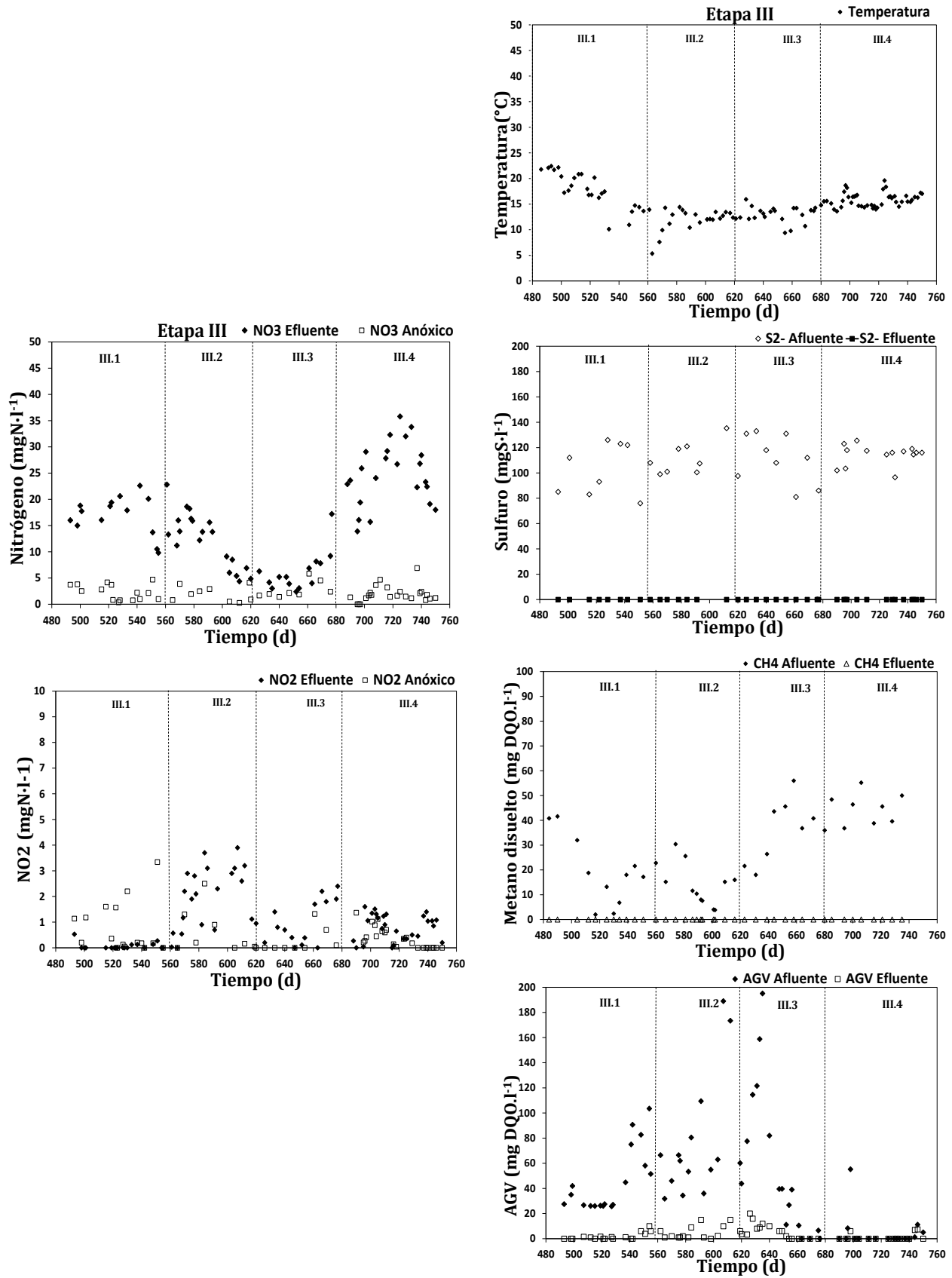


Figura 68. Influencia de las características del afluente sobre la desnitrificación.

Concentración de ácidos grasos volátiles, sulfuro y metano disuelto.

La Tabla 48 muestra los valores medios de la DQO disponible en el afluente aportada por los AGV, sulfuro y metano disuelto. También, se muestra la DQO requerida, el porcentaje de nitrógeno eliminado y de desnitrificación en cada periodo. Al igual que en las etapas anteriores, la DQO requerida hace referencia a la necesaria para desnitrificar todos los nitratos y nitritos formados, es decir todo el amonio nitrificado.

Tabla 48. Concentración de (AGV, S-S⁻² y CH₄) disponible en el afluente, DQO requerida, nitrógeno eliminado y porcentaje de desnitrificación etapa III.

Parámetro	Periodo	Media	δ
AGV (mg DQO·l ⁻¹)	III.1	48,0	25,1
	III.2	88,1	79,9
	III.3	67,3	85,2
	III.4	5,1	13,8
S-S ⁻² (mg DQO·l ⁻¹)	III.1	205,4	36,2
	III.2	223,4	27,0
	III.3	200,4	79,0
	III.4	226,6	26,8
CH ₄ disuelto (mg DQO·l ⁻¹)	III.1	21,7	16,6
	III.2	13,4	8,4
	III.3	38,6	7,2
	III.4	42,6	6,9
DQO requerida (mg DQO·l ⁻¹)	III.1	124,6	1,8
	III.2	106,7	2,3
	III.3	69,4	1,3
	III.4	114,7	2,9
N Eliminado (%)	III.1	57,2	11,6
	III.2	39,8	9,3
	III.3	21,6	7,4
	III.4	26,7	6,5
Desnit (%)	III.1	61,5	8,9
	III.2	57,9	7,6
	III.3	52,2	9,5
	III.4	36,7	8,2

*δ desviación estándar, %Desnit (Desnitrificación)

El valor de la DQO requerida se comparó con la DQO disponible en el afluente. Como se puede observar en la Tabla 48, en los periodos III.1, III.2 y III.4 la DQO aportada por los AGV no sería suficiente para desnitrificar todo el nitrato formado. Por tanto, y al igual que los resultados obtenidos en las etapas I y II, sería necesario un aporte extra de DQO por parte de otros dadores de electrones presentes en el afluente, tales como el sulfuro o el metano disuelto. En el caso de la DQO aportada por los sulfuros, esta sería suficiente para desnitrificar todo el nitrato formado. Los resultados son similares a los obtenidos en las etapas anteriores. En el caso de la DQO aportada por el metano disuelto, ésta representaría aproximadamente un 28% de la DQO requerida para eliminar todos los nitratos que se formaron en la nitrificación.

En la Tabla 49 se presenta el nitrato que teóricamente podría eliminarse empleando cada uno de los dadores de electrones degradados. Este valor se comparó con la concentración de nitrato que fue realmente eliminado en cada periodo.

Al comparar los resultados con las etapas anteriores, se observa que la concentración de AGV en estos periodos fue un poco mayor a las registradas en etapas anteriores. No obstante, en los periodos III.1 y III.4 con la concentración de AGV presentes no podría desnitrificarse todo el nitrato que fue eliminado en estos periodos. En el caso del sulfuro, y al igual que en las etapas I y II, con la concentración presente en el afluente sería suficiente para desnitrificar todo el nitrato eliminado. La concentración de metano disuelto en los periodos III.3 y III.4 es suficiente para eliminar los nitratos que fueron desnitrificados en estos periodos. Por lo tanto, en los periodos donde los AGV no eran suficientes, se presume que existe un aporte extra de DQO de forma simultánea por parte de los dadores de electrones presentes en el afluente (sulfuro y metano disuelto).

Tabla 49. Nitrato que teóricamente podría desnitrificarse con cada uno de los dadores de electrones presentes y nitrato realmente eliminado durante la etapa III.

Periodo	AGV (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	S ²⁻ (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	CH ₄ (mg DQO·l ⁻¹)	N-NO ₃ teórico (mgN·l ⁻¹)	N-NO ₃ Eliminado (mgN·l ⁻¹)
III.1	48,0	16,7	205,4	71,8	21,7	7,5	27,1
III.2	71,3	24,9	223,4	78,1	13,4	4,6	22,0
III.3	67,3	23,5	200,4	70,0	37,3	13,0	12,9
III.4	5,1	1,7	226,6	79,2	44,6	15,5	14,9

4.2.3.3 Eliminación biológica de fósforo

Para el estudio de la eliminación biológica de fósforo se realizó el seguimiento de la concentración de ortofosfato en el afluente y efluente a la planta piloto, y la concentración de fósforo total en el reactor aerobio. En cada proceso se evaluó la influencia de la temperatura, ácidos grasos volátiles, sulfuro y metano disuelto.

La Tabla 50 muestra los valores obtenidos de los parámetros mencionados durante el seguimiento del proceso.

- Como se puede observar en la Tabla 50, durante los periodos III.1, III.2 y III.3 la eliminación biológica de fósforo fue muy estable, con valores de eliminación superiores al 50%. Este hecho pudo verse favorecido por la mayor disponibilidad de AGV en estos periodos, siendo su concentración mayor que en las etapas anteriores. Esto permitió favorecer a las PAO, obteniéndose así mayores rendimientos de eliminación. Por otra parte, se observaron en estos periodos, al final de la zona anóxica concentraciones de nitrato en torno a 2,5 mgN-NO₃ l⁻¹, hecho que desfavorece el rendimiento del proceso de eliminación biológica de fósforo, debido a la recirculación de nitratos de la zona anóxica a la anaerobia.

- En el periodo III.4 el porcentaje de fósforo eliminado disminuyó hasta valores en torno al 25%. Teniendo en cuenta que en este periodo se modificó el TRH en varias ocasiones, los valores promedio obtenidos en esta etapa no son representativos.

Tabla 50. Seguimiento de la concentración de fósforo durante la etapa III.

Parámetro	Periodo	Media	δ
P-PO₄ Afluente (mg P-PO₄·l⁻¹)	III.1	6,2	1,3
	III.2	7,3	2,5
	III.3	6,7	1,2
	III.4	6,2	0,6
P-PO₄ Efluente (mg P-PO₄·l⁻¹)	III.1	2,3	1,7
	III.2	3,1	1,7
	III.3	2,0	1,9
	III.4	4,6	1,2
P Total Reactor aerobio (mg P-PO₄·l⁻¹)	III.1	51,7	14,8
	III.2	66,6	19,4
	III.3	79,9	19,6
	III.4	49,0	17,5
%P-PO₄ Eliminado	III.1	62,9	13,2
	III.2	57,5	9,6
	III.3	70,1	11,3
	III.4	25,8	8,4

*δ desviación estándar

En la Figura 69 se presentan los valores obtenidos en el estudio microbiológico realizado en esta etapa. La abundancia de organismos PAO en esta etapa aumentó en todos los periodos respecto al inóculo. La abundancia observada de estos organismos coincide con el grado de eliminación de fósforo obtenido en los periodos III.1, III.2 y III.3. Se puede observar un aumento significativo de las PAO en el periodo III.3, que coincide con el periodo donde se obtuvo el mayor porcentaje de fósforo eliminado una mayor concentración de fósforo total. Al final de la etapa, la abundancia de organismos PAO descendió en concordancia con los resultados obtenidos en términos de eliminación de fósforo, hecho que fue provocado por la baja disponibilidad de materia orgánica y los cambios en el TRH en este periodo.

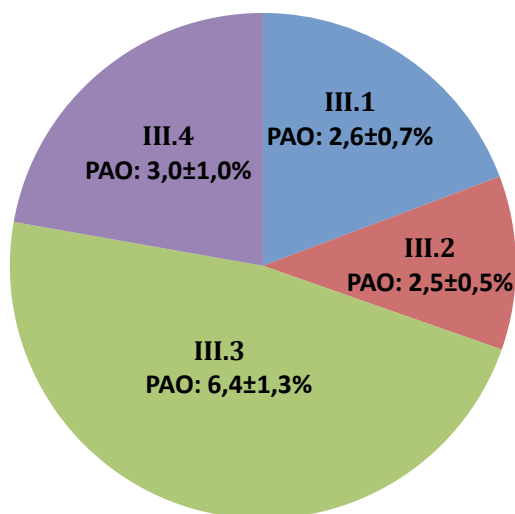
Abundancia de organismos PAO etapa III

Figura 69. Abundancia de organismos PAO en la etapa III

A continuación se analizará la influencia de la temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto sobre el proceso de eliminación biológica de fósforo. La Figura 70 muestra la evolución de la concentración de ortofosfato, fósforo total, temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto en la etapa III.

Temperatura.

- En el periodo III.1, la temperatura media fue de 17,2°C. Posteriormente, al inicio del periodo III.2 se presentó un descenso importante de la temperatura hasta 12,5°C. En el periodo III.3 la temperatura media fue de 13,5°C. Tal y como se ha dicho en etapas anteriores la temperatura es una variable que influye notablemente sobre los procesos biológicos. Sin embargo la bibliografía menciona que temperaturas en torno a los 10°C, no poseen una influencia significativa en la eficiencia del proceso de eliminación biológica de fósforo.

- En el periodo III.4 la temperatura aumento levemente hasta 16,0°C. En este caso la temperatura se encontraba dentro de los valores recomendados para un correcto funcionamiento del proceso de eliminación biológica de fósforo. La baja eliminación de fósforo obtenida en el periodo III.4 puede ser debido a la variabilidad del TRH en este periodo. Con lo cual, como se ha dicho anteriormente, los valores no son representativos debido a los cambios realizados.

Ácidos grasos volátiles y sulfuro.

- Durante el seguimiento del proceso se observó que la concentración media de AGV en el periodo III.1, III.2 y III.3 fue de 48,0 mgDQO \cdot l⁻¹, 88,1 mgDQO \cdot l⁻¹ y 67,3 mgDQO \cdot l⁻¹ respectivamente, siendo estas concentraciones favorables para el proceso de eliminación biológica de fósforo. De hecho se puede observar en la Tabla 51 que el porcentaje de EBPR fue superior al 50% en estos periodos. En el periodo III.4 la concentración de AGV disminuyó notablemente, provocando este hecho la disminución del porcentaje de eliminación de fósforo.
- En relación al sulfuro y teniendo en cuenta lo mencionado en las etapas anteriores, los organismos PAO en condiciones anaerobias podrían verse favorecidos por la presencia de compuestos de azufre como el sulfato, sulfuro o tiosulfato, almacenándolos como Poly- S²/S⁰. Sin embargo en esta etapa, debido a que la concentración de AGV fue mayor, especialmente en los periodos III.1, III.2, y III.3, se considera que los AGV son el principal responsable del aumento en el porcentaje de eliminación de fósforo en estos periodos. En general la eliminación biológica de fósforo se vio favorecida por el aumento en la concentración de AGV en el afluente en los tres primeros periodos.

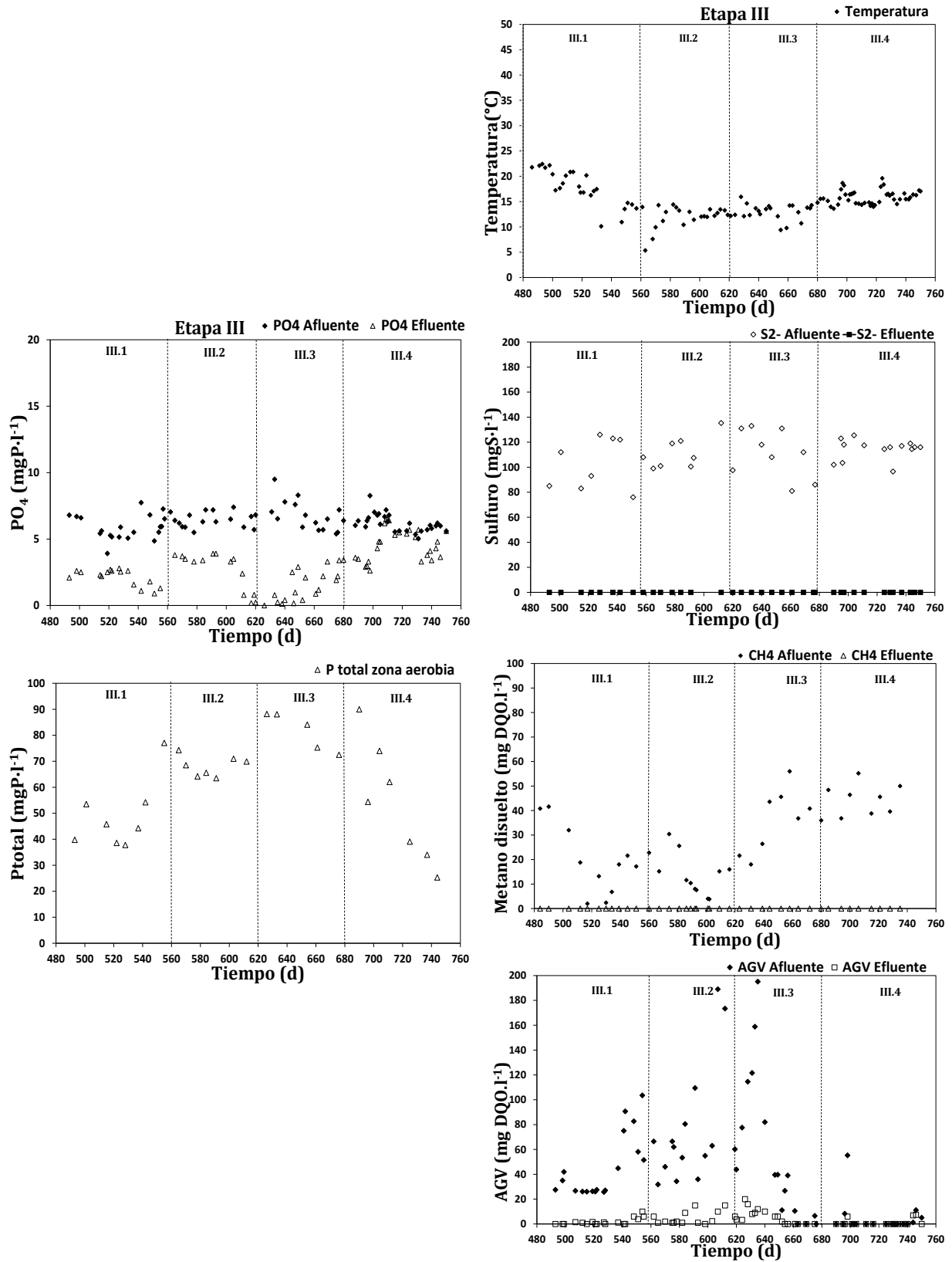


Figura 70. Influencia de las características del afluente sobre la eliminación biológica de fósforo, etapa III.

4.2.4 Análisis comparativo de los periodos estudiados

Para complementar la discusión de los resultados obtenidos en las etapas I, II y III, en este apartado se van a comparar los rendimientos de estas tres etapas para cada uno de los procesos estudiados (nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo). Para la comparación de los resultados se seleccionaron aquellos periodos con condiciones similares, en términos de tiempo retención hidráulico (TRH), tiempo de retención celular (TRC) o temperatura.

Nitrificación.

En la Tabla 51 se presenta el porcentaje de nitrificación obtenido en los periodos de las etapas I, II y III que tienen valores similares en el tiempo de retención celular (TRC), excepto en el periodo II.2 donde el TRC fue menor. Estos periodos se han agrupado a su vez en función del TRH. Los aspectos a destacar en cuanto a los resultados mostrados en la Tabla 51 son los siguientes:

- Se observa en general que se obtienen mayores rendimientos en la nitrificación a TRH mayores a 13 h, con TRC en torno a 23 días. Este hecho está relacionado con la disminución de la carga de sulfuro al sistema, tal y como se ha comentado en cada una de las etapas anteriores.
- La tendencia mostrada en la Tabla 51 permite determinar que de modo general cuando aumenta el TRH el porcentaje de nitrificación es mayor. Sin embargo, se puede observar que en el periodo III.2 la baja temperatura pudo influir sobre el porcentaje de nitrificación a pesar del tiempo de retención fijado en este periodo (TRH=29,4 h; T=12,3°C). No obstante, la temperatura no parece ser el parámetro fundamental a la hora de explicar el descenso del porcentaje de

nitrificación. Si se compara los periodos III.2 y I.4, operados a un TRC y TRH similares (23 d, 12°C) se observa que el experimento III.2 operado a un mayor TRH ofrece mejores porcentajes de nitrificación. Este hecho refuerza que el TRH es un parámetro de elevada influencia para favorecer el porcentaje de nitrificación en este proceso.

Tabla 51. Comparación del porcentaje de nitrificación alcanzado en diferentes periodos.

Periodo	TRH(h)	TRC (d)	T (°C)	%Nitrificación
I.3	12,9	25,4	16,4	38,4
I.4	13,1	23,0	12,7	36,3
III.4.b	13,0	24,5	16,0	29,7
III.4.f	13,0	24,5	16,0	25,1
III.4.e	16,0	24,5	16,0	75,3
III.4.d	20,0	24,5	16,0	98,8
II.1	24,3	26,9	14,9	99,3
II.2	25,1	18,0	22,0	83,2
III.4.c	26,0	24,5	16,0	99,6
III.1	28,7	24,2	17,2	92,0
III.2	29,4	23,2	12,3	68,6

- En la Tabla 51 se observa que en el periodo II.2, el TRC fijado fue de 18 días, siendo inferior que el resto de periodos. El porcentaje de nitrificación fue del 83% siendo este valor menor que en los periodos con condiciones similares (elevado tiempo de retención hidráulico y temperatura TRH=25,1; T=22°C). Este hecho pudo estar influenciado por el menor tiempo de retención celular fijado en este periodo (TRC=18 d). Es decir, en el sistema estudiado, TRC inferiores a 20 días pueden dificultar los procesos llevados a cabo, especialmente la nitrificación.

- En general, para los periodos presentados en la Tabla 51, se observó que el aumento del TRH favorece el rendimiento de la nitrificación. Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta, que la oxidación del sulfuro hasta sulfato aumenta, oxidándose casi por completo en la zona anaerobia y anóxica sin llegar a inhibir a los organismos nitrificantes en la zona aerobia. Tal y como se observó en el periodo III.4 el tipo de inhibición ocasionada por el sulfuro es reversible. Una vez el sulfuro desaparece o se transforma, los organismos nitrificantes recuperan su actividad.

Desnitrificación.

Para analizar el proceso de desnitrificación se han agrupado en la Tabla 52 aquellos periodos en los que se obtuvieron menores y mayores porcentajes de desnitrificación en función del TRH, TRC y temperatura.

Tabla 52. Comparación entre periodos durante la desnitrificación.

Periodo	TRH (h)	TRC (d)	T (°C)	%Nitrif	%Nelim	%Desnit
I.2	13,1	26,8	20,6	42,1	34,5	62,9
I.3	12,9	25,4	16,4	38,4	21,1	57,1
I.4	13,1	23,0	12,7	36,3	19,8	68,6
II.1	24,3	26,9	14,9	99,3	55,9	60,1
II.2	25,1	18,0	22,0	83,2	52,0	62,8
III.2	29,4	23,2	12,3	68,6	39,2	57,9
III.3	29,8	38,6	13,5	42,6	34,6	62,9

Nitrif (Nitrificación), %Nelim (Nitrógeno eliminado), %Desnit (Desnitrificación)

De estos resultados se puede extraer que en los periodos en los que se obtienen mayores rendimientos en términos de nitrógeno eliminado y porcentaje de desnitrificación concuerda con aquellos periodos en los que el porcentaje de nitrificación es mayor. El aumento del porcentaje de nitrificación permite que exista una mayor concentración de nitratos

recirculados desde la zona aerobia a la anóxica, donde luego los nitratos son desnitrificados.

Otro aspecto importante es que en todos los periodos el porcentaje de desnitrificación obtenido no superó el 60%, hecho que podría explicarse teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- La disponibilidad de materia orgánica en forma de AGV en estos periodos es determinante para el proceso de desnitrificación. Una baja concentración de materia orgánica podría limitar el proceso.
- El TRH en la zona anóxica es una variable que puede influir sobre los rendimientos obtenidos, en este caso ese parámetro no fue modificado.
- La presencia de otros dadores de electrones que aumentan la disponibilidad de DQO en el sistema y favorecen el proceso de desnitrificación. Algunos de los dadores de electrones presentes en el afluente identificados en este estudio son el sulfuro y el metano disuelto. El sulfuro en principio sería suficiente en todos los periodos para desnitrificar todos los nitratos, pero esto no se observó debido probablemente a que no todos los sulfuros están disponibles para la desnitrificación ya que una parte son oxidados hasta tiosulfato y sulfato en la zona anaerobia, con el poco oxígeno presente.

En la Tabla 53 se muestran los valores medios de las concentraciones de AGV, sulfuro y metano disuelto para cada periodo analizado anteriormente.

La concentración media de sulfuro y metano disuelto en casi todos los casos fue del mismo orden y en torno a 210,5 mg DQO l⁻¹ y 32,4 mg DQO l⁻¹ respectivamente. Tal y como se explicó en cada una de las etapas (I, II y III), una alta concentración de AGV favorece el proceso de desnitrificación. Sin embargo, existen periodos (I.2, II.1 y II.2) en donde los AGV presentes son

menores y se obtiene un porcentaje de desnitrificación similar a los periodos con concentraciones elevadas de AGV. Este hecho indica que para poder obtener mayores porcentajes de desnitrificación existe la participación simultánea de AGV, sulfuro y metano disuelto que favoreció el proceso de desnitrificación. Un aspecto a destacar, es que en todos los periodos a pesar de las variaciones en la concentración de AGV el porcentaje de desnitrificación fue superior al 57%.

Tabla 53. Concentración de AGV, sulfuro y metano en periodos con mayor porcentaje de desnitrificación.

Periodo	AGV	S²⁻	CH₄	%Desnit
	(mgDQO·l⁻¹)	(mgDQO·l⁻¹)	(mgDQO·l⁻¹)	
I.2	27,6	203,2	35,2	62,9
I.3	29,9	218,0	41,7	57,1
I.4	64,8	211,4	25,9	68,6
II.1	26,9	207,6	44,1	60,1
II.2	27,3	214,6	39,3	62,8
III.1	48,0	205,4	21,7	61,5
III.2	88,1	223,4	13,4	57,9
III.3	67,3	200,4	38,6	52,9

%Desnit (desnitrificación)

Eliminación biológica de fósforo.

El análisis comparativo entre los diferentes periodos en función del porcentaje de fósforo eliminado se presenta en la Tabla 53. Al igual que en los procesos anteriores se comparó el porcentaje de fósforo eliminado en función del TRH, TRC, temperatura, porcentaje de nitrificación y porcentaje de nitrógeno eliminado en cada periodo.

En la Tabla 54 se puede observar que los periodos donde se obtiene un mayor rendimiento en términos de eliminación de fósforo, corresponden con

aquellos en los que la nitrificación estaba limitada y el porcentaje de nitrógeno eliminado era menor, excepto en el periodo III.1 donde el porcentaje de fósforo eliminado fue del 62% y la nitrificación estaba bien establecida. En los periodos en los que la nitrificación estaba bien establecida el porcentaje de eliminación de fósforo se situó en torno al 42%.

Tabla 54. Comparación entre periodos con mayor porcentaje de eliminación de fósforo.

Periodo	TRH(h)	TRC (d)	T (°C)	%Nitrif	%Nelím	%P elim
I.2	13,1	26,8	20,6	42,1	34,5	60,3
I.3	12,9	25,4	16,4	38,4	21,1	60,0
I.4	13,1	23,0	12,7	36,3	19,8	64,7
II.1	24,3	26,9	14,9	99,3	55,9	41,7
II.2	25,1	18,0	22,0	83,2	52,0	44,2
III.1	28,7	24,2	17,2	92,0	57,2	62,9
III.2	29,4	23,2	12,3	68,6	39,2	57,5
III.3	29,8	38,6	13,5	42,6	34,6	70,1

Nitrif (Nitrificación), Nelím (Nitrógeno eliminado), %P elim (Fósforo eliminado)

Un aspecto importante a destacar es que estequiométricamente se necesitan aproximadamente entre 0,20 - 0,32 mg de DQO por miligramo de ortofosfato eliminado biológicamente (Henze *et al.*, 1995; Smolders *et al.*, 1994). Según esto, con las concentraciones de AGV presentes en el afluente en los periodos que se muestran en la Tabla 53, sería suficiente para eliminar el fósforo presente en el afluente en todos los periodos. Pero esto no se observó, debido a que los AGV no estaban disponibles en su totalidad para las PAO. Otro aspecto que puede influir sobre el proceso de eliminación biológica de fósforo es la presencia de sulfuro. Tal y como se ha comentado anteriormente existen estudios que mencionan, que las PAO son capaces de metabolizar el sulfuro y producir polifosfatos (Wu *et al.*, 2014). Dicho esto, es posible que los rendimientos obtenidos estén influenciados por la presencia de sulfuro en el sistema, favoreciendo el proceso de eliminación biológica de fósforo.

Calidad del efluente obtenido

En la Tabla 55 se presenta las concentraciones de nitrógeno (en sus diferentes fracciones), fósforo total, DQO total y sólidos suspendidos del efluente obtenido en la planta piloto para los periodos evaluados anteriormente. Esto con el objetivo de analizar la calidad del efluente tras el proceso de fangos activados estudiado y evaluar su posible reutilización o vertido. El Real Decreto 1620/2007 por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas, establece un conjunto de valores de referencia (Anexo III), en función del uso para garantizar la ausencia de riesgo sanitario de origen químico o microbiológico en humanos o animales. Los parámetros físico-químicos que deben controlarse en cumplimiento de este Real Decreto son los sólidos en suspensión y la turbidez en todos los casos, el fósforo total para el uso recreativo y el nitrógeno total para el uso ambiental (recarga de acuíferos). De cara a su vertido, debe tenerse en cuenta lo establecido en la Directiva 91/271. Esta directiva limita las concentraciones a verter de SS, DQO, DBO₅ y, para zonas sensibles, también las concentraciones de N_T y P_T (Ver Tabla 1 y Tabla 2).

Tal y como se establece en el Real Decreto existen criterios físico-químicos según el uso del agua depurada que, en la mayoría de los casos, hacen referencia a la presencia de organismos patógenos (*Nematodos*, *Escherichia coli*, *Legionella*, *salmonella*, etc) y sólidos en suspensión. En el caso de la aplicación del agua depurada para usos recreativos y ambientales además de los parámetros mencionados anteriormente se establecen otros en referencia a la presencia de nutrientes tales como el nitrógeno (nitrógeno total y nitrato) y fósforo.

En la Tabla 55 se observa que en los periodos II.1, II.2 y III.1 fue donde se obtuvieron los valores más bajos con respecto al nitrógeno total (NT) en el efluente, siendo en estos periodos donde se obtuvo un mayor porcentaje de

nitrificación. Sin embargo, haciendo referencia al nitrógeno y el fósforo, en todos los periodos el valor obtenido supera al límite exigido para uso ambiental (Recarga de acuíferos 10 mg N l^{-1}) al igual que lo exigido en la directiva 91/271 para zonas sensibles ($10 - 15 \text{ mg N l}^{-1}</math>).$

Con respecto al fósforo total (PT) se observa en la Tabla 55 que en todos los periodos la concentración media está entre 2,6 y 5,1 $\text{mgP l}^{-1}</math>, siendo estos valores superiores a los exigidos en la directiva 91/271 para el vertido a zonas sensibles ($1 - 2 \text{ mg l}^{-1}</math>) y para el uso recreativo ($2 \text{ mg l}^{-1}</math>) de agua depurada en estanques, masas de agua y caudales circundantes sin acceso al público. Para el resto de usos no se fija límite para este parámetro.$$$

Tabla 55. Concentraciones de nitrógeno (en sus diferentes fracciones), fósforo total, DQO total y sólidos suspendidos del efluente para los periodos evaluados.

	N-NH ₄	N-NO ₂	N-NO ₃	N _T	P _T	DQO _T	SS _T
Periodo	(mg·l ⁻¹)						
I.2	17,4±12,1	1,0±0,9	6,9±2,6	28,3±2,2	2,7±1,2	51,8±0,7	24,0±2,1
I.3	31,0±9,3	0,9±0,9	6,9±2,8	39,6±2,6	3,5±0,9	61,3±11,2	26,0±3,2
I.4	33,0±8,7	0,3±0,1	3,9±2,6	38,1±3,9	2,9±1,2	68,1±12,0	29,1±4,2
II.1	3,8±1,3	1,8±3,6	18,2±7,8	25,6±1,7	5,1±1,7	63,2±11,5	16,9±3,6
II.2	8,5±3,8	3,0±1,8	12,1±9,7	24,1±4,1	4,6±1,4	68,8±7,8	26,3±4,2
III.1	3,3±1,5	1,0±0,1	15,9±3,5	19,3±7,7	2,7±1,7	57,9±7,7	20,6±4,7
III.2	17,6±6,4	1,0±1,0	14,3±2,7	39,6±11,5	3,7±1,7	63,8±6,6	26,8±2,9
III.3	36,3±9,2	1,2±1,4	10,8±1,0	49,5±13,0	2,6±1,9	67,1±9,5	26,3±5,2

A partir de los resultados obtenidos en cada una de las etapas analizadas en este capítulo se han extraído una serie de conclusiones generales que pueden ser tenidas en cuenta para el correcto funcionamiento de los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo:

- El proceso de nitrificación se ve favorecido cuando el sistema trabaja a tiempos de retención hidráulica y tiempos de retención celular

superiores a 16 h y 20 días respectivamente, referido a temperaturas mayores a 12 °C.

- La disminución del rendimiento del proceso de desnitrificación está influenciado principalmente por la disponibilidad de AGV en la zona anóxica y por la cantidad de nitratos recirculados desde la zona aerobia a la anóxica. La presencia de sulfuro y metano disuelto favorece el rendimiento de la desnitrificación ya que actúa como un aporte extra de DQO al sistema.
- El proceso de eliminación de fósforo se ve favorecido por el deterioro de la nitrificación, debido principalmente a que la cantidad de nitratos recirculados desde la zona anóxica a la anaerobia disminuye, siendo mayor la disponibilidad de materia orgánica para las PAO. Las PAO han sido capaces de mantenerse en el sistema a pesar de los cambios operacionales en cada etapa sin necesidad de realizar una aclimatación previa. En cuanto las condiciones eran favorables, los organismos PAO comenzaban rápidamente a metabolizar el fósforo presente.
- Respecto a la calidad del efluente y haciendo referencia únicamente a la presencia de nutrientes (nitrógeno y fósforo) no es posible su reutilización para uso ambiental (Anexo III). Para el resto de usos no está definido el límite máximo de nitrógeno y fósforo por lo que su reutilización es posible. Sería necesario únicamente un tratamiento previo de desinfección que permita cumplir con los requisitos mínimos exigidos. En cuanto al vertido del efluente obtenido en este estudio a zonas sensibles, se determinó que no cumple con la legislación obtenida a pesar de los porcentajes de remoción en cada etapa.

4.2.5 Ensayos en laboratorio

Como ya se comentó anteriormente, el estudio de la influencia de los compuestos de azufre en los procesos de nitrificación y desnitrificación fue llevado a cabo mediante experimentos a escala laboratorio.

Estos experimentos tienen como objetivo principal el estudio de la inhibición de los organismos nitrificantes por la presencia de sulfuro y otros compuestos intermedios generados en la oxidación del sulfuro, tales como el tiosulfato. También, se estudió la participación del sulfuro en el proceso de desnitrificación.

4.2.5.1 Inhibición de la nitrificación por sulfuro y tiosulfato

La Tabla 56 recoge los experimentos realizados para el estudio de la inhibición de la nitrificación empleando sulfuro y tiosulfato. Se empleó tiosulfato en estos experimentos debido a que algunos autores (O'Flaherty *et al.*, 1998; Bejarano, 2015) mencionan que la inhibición de la nitrificación puede ser causada por compuestos intermedios como el tiosulfato (S_2O_3) sobre la nitrificación. Además, el tiosulfato fue uno de los compuestos detectados en el seguimiento de la planta piloto.

En total se realizaron 12 experimentos a dos temperaturas distintas 13 y 20°C. Estas temperaturas corresponden con los valores de temperatura registrados en los periodos del estudio en planta piloto.

Los experimentos fueron realizados siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.2. Tal y como se indica en dicho apartado, para los experimentos se empleó fango biológico activo procedente de la planta piloto y de las EDAR del Carraixet (Alboraya, Valencia) y Quart-Benàger (Valencia). Las condiciones de los experimentos y el inhibidor empleado se presentan en la Tabla 56.

Tabla 56. Condiciones de los experimentos realizados para el estudio de la inhibición de la nitrificación por sulfuro y tiosulfato.

Exp.	Fango	Sustrato/inhibidor	Temperatura
1	P. Piloto	Amonio	13°C
2	P. Piloto	Amonio/Sulfuro	13°C
3	P. Piloto	Amonio	20°C
4	P. Piloto	Amonio/Sulfuro	20°C
5	P. Piloto	Amonio/Tiosulfato	20°C
6	EDAR Carraixet	Amonio	13°C
7	EDAR Carraixet	Amonio/Sulfuro	13°C
8	EDAR Carraixet	Amonio	20°C
9	EDAR Carraixet	Amonio/Sulfuro	20°C
10	EDAR Carraixet	Amonio/Tiosulfato	20°C
11	EDAR Quart-Benàger	Amonio/Sulfuro	20°C
12	EDAR Quart-Benàger	Amonio/Tiosulfato	20°C

A continuación se presentan los resultados obtenidos. Los datos presentados describen el comportamiento de la concentración de amonio, nitrito, nitrato, sulfuro y tiosulfato durante los experimentos.

Experimentos con fango de la Planta Piloto

Los experimentos que se realizaron con fango de la planta piloto fueron: exp. 1, 2, 3, 4 y 5. En todos los experimentos se ajustó el pH a 7 para poder compararlos entre ellos y para descartar el efecto del pH sobre los organismos nitrificantes. En cada experimento realizado, se comprobó inicialmente mediante una respirometría de control sin sulfuro la actividad nitrificante del fango, y se determinó la velocidad de consumo de los organismos nitrificantes. Posteriormente, se dejó evolucionar el sistema hasta que el fango se encontrará en condiciones endógenas, es decir, a que el consumo de oxígeno registrado (OUR) se debiera a la metabolización del sustrato generado por la propia muerte de los organismos y no de ningún

otro sustrato externo. Los experimentos se programaron para que la fase endógena no se prolongara demasiado, pues una fase endógena extensa produce una rotura de las reservas intracelulares que afecta a las características de la biomasa (García-Usach 2002). A partir de este punto, se inició el ensayo de inhibición y se determinó la velocidad de consumo de los organismos nitrificantes en presencia del agente inhibidor (sulfuro o tiosulfato). Esto permitió comparar las velocidades de consumo de amonio con el fango de la planta piloto en ambas condiciones (sin y con inhibidor). A continuación se presentan los resultados en cada uno de los experimentos realizados.

Experimento 1

El fango utilizado fue extraído de la planta piloto durante la etapa III, hacia el día 625, cuando la nitrificación estaba inhibida. La concentración de amonio en el efluente de la planta piloto en ese momento era elevada ($34,0 \text{ mg N-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1}$) y la concentración de SSV en el fango de 1350 mg l^{-1} . En la Figura 71 se puede observar la evolución de la concentración de amonio, nitrito y nitrato durante el experimento. También se presenta la evolución de la OUR y la temperatura durante el ensayo. En este experimento se observó que la concentración de amonio sigue una tendencia descendente, debido a la actividad nitrificante del fango, con una velocidad de consumo de amonio de $18,5 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ($0,77 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

A medida que el amonio era consumido, se observó la formación transitoria de nitrito que desapareció al final del experimento, cuando éste fue oxidado a nitrato. La concentración máxima de nitrito acumulado fue de $9,5 \text{ mg N-NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$, como se puede observar en la Figura 71 (Tiempo=1,2 h). Los resultados obtenidos en el experimento 1, muestran que cuando el fango es extraído de la planta piloto, éste recupera la actividad nitrificante. También, es posible observar en la Figura 71 que la velocidad de los organismos nitritooxidantes es más lenta acumulándose nitrito durante el

experimento. En concordancia con los resultados obtenidos por Bejarano, 2010, la presencia de sulfuro afecta en mayor proporción a los organismos nitratooxidantes. Los resultados obtenidos parecen indicar que la recuperación de la actividad nitrificante observada en este fango, puede deberse a que los organismos dejan de estar sometidos a una presencia continua de sulfuros, ya que este va siendo oxidado durante el experimento.

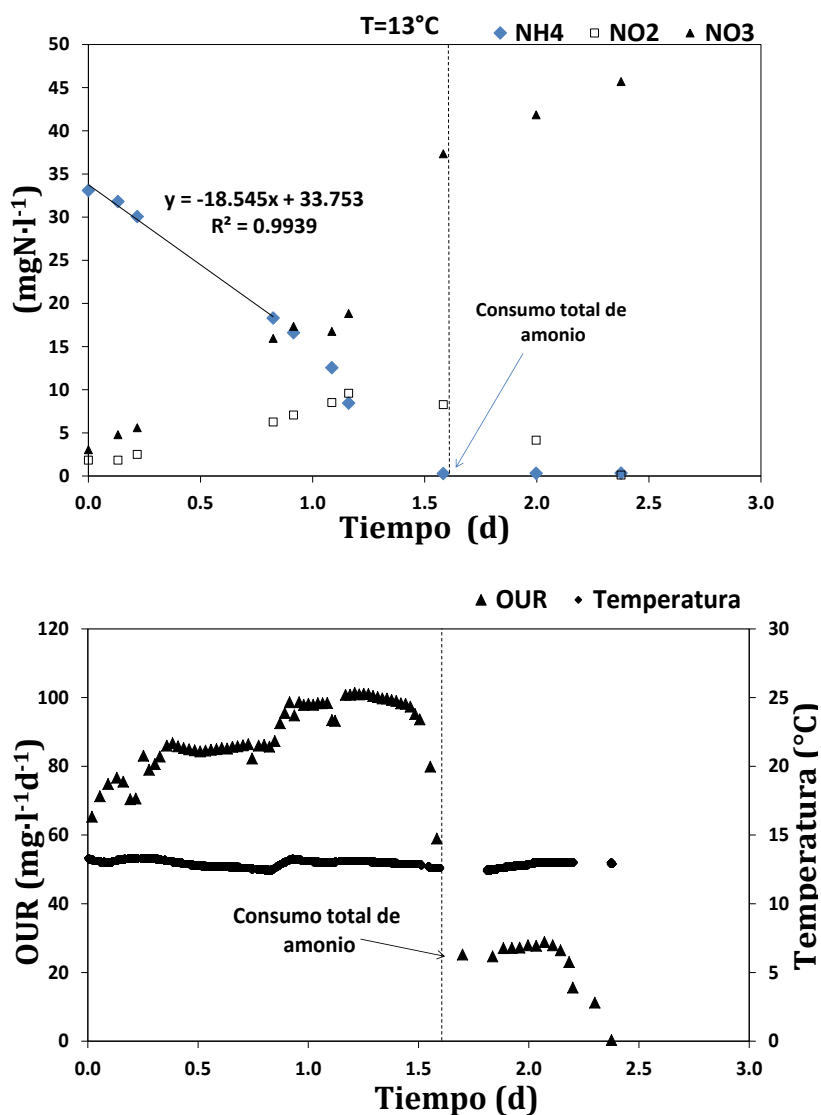


Figura 71. Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) y de la OUR (Exp 1).

La evolución de la OUR permitió observar que la velocidad de consumo de oxígeno aumenta hasta que el todo el nitrógeno en forma de amonio y nitrito es totalmente oxidado hasta nitrato, momento en el que la OUR decrece y el fango alcanza la fase endógena (Tiempo=1,6 días). Se observa un segundo descenso de la OUR (Tiempo=2,2 días) que puede estar relacionado con la oxidación de los nitritos formados anteriormente.

Experimento 2

El experimento 2 se realizó a la misma temperatura del experimento 1 ($T=13^{\circ}\text{C}$). En este experimento se determinó la velocidad de consumo de amonio antes de inhibir el fango y después, cuando la biomasa fue sometida a una concentración media de sulfuro de $5,0 \text{ mgS}\cdot\text{l}^{-1}$ durante 3 horas. El fango utilizado en el experimento 2 fue extraído de la planta piloto durante la etapa III hacia el día 638, cuando la nitrificación estaba inhibida y la concentración de amonio en el efluente de la planta piloto era de $61 \text{ mgN-NH}_4\cdot\text{l}^{-1}$. En este momento la concentración de SSV era de $1202 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. En la Figura 72 se muestra la evolución de la concentración de amonio, nitrito y nitrato, antes y después de la inhibición. También se puede ver la OUR y la temperatura durante el experimento.

En la Figura 72 se observa que durante la respirometría de control, es decir antes de inhibir la biomasa (primeras 3,5 h) el amonio disminuyó a una velocidad de consumo de amonio de $19,1 \text{ mgN}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ($0,79 \text{ mgN-NH}_4\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), similar al experimento 1 tal y como era de esperarse, ya que la biomasa utilizada fue extraída durante la misma etapa. Transcurridos 3,5 días desde el inicio del ensayo, cuando el fango alcanzó la fase endógena tal y como lo muestra la evolución de la OUR, se inició el ensayo de inhibición.

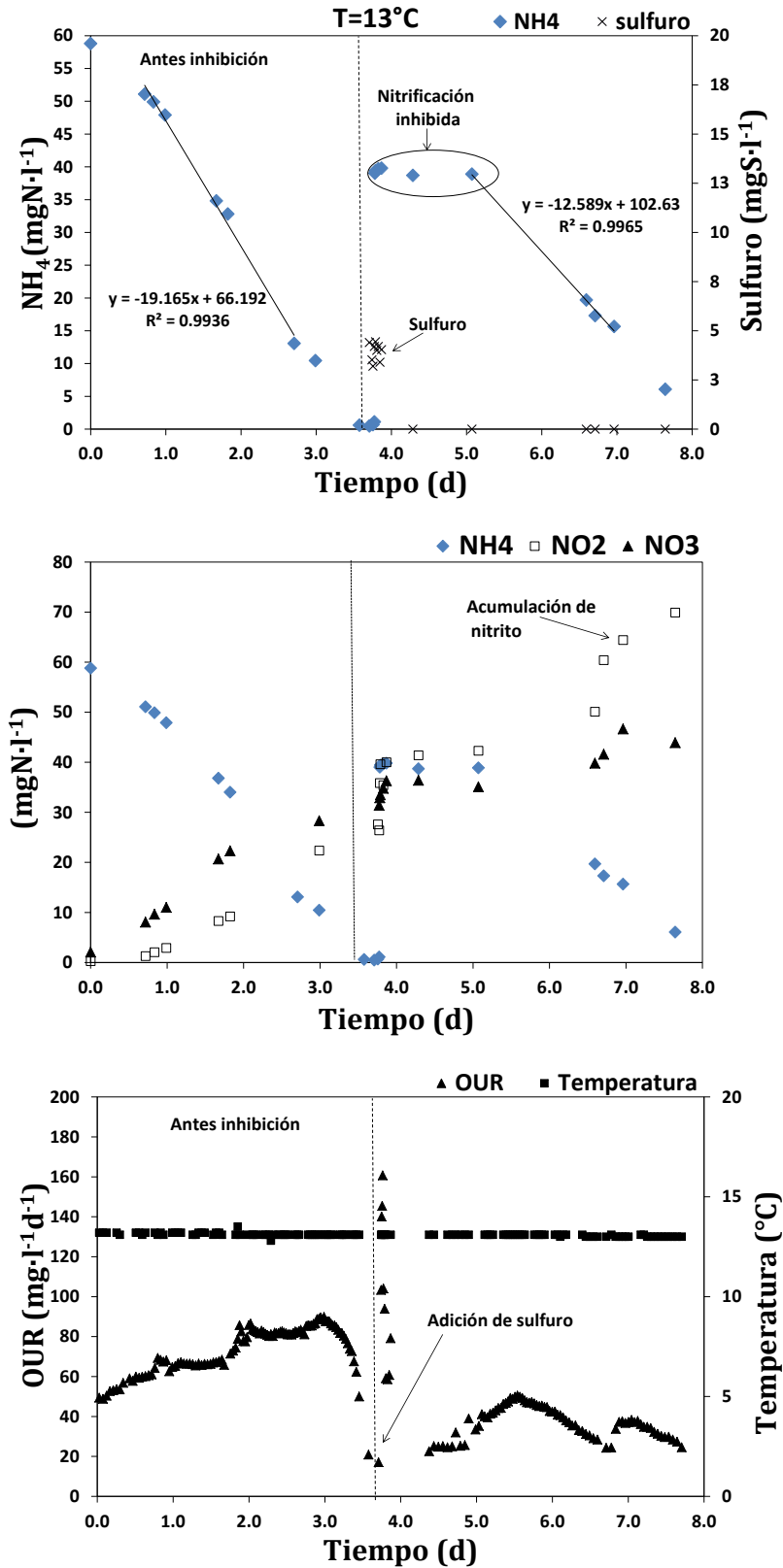


Figura 72. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la planta piloto a 13°C (Exp 2).

En el inicio del ensayo de inhibición (Tiempo=3,5 días), se adicionó un patrón de amonio para alcanzar en el reactor una concentración aproximada de 40 mg N-NH₄ l⁻¹. Posteriormente, se sometió el fango a una exposición continua de sulfuro durante 3 horas manteniendo una concentración media de sulfuro de 5,0 mgS l⁻¹. Pasado este tiempo, se suspendió la adición de sulfuro y se continuó realizando el seguimiento de la concentración de amonio.

Un aspecto interesante observado en este ensayo, es que durante la adición de sulfuro (Tiempo=3,6 días), la OUR aumentó considerablemente debido al rápido consumo de oxígeno generado por la oxidación química del sulfuro.

Los resultados muestran que durante la adición de sulfuro no se detectó una disminución de la concentración de amonio con el tiempo, siendo este hecho indicativo de la inhibición de los organismos nitrificantes. Al cabo de aproximadamente 24 horas, después de suspender la adición de sulfuro se observó que el amonio empezó a descender, indicando una recuperación de la actividad nitrificante tal y como se observa en la Figura 72. Se observó, que a medida que el amonio era oxidado se formaba nitrito y nitrato, observándose un acumulación importante de nitrito al final del ensayo.

La velocidad de consumo de amonio después de la adición de sulfuro a pesar de la recuperación de la actividad nitrificante disminuyó hasta 12,5 mgN-NH₄ l⁻¹ d⁻¹ (0,52 mgN-NH₄ l⁻¹ h⁻¹).

Experimento 3

En el experimento 3 se presentan los resultados obtenidos a 20°C empleando fango de la planta piloto. El fango utilizado fue extraído durante la etapa III hacia el día 640 cuando la nitrificación estaba inhibida. La concentración de amonio en el efluente de la planta piloto en el momento del ensayo era de 41,0 mg N-NH₄ l⁻¹ y la concentración de SSV de 1330 mg l⁻¹. La Figura 73

muestra la evolución de la concentración de amonio, nitrito, nitrato durante el experimento. También se presenta la evolución de la OUR y la temperatura durante el seguimiento del experimento.

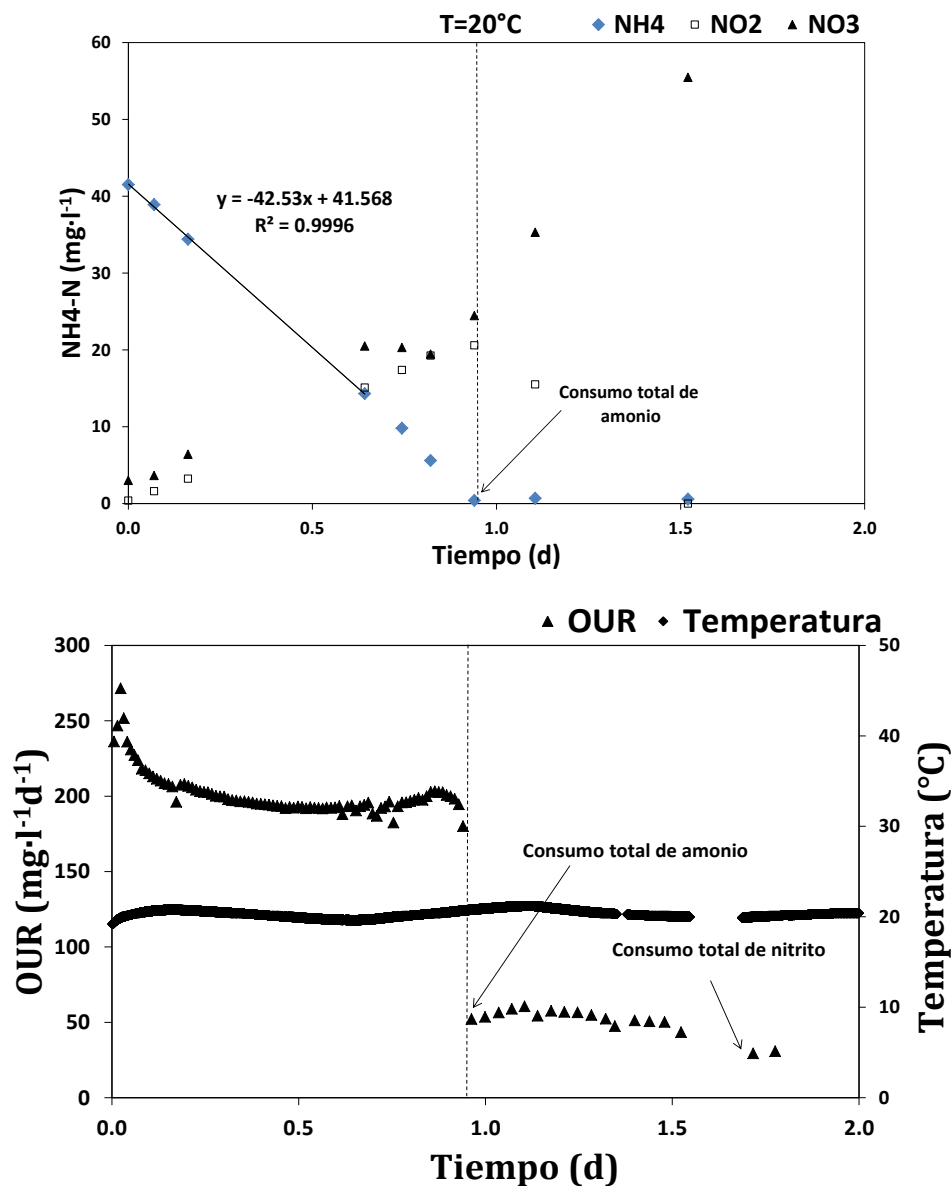


Figura 73. Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) y de la OUR con fango de la planta piloto a 20°C (Exp 3).

En el seguimiento del ensayo se observó que la concentración de amonio disminuía a una velocidad de consumo de amonio de $42,5 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ($1,77 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). También se observó la formación de nitrito y nitrato. Al igual que en el experimento 1, la acumulación transitoria de nitrito durante el ensayo llega a valores cercanos a 20 mgN-NO_2 y fue provocada

por la mayor velocidad de consumo de los organismos amonioxidantes (AOB), respecto a la respuesta de los organismos nitritooxidantes (NOB). Es decir la exposición continuada a la presencia de sulfuro en la planta piloto afecta en mayor grado a los organismos NOB, indicando que son más sensibles a la presencia de sulfuro.

La evolución de los compuestos de nitrógeno en el experimento 3, muestra que cuando el amonio se ha agotado completamente, el nitrito que se ha acumulado durante el experimento es oxidado a nitrato. La evolución de la OUR muestra dos descensos importantes, el primero cuando todo el amonio ha sido consumido y el segundo cuando se ha agotado el nitrito.

Experimento 4

El experimento 4 se realizó a la misma temperatura del experimento 3 (20 °C) en presencia de sulfuro. El fango utilizado fue extraído en la etapa III hacia el día 645, en el mismo periodo en que la nitrificación estaba inhibida. La concentración de amonio al inicio del ensayo fue de 44,4 mg N-NH₄·l⁻¹ con una concentración de SSV en el fango de 1440 mg l⁻¹.

La evolución de la concentración de amonio y de la OUR desde el inicio del experimento (Figura 74) muestra un comportamiento similar a los ensayos anteriores. Inicialmente la concentración de amonio disminuye con el tiempo con una velocidad de 82,3 mgN-NH₄·l⁻¹ d⁻¹(3,42 mgN-NH₄·l⁻¹ h⁻¹). Con respecto a la evolución de la OUR se observó, que una vez el amonio y el nitrito son consumidos, el valor de esta variable disminuye hasta la fase endógena.

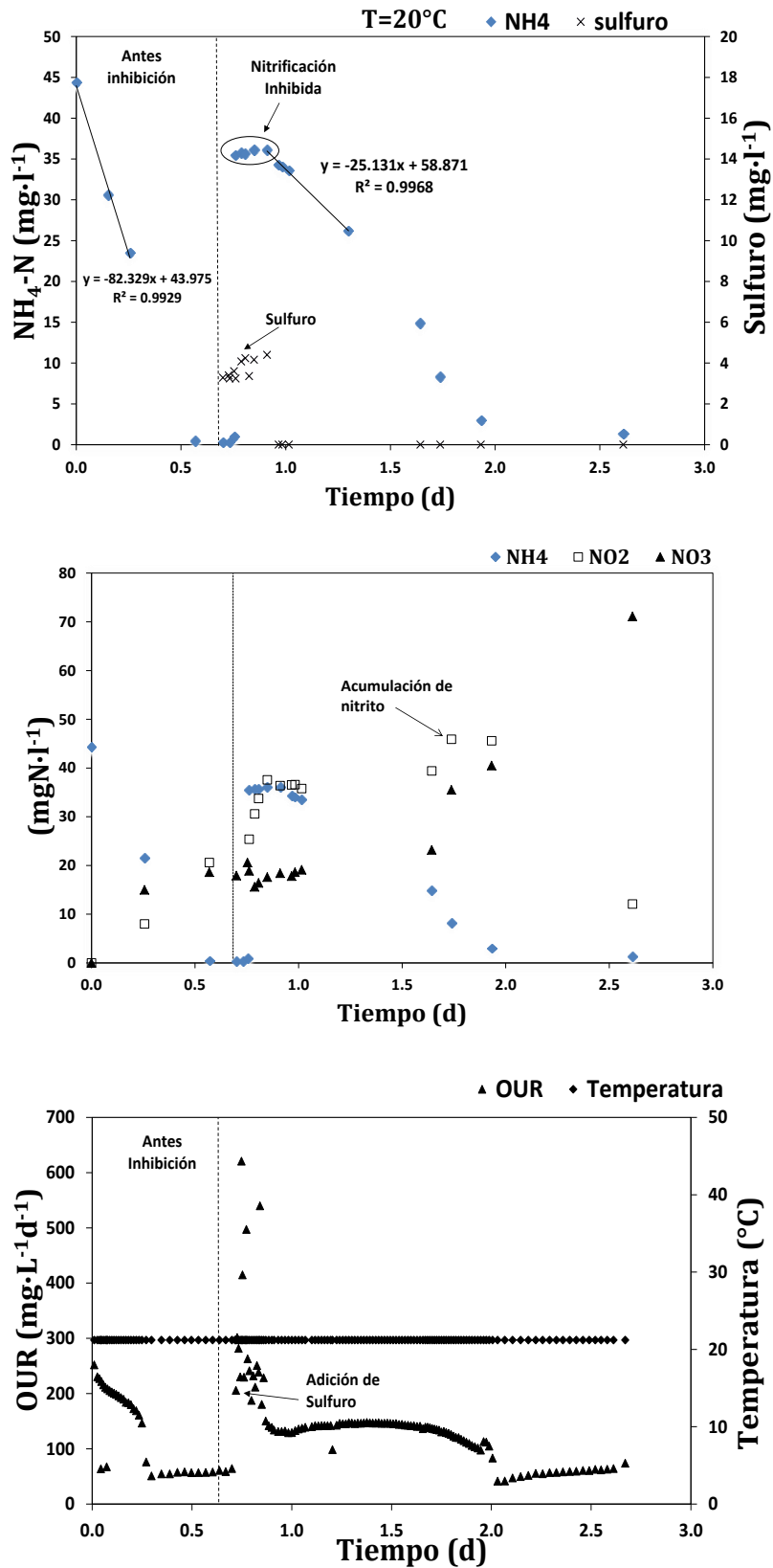


Figura 74. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la planta piloto a 20°C (Exp 4).

Al inicio del ensayo de inhibición (Tiempo= 0,7 d) se adicionó un patrón de cloruro de amonio para una concentración inicial en el reactor de 35,5 mg N-NH₄·l⁻¹, después el fango se sometió a una exposición continua de sulfuro (4,0 mg S·l⁻¹) durante 3 horas. En la Figura 74 se puede observar que durante la adición de sulfuro, la concentración de amonio se mantuvo constante, indicando una inhibición de los organismos nitrificantes. A la vista de los resultados se observó que a las condiciones del ensayo, cuando se suspende la adición de sulfuro, los organismos recuperan la actividad nitrificante y el amonio empieza a descender. La velocidad de consumo de amonio después de la inhibición fue de 25,1 mgN-NH₄·l⁻¹·d⁻¹ (1,06 mgN-NH₄·l⁻¹·h⁻¹).

Los resultados en este experimento en términos de inhibición de los organismos nitrificantes en presencia de sulfuro y en la evolución de la OUR durante el ensayo, muestran que una vez el sulfuro desaparece del sistema los organismos nitrificantes que se encontraban inhibidos recuperan su actividad nitrificante (a velocidades distintas que dependen de la temperatura, tiempo de exposición al sulfuro), oxidando el amonio a nitrito y nitrato, acumulándose nitrito en el sistema.

En la Tabla 57 se presenta un resumen de las velocidades de consumo de amonio obtenidas en los experimento realizados a 13 y 20°C en función de la concentración de sólidos suspendidos volátiles del ensayo. Para los experimentos con adición de sulfuro se comparan las velocidades de consumo de amonio antes y después la adición de sulfuro. Como cabría esperar, a menor temperatura se obtienen menores velocidades de consumo. También se observa que la velocidad de consumo de amonio disminuye tras haber sometido al fango a una presencia continuada de sulfuro.

Tabla 57. Velocidades de consumo de amonio, ensayos de inhibición con fango de la planta piloto.

Velocidad de consumo de amonio	mgN-NH ₄ · g SSV ⁻¹ · h ⁻¹	
Temperatura (°C)	13	20
Experimentos 1 y 3	0,57	1,36
(Exp. 2 y 4) Antes de adicionar inhibidor	0,66	2,44
(Exp. 2 y 4) Después de adicionar inhibidor	0,43	0,75

Experimento 5

Con el objetivo de comprobar si existen otros compuestos intermedios de la oxidación del sulfuro que puedan influenciar negativamente el proceso de nitrificación, se realizó un ensayo adicional a una temperatura de 20°C con fango de la planta piloto empleando tiosulfato, compuesto que fue detectado durante el seguimiento del proceso. El fango utilizado en este ensayo fue extraído durante la etapa III hacia el día 729 cuando la nitrificación estaba bien establecida. La concentración de amonio era de 0,7 mgN-NH₄ · L⁻¹ y la de SSV de 1346 mg l⁻¹.

Al igual que en los ensayos anteriores el fango fue sometido a aireación hasta alcanzar la fase endógena (24h). A partir de este punto, se realizó la respirometría de control, para ello se adicionó una concentración de amonio en el reactor de 32 mg N-NH₄ · l⁻¹ y se dejó evolucionar el sistema. La Figura 75 muestra la evolución de la concentración de amonio y de la OUR durante el ensayo.

Se puede observar que en la primera parte del ensayo, la velocidad de consumo de amonio fue de 140 mgN-NH₄ · l⁻¹ d⁻¹ (5,83 mgN-NH₄ · l⁻¹ h⁻¹). Una vez el amonio se agotó y el fango alcanzó la fase endógena, se adicionó

nuevamente amonio para una concentración en el reactor de $33 \text{ mg N-NH}_4\text{-l}^{-1}$ y, simultáneamente, se adicionó tiosulfato para una concentración media en el reactor de $12 \text{ mg S}_2\text{O}_3\text{-l}^{-1}$ (concentración detectada habitualmente en la zona anaerobia de la planta piloto). La adición de tiosulfato se realizó durante 3 horas, al igual que en los ensayos con sulfuro.

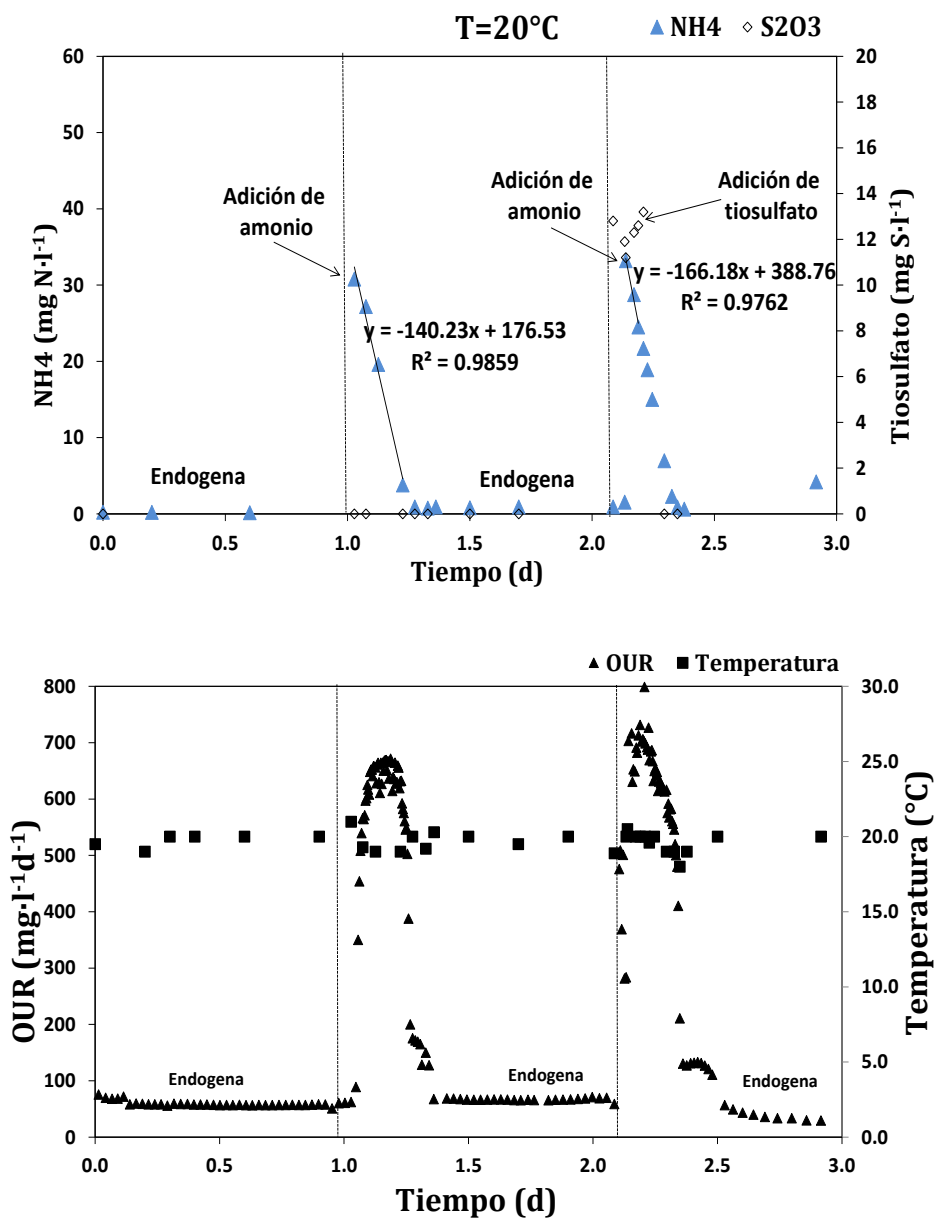


Figura 75. Evolución de la concentración de amonio en presencia de tiosulfato a 20°C (Exp 5).

En el seguimiento realizado a la concentración de amonio y la OUR durante el ensayo, se observó que la concentración de amonio disminuye a pesar de la presencia continua de tiosulfato. La velocidad de consumo en presencia de tiosulfato fue de $166 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($6,91 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) similar a la alcanzada antes de adicionar el tiosulfato, por lo que se deduce que el tiosulfato no afecta negativamente el proceso de nitrificación.

La adición de tiosulfato aumenta el valor de la OUR debido al consumo de oxígeno en exceso necesario para la oxidación del tiosulfato hasta sulfato. Con este ensayo fue posible determinar que con las concentraciones de tiosulfato detectadas en la planta piloto de fangos activados, el tiosulfato no actúa como un compuesto inhibidor de la nitrificación.

Experimentos con fango de la EDAR del Carraixet

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos realizados con fango de la planta piloto, se decidió estudiar el efecto del sulfuro con otro tipo de fango, con el fin de observar la respuesta de organismos nitrificantes no sometidos a la presencia continua de sulfuro. Para ello se utilizó fango procedente de la estación depuradora del Carraixet y se siguió la metodología empleada en los ensayos anteriores. Los experimentos 6 y 7 se realizaron a 13°C y los experimentos 8, 9 y 10 fueron realizados a 20°C .

Experimento 6

El experimento 6 fue realizado con fango de la EDAR del Carraixet a 13°C . Inicialmente el fango contenía una concentración muy baja de amonio y una concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de $3120 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Inicialmente se adicionó un patrón de amonio para una concentración aproximada de $40 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1}$ similar a los experimentos anteriores. Después, el sistema se dejó evolucionar hasta alcanzar la fase endógena (Figura 76).

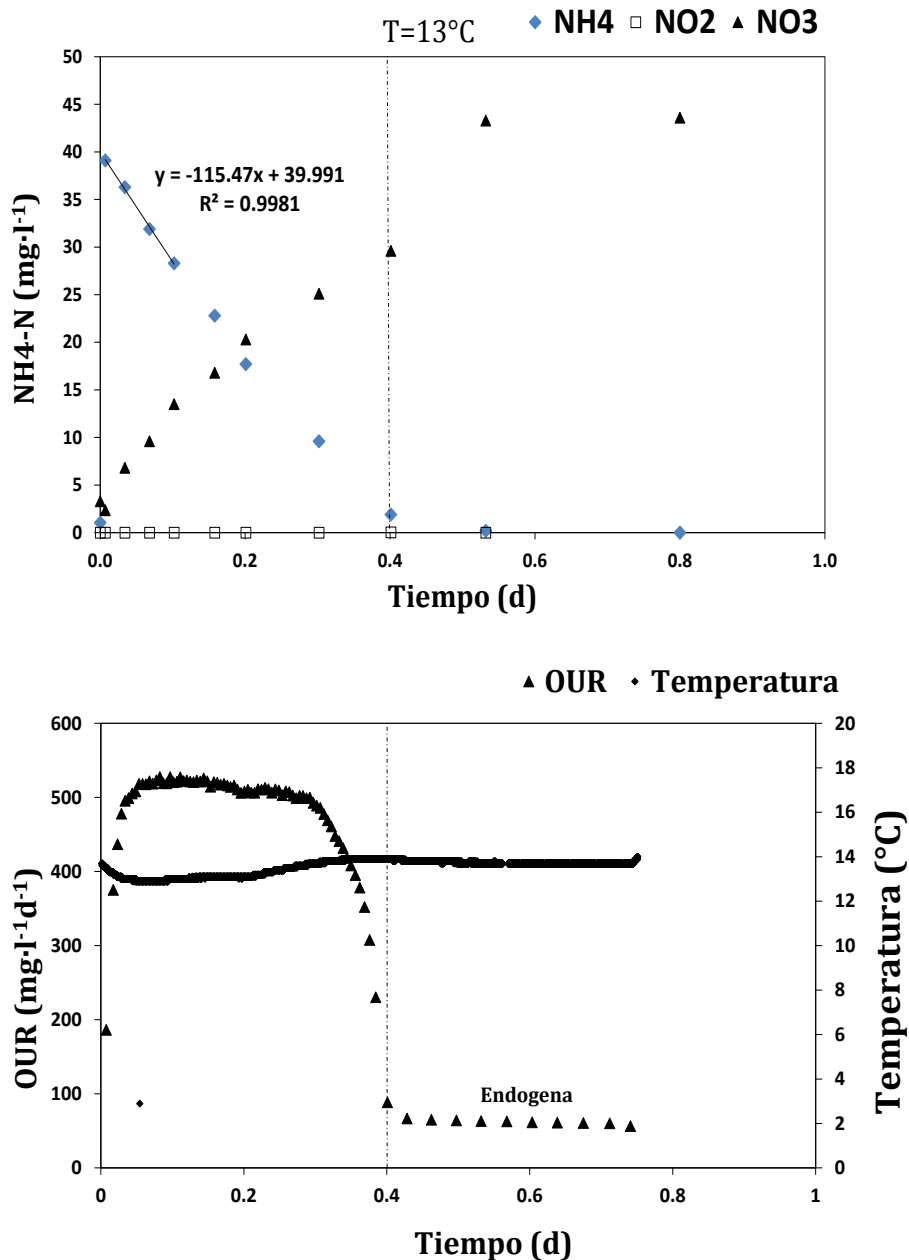


Figura 76. Evolución de la concentración de compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) y de la OUR con fango de la EDAR del Carraixet a 13°C (Exp 6).

La Figura 76 muestra la evolución de los compuestos de nitrógeno (amonio, nitrito y nitrato) obtenidos en el experimento. Se observó que el amonio era oxidado a nitrato con una velocidad de consumo de amonio de $115,4 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ($4,80 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y que el nitrito no se acumulaba en el sistema.

La evolución de la OUR muestra un comportamiento similar a los experimentos anteriores donde la fase endógena se alcanzó cuando todo el amonio había sido oxidado. A diferencia de los ensayos con fango de la planta piloto y como se comentó anteriormente en este ensayo no se observó acumulación de nitrito. En este caso no existe otra caída de la OUR atribuida al consumo de nitrito durante el experimento.

Experimento 7

En el experimento 7 se presentan los resultados obtenidos empleando fango procedente de la EDAR del Carraixet en presencia de sulfuro a 13°C. Al igual que en el ensayo anterior la concentración de amonio era muy baja y la concentración de SSV de 2694 mg · l⁻¹. La Figura 77 presenta la evolución de la concentración de amonio y de la OUR durante el seguimiento del experimento antes y después de la adición de sulfuro.

Inicialmente se dejó evolucionar el sistema hasta la fase endógena como se puede ver en la Figura 77. Posteriormente, se adicionó un patrón de amonio para una concentración aproximada de 35 mgN-NH₄ · l⁻¹ (Tiempo=0,8 d) y se realizó el seguimiento de la concentración de amonio. La velocidad de consumo de amonio antes de la inhibición fue de 64,5 mgN-NH₄ · l⁻¹ d⁻¹ (2,68 mgN-NH₄ · l⁻¹ h⁻¹). En este punto (Tiempo= 1,7 d), se inició el ensayo de inhibición en presencia de sulfuro. El fango fue sometido a una exposición continua de sulfuro de 5,6 mg S · l⁻¹ durante 3 horas. Los resultados fueron similares a los obtenidos con el fango de la planta piloto, se observó que cuando el sulfuro está presente, la concentración de amonio permanece constante y cuando la adición de sulfuro se suspende la concentración de amonio disminuye. La velocidad de consumo de amonio después de la inhibición con sulfuro fue de 29,8 mgN-NH₄ · l⁻¹ d⁻¹ (1,24 mgN-NH₄ · l⁻¹ h⁻¹). El comportamiento de la OUR con fango de la EDAR muestra un descenso más acusado que en el caso de los experimentos 2 y 4 debido a la mayor velocidad de consumo de los organismos nitrificantes.

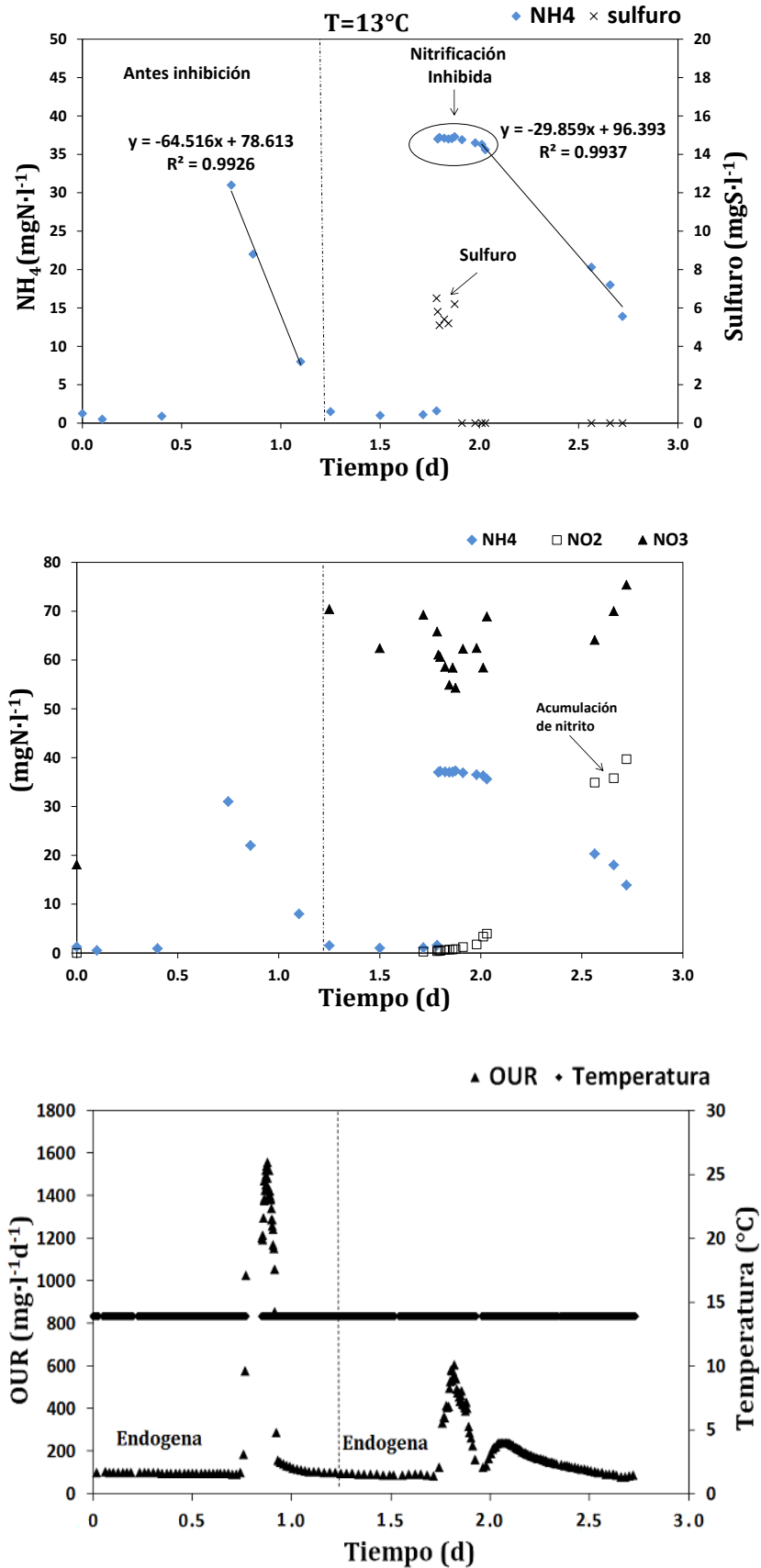


Figura 77. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la EDAR del Carraixet a 13°C (Exp 7).

Experimento 8

El experimento 8 fue realizado con fango de la EDAR del Carraixet a 20°C, la concentración de amonio era muy baja y los SSV en torno a 2754 mg·l⁻¹. El fango una vez extraído de la EDAR se dejó evolucionar hasta alcanzar la fase endógena. Posteriormente se adicionó un patrón de amonio para una concentración en torno a 30 mgN-NH₄ l⁻¹ (Tiempo=1,0 d). De forma paralela se registró la evolución de la concentración de amonio con el tiempo y de la OUR.

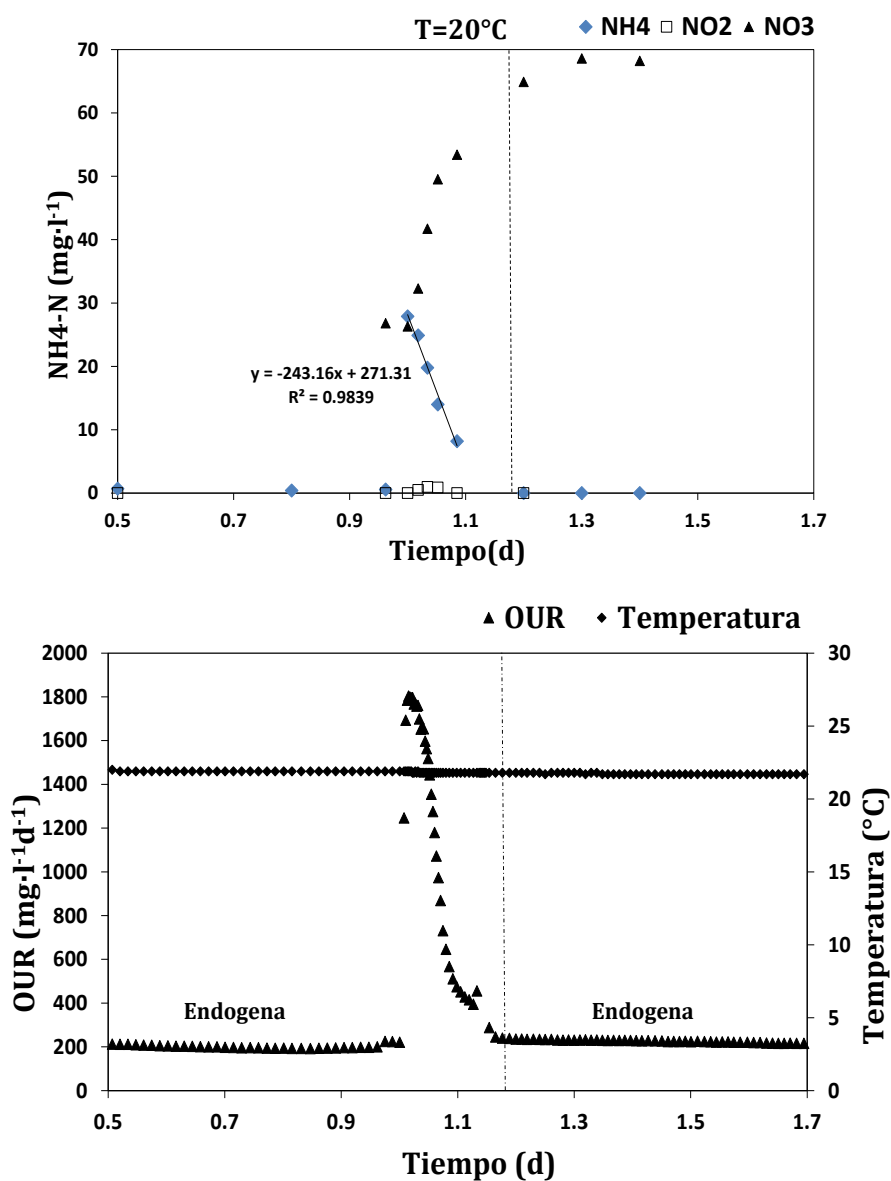


Figura 78. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR empleando fango de la EDAR del Carraixet a 20°C (Exp 8).

Como se puede observar en la Figura 78, el amonio decrece rápidamente oxidándose todo hasta nitrato, siendo la velocidad de consumo de amonio a 20°C de 243 mgN-NH₄ l⁻¹ d⁻¹ (10,12 mgN-NH₄ l⁻¹ h⁻¹). En el experimento no se observó acumulación de nitrito.

Experimento 9

El experimento 9 fue realizado con fango de la EDAR del Carraixet a 20°C en presencia de sulfuro. La concentración de amonio era baja y de SSV de 2890 mg l⁻¹. La evolución de la concentración de amonio, sulfuro y de la OUR en el experimento se muestran en la Figura 79.

Inicialmente el fango se dejó evolucionar hasta alcanzar la fase endógena. Como la concentración de amonio era baja no se determinó la velocidad antes de la inhibición. Después, se adicionó una concentración media de sulfuro de 5,0 mgS l⁻¹ el durante 3 horas, siguiendo paralelamente la evolución de la concentración de amonio. Se observó que durante la adición de sulfuro la concentración de amonio se mantuvo constante. Las gráficas muestran claramente que la inhibición es debida al sulfuro presente en el medio. La velocidad de consumo de amonio después de la adición de sulfuro fue de 152,3 mgN-NH₄ l⁻¹ d⁻¹ (6,34 mgN-NH₄ l⁻¹ h⁻¹).

En la Tabla 58 se presentan las velocidades de consumo de amonio obtenidas en los ensayos con fango de la EDAR del Carraixet a 13 y 20°C. Como cabría esperar la velocidad no es independiente de la temperatura del ensayo, observándose que a mayor temperatura la velocidad de consumo de amonio aumenta. Comparando estos resultados con los obtenidos en los experimentos con fango de la planta piloto, se observa que las velocidades con fango del Carraixet son mayores. Esto podría achacarse a que el fango de la planta piloto se encuentra más afectado por la presencia continua de sulfuro.

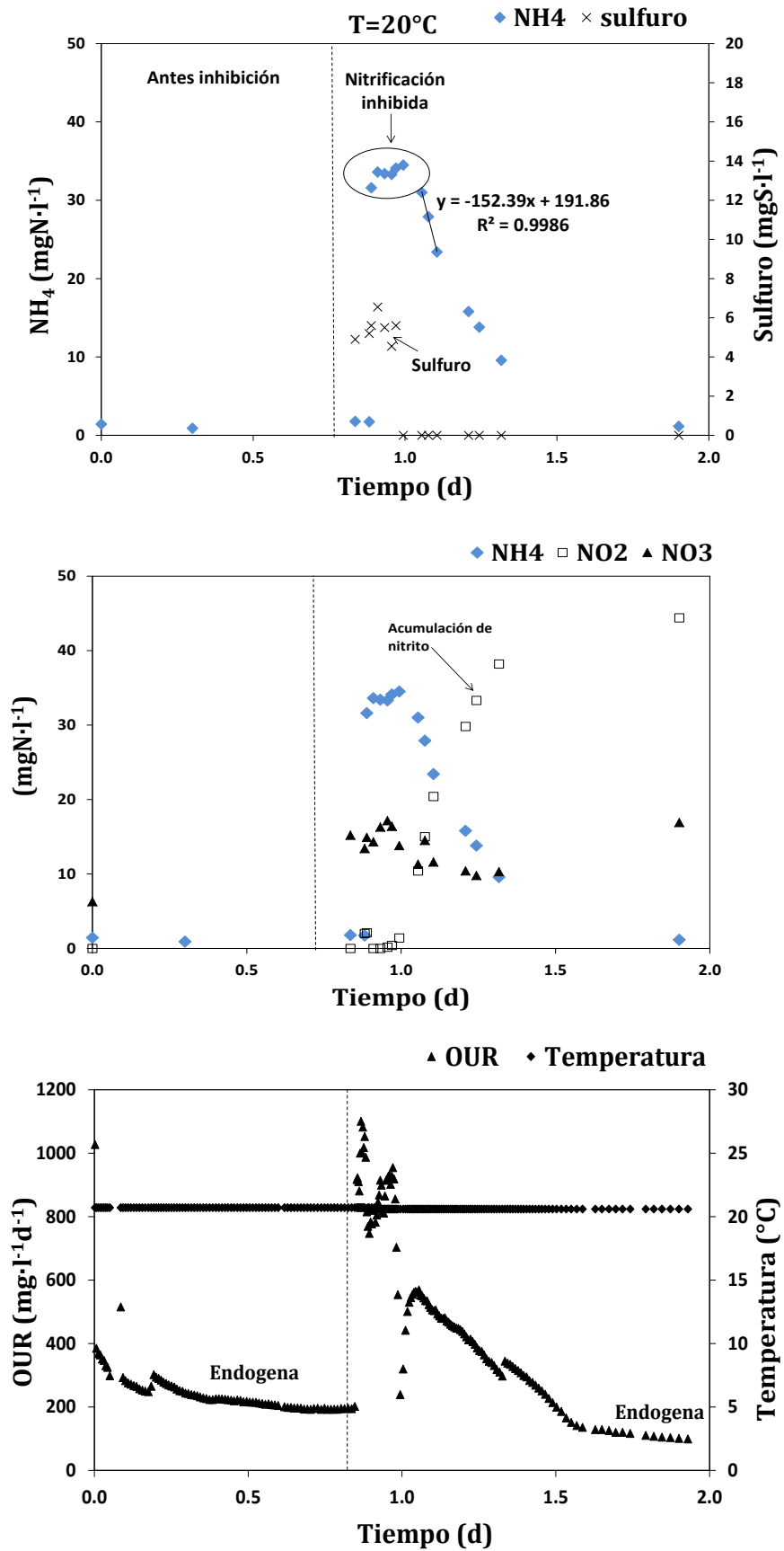


Figura 79. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la EDAR del Carraixet a 20°C (Exp 9).

Tabla 58. Velocidades de consumo de amonio de los ensayos de inhibición con fango de la EDAR del Carraixet.

Velocidad de consumo de amonio	mgN-NH ₄ · gSSV ⁻¹ · h ⁻¹	
Temperatura (°C)	13	20
Experimentos 6 y 8	1,53	3,68
(Exp 7 y 9) Antes de adicionar sulfuro	0,99	-
(Exp. 7 y 9) Después de adicionar sulfuro	0,46	2,19

Experimento 10

En el experimento 10 se presentan los resultados obtenidos con fango de la EDAR del Carraixet a 20°C en presencia de tiosulfato. La concentración de amonio era muy baja y la concentración de SSV de 2740 mg·l⁻¹. Este experimento fue realizado para poder comparar los resultados obtenidos con el experimento realizado con fango de la planta piloto. La evolución de la concentración de amonio y de la OUR se presenta en la Figura 80.

Inicialmente, durante las primeras 24 h del experimento se dejó evolucionar el sistema hasta alcanzar la fase endógena. Posteriormente, se realizó un ensayo de control (tiempo=1,0 d) siendo necesario adicionar un patrón de amonio para una concentración de 30 mgN-NH₄ l⁻¹. Esto permitió comprobar la actividad nitrificante del fango utilizado. La velocidad de consumo de amonio en esta primera parte fue de 243,1 mgN-NH₄ l⁻¹·d⁻¹ (10,1 mgN-NH₄ l⁻¹ h⁻¹). El comportamiento de la OUR fue similar a los obtenidos con el fango de la planta piloto.

Posteriormente, se dejó que el sistema alcanzara nuevamente la fase endógena y se adicionó nuevamente un patrón de amonio para una concentración de 34 mgN-NH₄ l⁻¹ (Tiempo= 1,9 días). Simultáneamente, se adicionó el inhibidor (tiosulfato) para una concentración en el reactor en

torno a $12 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Según los resultados obtenidos después de adicionar el tiosulfato se determinó que, con las concentraciones empleadas en el ensayo, el tiosulfato no causa inhibición sobre los organismos nitrificantes. La velocidad de consumo de amonio obtenida después de adicionar el tiosulfato fue de $398,3 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ($16,5 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Comparando las velocidades obtenidas con las de la planta piloto se observa que el fango de la planta Carraixet tiene una velocidad mayor en función de la concentración de SSV. Es decir, el fango de la planta piloto se encuentra más afectado, tal y como se ha mencionado anteriormente debido a la exposición continua de sulfuro.

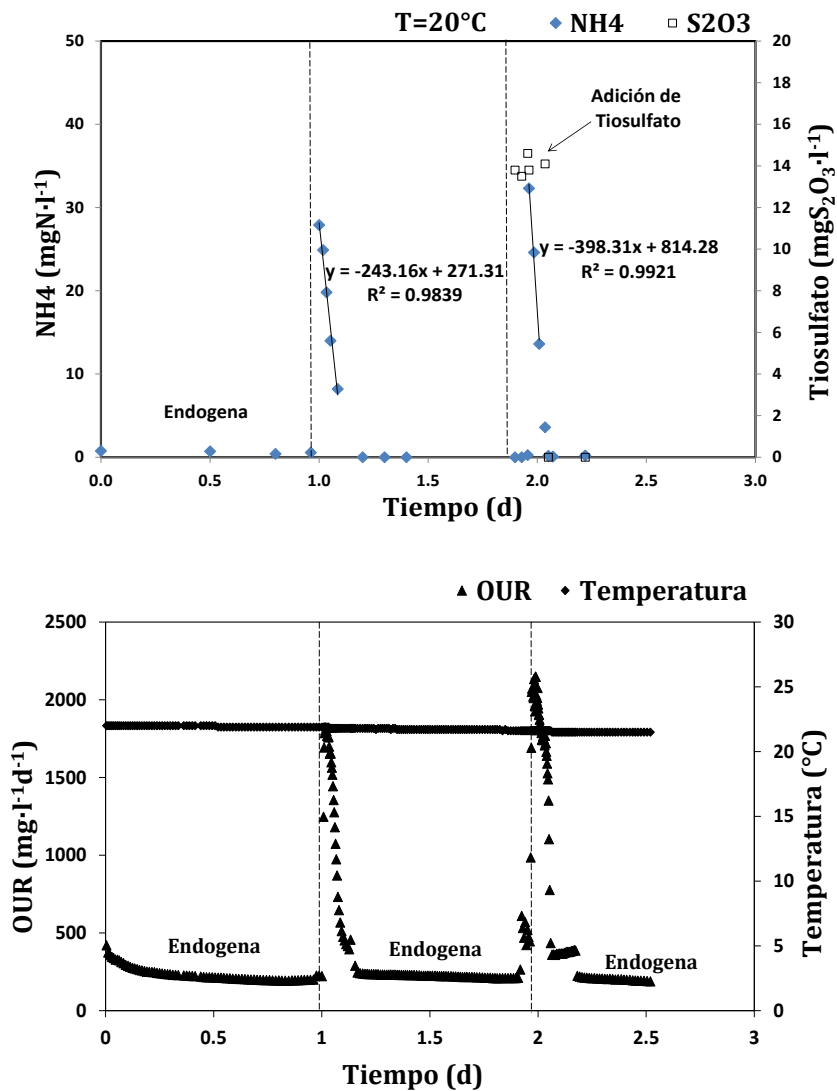


Figura 80. Evolución de la concentración de amonio en presencia de tiosulfato a 20°C (Exp 10).

Experimento con fango de la EDAR Quart-Benàger

Tras comprobar el efecto inhibitorio del sulfuro sobre el fango de la planta piloto y de la EDAR del Carraixet se decidió comprobar una vez más el efecto negativo del sulfuro sobre fango procedente de la EDAR Quart-Benàger a 20°C, el cual también fue usado como inóculo en la planta piloto. Por este motivo, se desea averiguar cuál es la respuesta de los organismos nitrificantes presentes en este fango ante la presencia de sulfuro.

Experimento 11

Los resultados obtenidos empleando fango de la EDAR Quart-Benàger a 20°C en presencia de sulfuro se presentan a continuación. La concentración de sólidos suspendidos volátiles era de 3340 mg·l⁻¹. En la Figura 81 se muestra el seguimiento de la concentración de amonio, sulfuro y de la OUR del experimento 11. Al igual que en los experimentos anteriores, se dejó inicialmente que el fango alcanzará la fase endógena y después se adicionó un patrón de amonio para una concentración de 30 mgN-NH₄·l⁻¹ (Tiempo=0,8 d). Los resultados obtenidos muestran que la velocidad de consumo de amonio antes de la adición de sulfuro fue de 421,6 mgN-NH₄·l⁻¹·d⁻¹ (17,56 mgN-NH₄·h⁻¹), siendo esta velocidad por gramo de SSV (5,25 mgN-NH₄·g SSV h⁻¹) mayor a la obtenida con el fango de la EDAR del Carraixet y la planta piloto.

Una vez todo el amonio es consumido, el fango alcanza nuevamente la fase endógena. En este punto (Tiempo=1,25 días) se adicionó nuevamente amonio para una concentración de 35 mgN-NH₄·l⁻¹ y paralelamente de forma continua se adicionó una concentración media de sulfuro de 5,0 mgS·l⁻¹ durante 3 horas. Durante el tiempo que se adicionó sulfuro se observó que la concentración de amonio se mantuvo constante al igual que en los ensayos anteriores, es decir la biomasa nitrificante estaba inhibida por la presencia del sulfuro en el medio. A partir del momento en que se deja

de adicionar sulfuro se observó que la biomasa recupera la actividad nitrificante. La velocidad de consumo de amonio después de la adición de sulfuro fue $67,2 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ($0,84 \text{ mgN-NH}_4 \cdot \text{gSVV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), siendo esta velocidad menor que la obtenida en la EDAR de Carraixet y similar a la obtenida en la planta piloto.

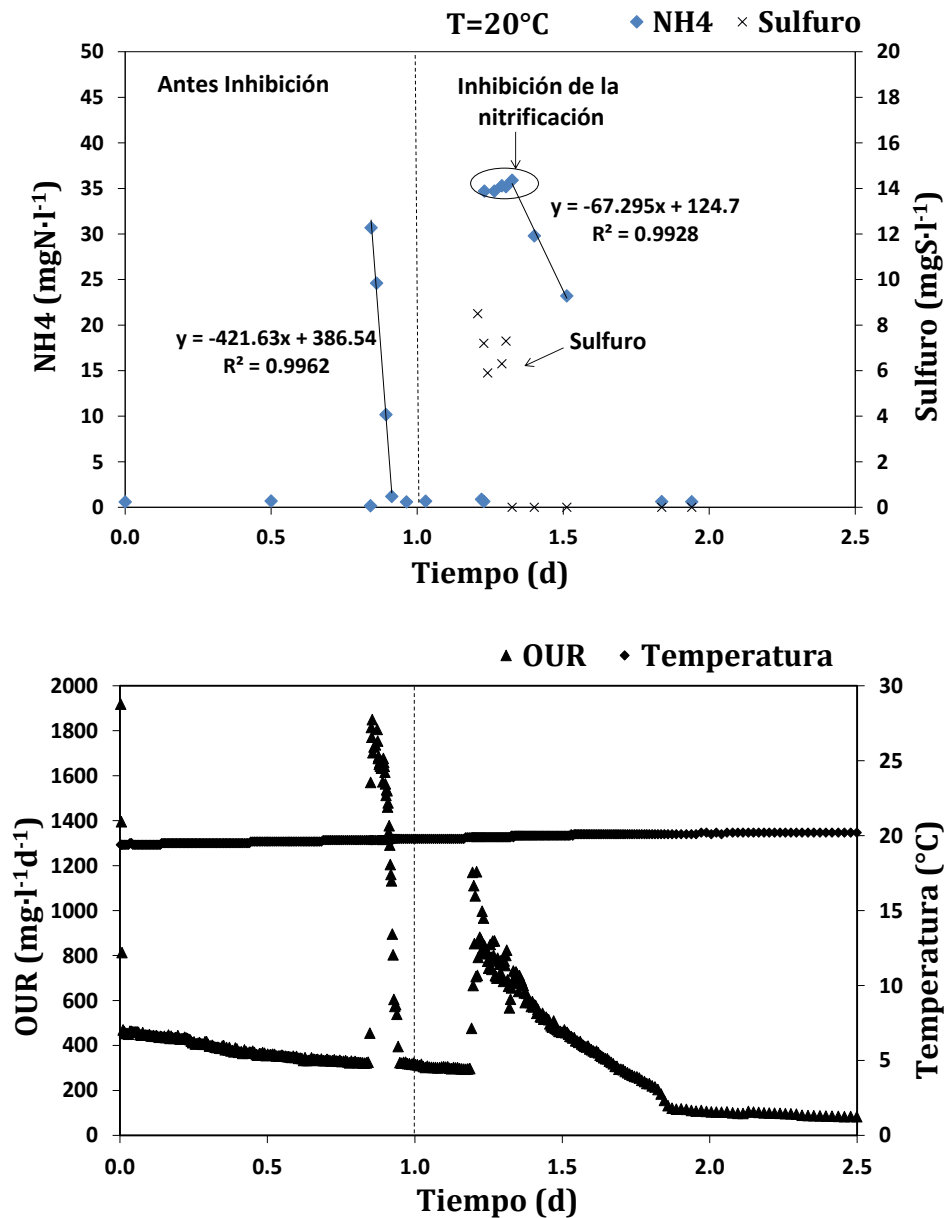


Figura 81. Evolución de la concentración de amonio y de la OUR con fango de la EDAR Quart-Benàger (Exp 11).

El comportamiento de la OUR fue similar al resto de experimentos observándose un descenso acusado de la OUR cuando el amonio es consumido totalmente.

Al comparar los experimentos realizados con los tres tipos de fango, después de suspender la adición del compuesto inhibidor (sulfuro), se observa que la velocidad específica de consumo de amonio a la misma temperatura y en función de los sólidos suspendidos volátiles disminuye aproximadamente un 60%. También, se observaron velocidades de consumo de amonio similares para el fango de la planta piloto y el fango Quart Benàger después de suspender la adición de sulfuro. En el caso del fango de la EDAR del Carraixet se obtuvieron velocidades mayores tras la adición de sulfuro. Como era de esperarse a menores temperaturas la velocidad de consumo de amonio antes y después de adicionar el inhibidor son menores.

En general, en todos los ensayos el aspecto más importante que se puede destacar es que la presencia de concentraciones medias de sulfuro de $5 \text{ mgS} \cdot \text{l}^{-1}$ similares a las detectadas en la zona anaerobia afectan negativamente a los organismos nitrificantes, siendo más sensibles a la presencia de este compuesto los organismos nitritooxidantes (NOB) presentes en el fango, causando la acumulación de nitrito en el sistema, tal y como se observa en los experimentos anteriores. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Erguder *et al.*, 2008 donde mediante la adición de sulfuro consiguió inhibir el proceso de nitritooxidación y propiciar la nitrificación parcial.

Según Neculita *et al.* 2007 existen diferentes compuestos de azufre (sulfuro, tiosulfato) que pueden inhibir la actividad de una amplia gama de organismos dentro de los que se encuentran los organismos nitrificantes. El efecto inhibidor del sulfuro es atribuido a diversos fenómenos como la permeación de H_2S en las células y la destrucción de las proteínas haciendo que la célula se inactive temporalmente. Las concentraciones en las que el

sulfuro actúa como inhibidor varía entre 0,5 y 10 mg S·l⁻¹ (Visser *et al.*, 1993). Nagpal *et al.*, 2000 menciona que el efecto tóxico del sulfuro aumenta cuando reacciona con metales divalentes.

Los resultados obtenidos en este estudio con los tres tipos de fangos utilizados muestran resultados similares en presencia de sulfuro. Se observa una reducción importante de la velocidad de consumo de amonio después de adicionar el sulfuro en concentraciones menores a 10 mg S·l⁻¹. En concordancia con otros autores (Juliette *et al.*, 1993; Neculita *et al.*, 2007; Bejarano, 2010), bajas concentraciones de sulfuro (<10 mg S·l⁻¹) puede inhibir la nitrificación.

En los ensayos realizados en esta tesis se observó que una vez se elimina el sulfuro del sistema, el fango presenta un tiempo de retardo y posteriormente recupera la actividad nitrificante a una velocidad menor que la obtenida antes de la inhibición. Este hecho es posible si parte de la biomasa activa disminuye a lo largo del experimento o a que una parte permanece inhibida por el efecto del sulfuro. Otro aspecto importante observado en los ensayos, es que la presencia de tiosulfato no afectó negativamente a los organismos nitrificantes. Tal y como se menciona en el estudio desarrollado por Bejarano (2010), el sulfuro puede inhibir la nitrificación a nivel enzimático siendo esta inhibición reversible, descartando otras variables tales como el pH y el oxígeno disuelto. Una posible explicación es la disminución de la disponibilidad de metales divalentes del medio. Sin embargo, es posible que el sulfuro afecte también el transporte de sustrato a través de la membrana celular (Martinelle *et al.*, 1996).

La aclimatación de los organismos y los cambios en la estructura de la comunidad microbiana representan un papel importante en la adaptación de los organismos nitrificantes al sulfuro. Es por ello que, frente a la presencia de sulfuro, la respuesta de los organismos nitrificantes presentes en la planta piloto después de la inhibición es más lenta comparada con el fango

de la EDAR del Carraixet. Según Texier y Gómez, 2002 la inhibición de la nitrificación puede verse influenciada por la adaptación metabólica del fango nitrificante a la presencia de sulfuro. Cabría esperar que el fango de la planta piloto estuviera más aclimatado al sulfuro, pero es posible que la abundancia de los organismos nitrificantes en los otros fangos fuera mayor. De hecho, la velocidad obtenida para el fango de la EDAR del Carraixet y Quart-Benàger antes de la inhibición es mayor que en la planta piloto.

4.2.5.2 Desnitrificación con ácido acético y sulfuro

A continuación se presentarán los resultados obtenidos en los ensayos de desnitrificación empleando ácido acético o sulfuro como dador de electrones.

Para determinar la influencia del sulfuro en la desnitrificación, se realizaron 2 grupos de experimentos. En el primer grupo de experimentos (A, B y C) se utilizó ácido acético (Hac) como dador de electrones con una concentración aproximada de $100 \text{ mg DQO l}^{-1}$ y en el segundo grupo de experimentos (A', B' y C') se utilizó sulfuro como dador de electrones con una concentración promedio de 15 mg S l^{-1} (siendo esta concentración aproximadamente el doble de la detectada al inicio de la zona anóxica). El procedimiento utilizado en los ensayos de desnitrificación se presenta en el apartado 3.3.3.

El fango utilizado en estos ensayos fue tomado de la planta piloto, en la etapa II hacia el día 350, cuando la nitrificación estaba bien establecida. Con estos ensayos se pretendía determinar si el sulfuro podía ser utilizado como dador de electrones en la desnitrificación y su grado de utilización respecto a otros dadores de electrones.

En todos los ensayos se calculó la velocidad de consumo de nitrógeno con el fin de comparar los resultados obtenidos utilizando ácido acético o sulfuro. Las condiciones iniciales de cada experimento se presentan en la Tabla 59.

Tabla 59. Ensayos de desnitrificación empleando ácido acético y sulfuro como dador de electrones.

	Dador de electrones	Compuesto	Concentraciones iniciales				p H
			Nitrato (mgN-NO ₃ ·l ⁻¹)	Nitrito (mgN-NO ₂ ·l ⁻¹)	Hac (mg DQO·l ⁻¹)	Sulfuro (mg S·l ⁻¹)	
Exp. A	Ácido acético	Nitrato	28,1	0,0	111,5	0,0	7,43
Exp. B	Ácido acético	Nitrito	0,8	18,5	106,9	0,0	7,51
Exp. C	Ácido acético	Nitrato/Nitrito	18,0	16,9	106,3	0,0	7,69
Exp. A'	Sulfuro	Nitrato	25,6	0,1	0,0	14,9	7,42
Exp. B'	Sulfuro	Nitrito	6,6	25,3	0,0	14,1	7,49
Exp. C'	Sulfuro	Nitrato/Nitrito	24,8	22,9	0,0	13,8	7,56

Desnitrificación con ácido acético (Hac)

Los resultados obtenidos en los ensayos de desnitrificación empleando ácido acético como dador de electrones se presentan en este apartado. En total se llevaron a cabo tres ensayos (A, B y C), obteniéndose en cada uno la evolución de la concentración de nitrato, nitrito y ácido acético (HAc). Con estos experimentos se determinó la velocidad de desnitrificación empleando ácido acético como dador de electrones.

En estos ensayos se ha utilizado un patrón de nitrato de sodio (NaNO₃) y nitrito de sodio (NaNO₂) para mantener la concentración de nitrato y nitrito al inicio del ensayo, en los valores que se muestran en la Tabla 59. Estas concentraciones corresponden con valores máximos de nitrato medidos al final de la zona aerobia en los diferentes periodos.

De manera simultánea a la adición de nitrato o nitrito, en cada ensayo se adicionó una concentración de ácido acético en torno a 110,0 mg DQO l⁻¹ necesarios para que las bacterias presentes desnitrificarán todo el nitrato o nitrito presente.

En la Figura 82 se muestra la evolución de la concentración de nitrito, nitrato y ácido acético en este primer grupo de ensayos.

El *ensayo A* fue realizado empleando nitrato como aceptor de electrones y ácido acético como dador de electrones. Los resultados se muestran en la Figura 82 A. El pH del fango al inicio del ensayo era de 7,43. Las concentraciones iniciales del ensayo se muestran en la Tabla 59. Como se puede observar en la Figura 82A, conforme el nitrato disminuye, la concentración de nitrito aumenta y la concentración de ácido acético decrece debido al consumo de materia orgánica por parte de los organismos desnitrificantes. La velocidad de consumo de nitrato por parte de los organismos desnitrificantes presentes fue de $8,9 \text{ mg N-NO}_3\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ que corresponde a $7,6 \text{ mg N-NO}_3\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ para una concentración de SSV en este experimento de $1168 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Durante el ensayo se observó un incremento significativo del pH que pasó de 7,43 hasta 8,0, característico del proceso de desnitrificación. Este ensayo permite observar que el paso hacia nitrito constituye una vía importante del proceso de desnitrificación para la biomasa de la planta piloto. Se puede observar que hasta que prácticamente todo el nitrato no es consumido el nitrito no es consumido hasta N_2 gas.

El *ensayo B* fue dividido en dos partes con el objetivo de evaluar el proceso de desnitrificación empleando únicamente nitrito. En la primera parte, y teniendo en cuenta que el fango ya contenía nitrato, se estudió la desnitrificación empleando nitrato y ácido acético. La concentración inicial de nitrato fue de $21,9 \text{ mg N-NO}_3\cdot\text{l}^{-1}$ y la concentración de ácido acético al inicio del ensayo fue de $98,4 \text{ mg DQO}\cdot\text{l}^{-1}$. El pH inicial del sistema fue de 7,5. Los resultados del ensayo B se muestran en la Figura 82B. En esta primera parte del ensayo se observó que a medida que el ácido acético es consumido el nitrato fue reducido principalmente en un 60% a nitrógeno gas y el restante como nitrito. La velocidad de consumo de nitrato en esta parte fue de $6,8 \text{ mg N-NO}_3\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ($5,8 \text{ mg N-NO}_3\cdot\text{g SSV}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) similar a la obtenida en el ensayo A.

En la segunda parte del ensayo B y una vez todo el nitrato fue transformado a nitrito y nitrógeno gas, se evaluó el proceso de desnitrificación partiendo solo de nitrito, fijando como condiciones iniciales las reflejadas en la Tabla 59. Para alcanzar dichas condiciones se adicionó nitrito y ácido acético. Durante el ensayo se observó, que el nitrito fue reducido a óxidos de nitrógeno y nitrógeno gas. La velocidad inicial de consumo de nitrito fue de $1,5 \text{ mgN-NO}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($1,2 \text{ mg N-NO}_3 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) siendo menor que la obtenida para el nitrato. Otro aspecto interesante observado en el ensayo B es que en la reducción del nitrito se observa una doble pendiente que podría estar relacionada con algún tipo de inhibición, como por ejemplo la inhibición por el HNO_2 (Abeling and Seyfried 1992).

En el *ensayo C* se evaluó el proceso de desnitrificación partiendo de nitrato y nitrito simultáneamente y ácido acético como dador de electrones. El objetivo era identificar cuál era la ruta preferencial de los organismos desnitrificantes, si el nitrato o el nitrito. La concentración inicial de nitrato, nitrito y ácido acético se presentan en la Tabla 59. La concentración de ácido acético fue de $103,8 \text{ mg DQO} \cdot \text{l}^{-1}$. El pH inicial del sistema fue de 7,5. Los resultados obtenidos en el experimento C se presentan en la Figura 82C. En este ensayo la velocidad de consumo de nitrato fue de $2,9 \text{ mgN} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($2,4 \text{ mg N-NO}_3 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Se observó que cuando están presentes los dos aceptores de electrones simultáneamente la velocidad de los organismos desnitrificantes es menor y que estos reducen inicialmente el nitrato presente, es decir la ruta más favorable para los organismos desnitrificantes presentes en la planta piloto es a partir de nitrato.

Como se puede observar en la Figura 82, cuando están presentes los dos aceptores de electrones el nitrato es reducido a nitrógeno gas, y otra parte forma nitrito. Una vez se agota la fuente de carbono el proceso de desnitrificación se ralentiza, debido a la menor disponibilidad de materia orgánica para los organismos desnitrificantes.

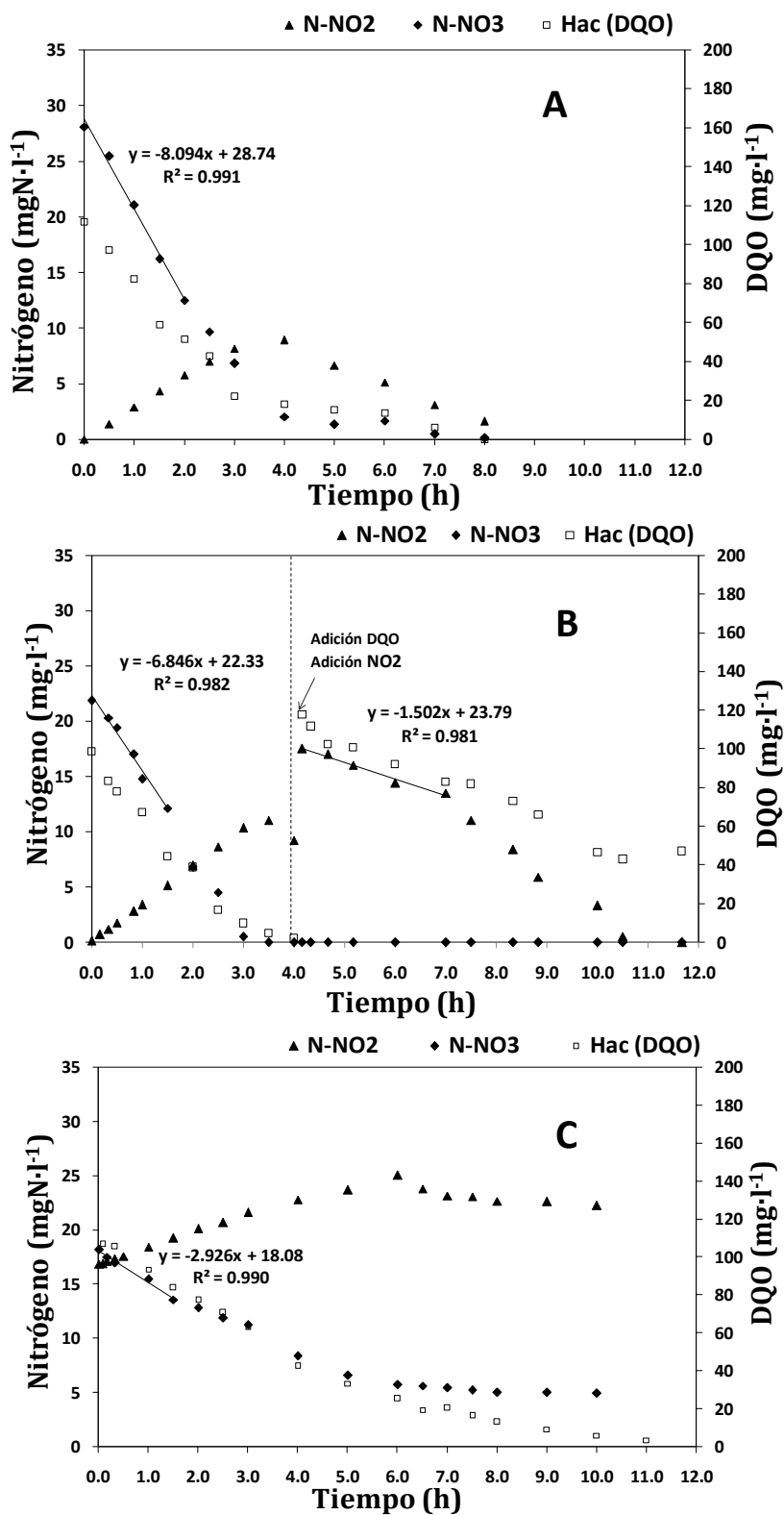


Figura 82. Ensayos de desnitrificación con ácido acético como dador de electrones. Aceptores de electrones: (A) nitrato, (B) nitrato (I parte) y nitrito (II parte), (C) nitrato/nitrito simultáneamente.

Durante el desarrollo de los ensayos se recogió una muestra de fango para su posterior análisis microbiológico mediante la técnica FISH. En este caso se hibridó la muestra con las sondas DEN67 y AT1458 que corresponden con sondas específicas para los organismos desnitrificantes. Los resultados mostraron que la especie con mayor abundancia ($6,5\pm 1,0\%$) presente en el sistema correspondía con la hibridada con la sonda AT1458 para organismos *Azoarcus*, *Thauera* y *Castellaniella cluster*.

En general los resultados obtenidos en los ensayos A, B y C muestran la capacidad de los organismos desnitrificantes presentes en la planta piloto para reducir el nitrato y utilizar ácido acético como fuente de carbono. También se observó que, en la desnitrificación, el nitrato es inicialmente reducido a nitrito y simultáneamente a óxidos de nitrógeno y nitrógeno gas. En estos ensayos también se determinó que el aceptor preferido por la biomasa desnitrificante es el nitrato antes que el nitrito.

Desnitrificación con sulfuro

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de desnitrificación empleando únicamente sulfuro como dador de electrones.

Para evaluar la influencia del sulfuro en el proceso de desnitrificación, al igual que con el ácido acético, se llevaron a cabo tres ensayos de desnitrificación (A', B' y C') empleando el procedimiento descrito en el apartado 3.3.3. La relación molar entre el nitrógeno y el sulfuro (N/S) para el ensayo A' fue de 3,9, para el ensayo B' de 4,0 respecto al nitrito y en el ensayo C' de 4,1 respecto al nitrato y de 3,7 respecto al nitrito. En la Figura 83 se puede observar la evolución de los compuestos de nitrógeno (nitrato y nitrito) y sulfuro en los tres ensayos.

El *ensayo A'* fue realizado empleando nitrato como aceptor de electrones y sulfuro como dador de electrones con una relación molar N/S de 3,9. Los

resultados se muestran en la Figura 83 A'. El pH del fango al inicio del ensayo era de 7,42. Las condiciones iniciales de los ensayos con sulfuro se muestran en la Tabla 59. En la Figura 83 A' se puede observar cómo una vez se adiciona el sulfuro el nitrato presente es reducido inicialmente a nitrito y simultáneamente a óxidos de nitrógeno y nitrógeno gas. En el caso del sulfuro se observó que desaparece rápidamente hasta sulfato tal y como se muestra en la figura. En la oxidación del sulfuro se observó la formación de compuestos intermedios como el tiosulfato el cual también desaparece rápidamente. La concentración de sulfato al inicio del ensayo fue de $120,7 \text{ mgS} \cdot \text{l}^{-1}$ y al final del ensayo (Tiempo=7,7 horas) fue de $136,3 \text{ mgS} \cdot \text{l}^{-1}$, indicando que todo el sulfuro presente al inicio del ensayo había sido oxidado hasta sulfato. La velocidad de consumo de nitrógeno fue de $15,1 \text{ mg N-NO}_3 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($12,9 \text{ mg N-NO}_3 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Al igual que en los ensayos con ácido acético a medida que el nitrato es reducido se forma óxidos de nitrógeno y nitrito principalmente. Otro aspecto importante es que a pesar de que el sulfuro desaparece rápidamente el nitrato continúa disminuyendo indicando que se está desnitrificando. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que en existe diversos compuestos intermedios en la oxidación del sulfuro que pueden reaccionar con el nitrato provocando la desnitrificación del mismo.

Con respecto a la formación simultánea de nitrito en el ensayo puede ser debido a la elevada relación molar ($\text{N/S}=3,9$) en el ensayo A'. Según Beristain *et al.* 2006 para relaciones mayores al valor estequiométrico (1,6) se observa una completa oxidación del sulfuro hasta sulfato y una reducción parcial del nitrato formándose nitrito en el sistema.

En el **ensayo B'** se evaluó el proceso de desnitrificación partiendo de nitrito como único aceptor de electrones y sulfuro como dador de electrones. La relación molar N/S en este ensayo fue de 1,0, es decir menor al valor estequiométrico. Las condiciones iniciales del ensayo se muestran en la

Tabla 59. El pH al inicio del ensayo fue de 7,49. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 83B. En esta figura se puede observar que el nitrito se consume con una velocidad de consumo de nitrito de $7,1 \text{ mg N-NO}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($6,0 \text{ mg N-NO}_3 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). El comportamiento del sulfuro es similar a los ensayos anteriores, una vez añadido éste se oxida rápidamente, formándose tiosulfato que posteriormente es oxidado hasta sulfato.

En el *ensayo C'* se utilizó nitrato y nitrito como aceptor de electrones de forma simultánea y sulfuro como dador de electrones. Las condiciones del ensayo se muestran en la Tabla 59. El pH al inicio del ensayo fue de 7,5. Los resultados obtenidos en el experimento C' se muestran en la Figura 83C'. Al igual que en el experimento anterior, una vez se adiciona el sulfuro este desaparece rápidamente y el nitrato es reducido por los organismos desnitrificantes a nitrito principalmente, óxidos de nitrógeno y nitrógeno gas. La velocidad de consumo de nitrato en este ensayo fue de $14,9 \text{ mg N-NO}_3 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($12,7 \text{ mg N-NO}_3 \cdot \text{g SSV}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Se observa con estos ensayos que el compuesto preferido por los organismos desnitrificantes cuando están presentes ambos compuestos (nitrato o nitrito), es el nitrato.

Con respecto al sulfuro se observó la formación de tiosulfato que desapareció rápidamente. Al final del ensayo el aumento en la concentración de sulfato coincidió con la concentración de sulfuro al inicio del ensayo, indicando que en estos ensayos existe una oxidación completa de sulfuro hasta sulfato.

De estos ensayos se observó que el sulfuro actúa como dador de electrones en el proceso de desnitrificación. El compuesto preferido de los organismos desnitrificantes es el nitrato en cualquier caso, y a medida que el nitrato es reducido se forman simultáneamente óxidos de nitrógeno, nitrito y nitrógeno gas principalmente. También se observó que el sulfuro presente al inicio del ensayo es oxidado hasta sulfato cerrándose el balance en todos los ensayos.

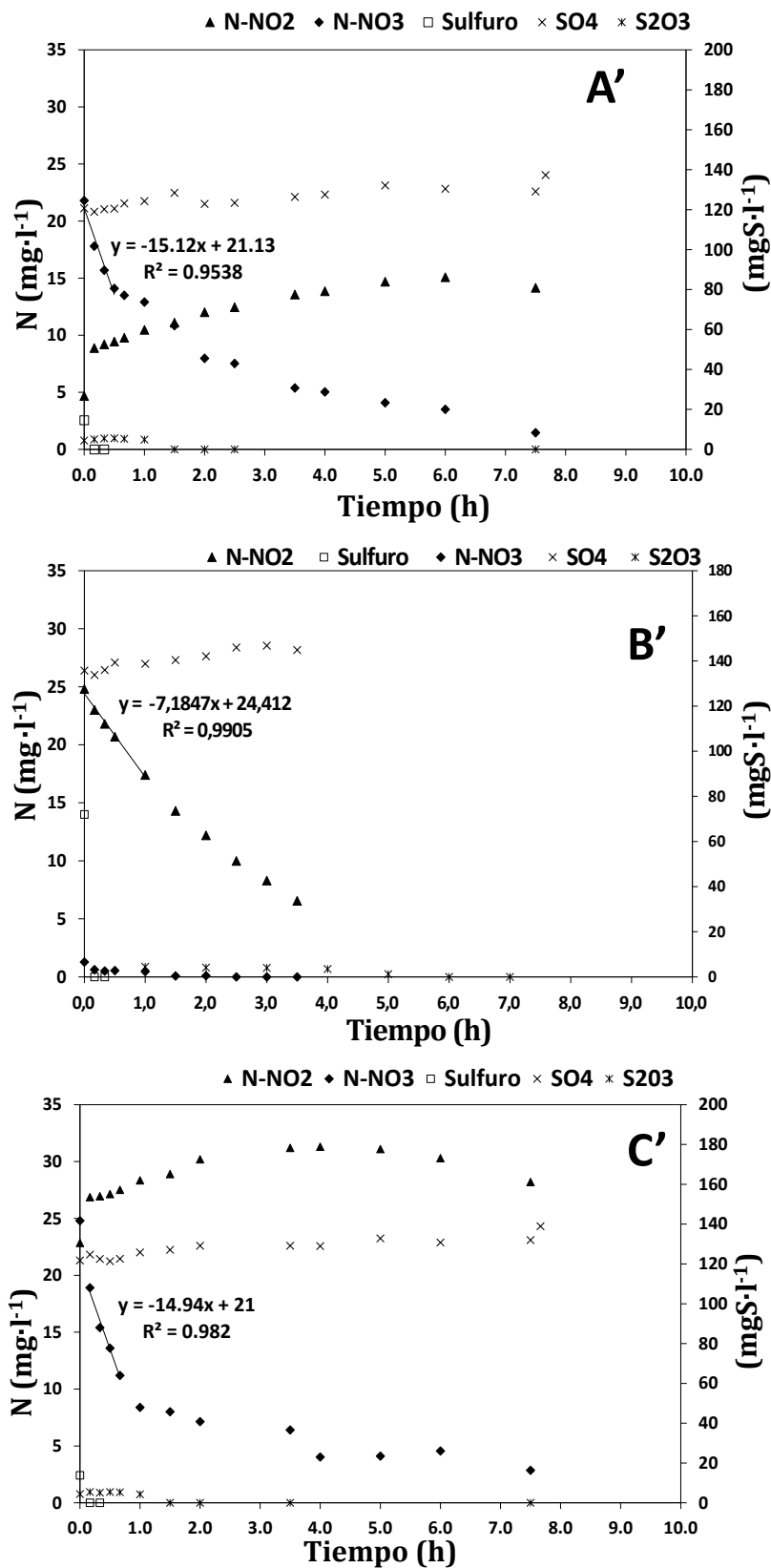


Figura 83. Ensayos de desnitrificación con sulfuro. A partir de nitrato (ensayo A'), nitrito (ensayo B'), nitrato y nitrito (ensayo C').

La Tabla 60 muestra un resumen de las velocidades de consumo de nitrógeno obtenidas en cada uno de los ensayos realizados. Por último, si se comparan las velocidades de consumo de nitrógeno obtenidas en todos los ensayos, se observa una mayor velocidad de desnitrificación cuando el dador de electrones es el sulfuro. En este caso parece que existe una afinidad importante por el sulfuro antes que por el ácido acético.

Según Beristain *et al.*, 2006 en la desnitrificación con sulfuro cuando la concentración de sulfuro es limitada, es decir cuando la relación N/S es mayor a 1,6, el sulfuro es oxidado por completo hasta sulfato y se forma nitrito como compuestos intermedio en la reducción de nitrato. Según este autor, la oxidación parcial del sulfuro se evidencia con el color blanco turbio del fango en el sistema. En nuestro caso al inicio de los ensayos se observó un color blanquecino que desapareció a medida que transcurría el ensayo.

Tabla 60. Velocidad de consumo de nitrógeno en los ensayos de desnitrificación.

	Dador de electrones	Aceptor de e⁻	Velocidad (mgN·l⁻¹·h⁻¹)	Velocidad (mgN·gSSV⁻¹·h⁻¹)
Exp. A	Ácido acético	Nitrato	8,9	7,6
Exp. B	Ácido acético	Nitrito	1,5	1,2
Exp. C	Ácido acético	Nitrato /Nitrito	2,9	2,4
Exp. A'	Sulfuro	Nitrato	15,1	12,9
Exp. B'	Sulfuro	Nitrito	7,1	6,0
Exp. C'	Sulfuro	Nitrato/Nitrito	14,9	12,7

En general, es posible aumentar los rendimientos en la desnitrificación empleando otros dadores de electrones como el sulfuro. Tal y como se ha mencionado a lo largo del estudio una alternativa interesante es la desnitrificación simultánea de materia orgánica y sulfuro (AGV y sulfuro), permitiendo así la reducción simultanea de nitrógeno, sulfuro y materia orgánica. Se puede recomendar la desnitrificación en presencia de materia orgánica y sulfuro, ya que se ha observado la capacidad de diversos organismos desnitrificantes de acoplar la oxidación del sulfuro y la reducción del nitrato o nitrito, obteniéndose eficiencias importantes.

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado a escala laboratorio y escala piloto el tratamiento del efluente de un reactor anaerobio de membranas sumergidas (SAnMBR), para eliminar el nitrógeno presente, el fósforo, el sulfuro y el metano disuelto. A continuación se presentan las conclusiones más relevantes de este trabajo de tesis doctoral:

Reactor SBR

1. Los conocimientos adquiridos acerca de la operación y seguimiento del reactor SBR para el estudio de la desnitrificación utilizando AGV, sulfuro y metano disuelto como dadores de electrones permitieron establecer parámetros operacionales adecuados para el correcto funcionamiento del proceso. De acuerdo a los resultados obtenidos, se logró obtener un porcentaje de desnitrificación superior al 90% trabajando a un TRH de 19h y un TRC entre 20 y 30 días.
2. En general, la concentración de AGV en el proceso de desnitrificación presenta gran influencia sobre el rendimiento del proceso. Debido a este hecho, en los periodos donde existió mayor disponibilidad de AGV los porcentajes de desnitrificación fueron mayores. También, se determinó que en casi todos los periodos los AGV no eran suficientes para desnitrificar todos los nitratos presentes al inicio del ciclo, siendo necesario el aporte extra de DQO por parte de otros dadores de electrones, tales como el sulfuro o el metano disuelto, que aumentan el potencial de desnitrificación.
3. Es posible llevar a cabo el proceso de desnitrificación empleando de forma simultánea los AGV, el sulfuro y el metano disuelto presentes en el afluente. En este estudio se calculó el potencial de desnitrificación el cual permitió estimar la cantidad de nitratos que

podrían eliminarse con cada dador de electrones presente. Con los sulfuros aportados por el agua residual afluyente podrían desnitrificarse todos los nitratos presentes, y con el metano disuelto así como con los AGV una parte de ellos. En este sistema el crecimiento de los organismos metanotróficos tipo I y II denota que parte del metano disuelto está siendo utilizado como sustrato, contribuyendo en la desnitrificación.

4. Durante la operación del reactor SBR se observó que el sulfuro se oxida casi en su totalidad hasta sulfato. La oxidación parcial del sulfuro puede ocurrir por dos razones: la presencia de bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el sistema y a las bajas relaciones molares (N/S).
5. Los ensayos en discontinuo realizados durante la operación del SBR indicaron que una parte de los sulfuros presentes son oxidados a sulfatos, una parte se pierde por volatilización y otra parte forma compuestos intermedios de azufre. De estos ensayos se deduce que la reducción del nitrato en presencia de sulfuro no tiene lugar por vía química, siendo necesaria la acción de microorganismos para que tenga lugar esta reducción.

Planta piloto de fangos activados

El estudio en planta piloto permitió estudiar la influencia de la temperatura, AGV, sulfuro y metano disuelto, sobre los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo. A continuación se presentan las conclusiones más relevantes:

6. El análisis de las etapas estudiadas permitió determinar que para un TRH de 13 horas y bajo una presencia continuada de sulfuro en el afluyente, el proceso de nitrificación se inhibe. La alcalinidad, pH y OD

en todas las etapas se encontraban dentro de los valores recomendados para no limitar el desarrollo de las bacterias nitrificantes. La temperatura varió en función de las condiciones ambientales llegando a valores desfavorables para el crecimiento de los organismos nitrificantes, pero no como para inhibir por completo el proceso. La inhibición de la nitrificación no fue debida al pH del proceso, ni una limitación de oxígeno, ni a las variaciones de la temperatura si no a la presencia de sulfuro presente en el afluente.

7. En el sistema estudiado la modificación del TRH permitió disminuir la inhibición de los organismos nitrificantes. Valores de TRH superiores a 16 horas minimizan considerablemente la inhibición provocada por el sulfuro.
8. Cuando el proceso de nitrificación se encuentra inhibido se observa la acumulación de nitrito, reflejando que el paso de nitrito a nitrato estaba inhibido, por lo que los organismos nitritooxidantes (NOB) son más sensibles a la presencia del inhibidor (sulfuro).
9. Mediante los ensayos de nitrificación llevados a cabo en laboratorio se determinó que la biomasa nitrificante se inhibe debido a la presencia continuada de sulfuro en concentraciones superiores a $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. También, se observó que una vez se elimina el sulfuro los organismos recuperan la actividad nitrificante. La presencia de tiosulfato no provocó la inhibición de la actividad nitrificante. La presencia de sulfuro pudo ser uno de los factores responsables de la aparición de nitritos debido principalmente a que los organismos nitritooxidantes son más sensibles a la presencia de este compuesto.
10. Los resultados obtenidos del análisis del proceso de desnitrificación, confirmaron que los AGV presentes no son suficientes para desnitrificar los nitratos eliminados en la mayoría de los periodos

estudiados, pero representan aproximadamente entre un 40-70% de la DQO requerida. Para poder desnitrificar los nitratos eliminados es necesario el aporte extra de dadores de electrones adicionales tales como el sulfuro o el metano disuelto.

11. La concentración de sulfuro en este estudio sería suficiente para desnitrificar todos los nitratos formados, pero la capacidad real de desnitrificación de este compuesto depende de su disponibilidad en la zona anóxica, ya que parte del sulfuro puede oxidarse hasta sulfato rápidamente en la zona anaerobia e incluso en la anóxica en presencia de bajas concentraciones de oxígeno disuelto.
12. El metano disuelto en este estudio también actúa como un dador de electrones y representa aproximadamente entre un 20-40% de la DQO requerida. La utilización del metano disuelto en la desnitrificación supone un aporte extra de DQO y la minimización de un gas de efecto invernadero.
13. Los resultados obtenidos en las etapas estudiadas muestran que, en el proceso estudiado, los organismos PAO presentan una elevada tolerancia a los cambios operacionales. Es decir, a pesar de los cambios observados en las etapas en el TRH, TRC o temperatura, las PAO no necesitaron grandes periodos de aclimatación para eliminar el fósforo presente.
14. En los ensayos de desnitrificación realizados en laboratorio se observó que el nitrato es usado preferentemente como aceptor de electrones antes que el nitrito. Así mismo, la velocidad de desnitrificación es mayor en presencia de sulfuro que en presencia de ácido acético, indicando una mayor afinidad por el sulfuro por parte de los microorganismos desnitrificantes.

15. La aplicación de la técnica *in situ* FISH en este estudio permitió determinar la presencia y abundancia de los organismos presentes en el sistema. Para el proceso de nitrificación los organismos amonioxidantes detectados fueron los hibridados con la sonda NSO1225 (*Betaproteobacterial ammonia-oxidizing*) y para el caso de los nitritooxidantes los hibridados con la sonda NTspa 712 (*Most members phylum Nitrospirae*). Los organismos desnitrificantes que predominaron en el sistema corresponde con la especie *Azoarcus-Thaurea-Castellaniella* hibridada con la sonda AT1458. Entre las poblaciones existentes, también se observó la presencia de organismos metanotróficos tipo I y II hibridados con las sondas Mg84 y Ma464 capaces de crecer utilizando metano disuelto como sustrato. También se observó la presencia de organismos acumuladores de polifosfatos (PAO) hibridados con la sonda PAOmix que corresponde con la especie *accumulibacter phosphatis*.
16. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tratamiento del efluente de un reactor SAnMBR mediante un sistema de fangos activados permite una eficiencia en la eliminación de N y P en torno al 60% y 45% respectivamente, cuando el sistema se opera a elevados TRH con eliminaciones de sulfuro y metano disuelto superiores al 98%. Por tanto, el tratamiento del efluente de un reactor SAnMBR mediante un sistema convencional de fangos activados, sirve para eliminar la DQO biodegradable residual del proceso anaerobio, eliminar el sulfuro y el metano disuelto presentes y reducir las concentraciones de nitrógeno y fósforo.
17. El proceso de fangos activados podría ser una tecnología existente adecuada como postratamiento de los efluentes de reactores anaerobios, asegurando un mejor aprovechamiento del potencial de desnitrificación del sulfuro. El uso de metano disuelto y sulfuro como dador de electrones en la reacción de desnitrificación podría ser una

alternativa interesante para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y de nutrientes, produciendo un efluente que pueda ser reutilizado según los usos establecidos en el Real Decreto 1620/2007.

18. El trabajo de tesis doctoral realizado supone un avance en el conocimiento del tratamiento de efluentes anaerobios que permitan eliminar de manera conjunta los nutrientes, sulfuro y metano disuelto. Esta investigación se ha centrado en estudiar los procesos de nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo. Los desarrollos futuros podrían ir orientados a la optimización del proceso para aprovechar eficientemente todos los dadores presentes (AGV, sulfuro y metano disuelto) y obtener mayores rendimientos en la desnitrificación para así cumplir los requisitos fijados para la reutilización o el vertido de este efluente. Así mismo, se podría realizar un estudio de las emisiones de óxido nitroso, óxido nítrico y ácido nitroso procedentes del proceso de desnitrificación, ya que estos gases contribuyen al efecto invernadero.

BIBLIOGRAFÍA

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abeling, U., & Seyfried, C. F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater-nitrogen removal via nitrite. *Water Science & Technology*, 26(5-6), 1007-1015.
- Acevedo, B., Oehmen, A., Carvalho, G., Seco, A., Borrás, L., & Barat, R. (2012). Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage. *Water research*, 46(6), 1889-1900.
- Aguado, D., Ribes, J., Montoya, T., Ferrer, J., & Seco, A. (2009). A methodology for sequencing batch reactor identification with artificial neural networks: a case study. *Computers & Chemical Engineering*, 33(2), 465-472.
- Amaral, J. A., & Knowles, R. (1995). Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiology Letters*, 126(3), 215-220.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1919-1925.
- Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., & Svoronos, S. A. (1990). Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Research*, 24(1), 97-101.

- Apha, A. Wef. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st ed. American Public Health Association. Washington, DC. Part, 8000, 94-100.
- Bejarano Ortiz, D. I., Thalasso, F., Cuervo López, F. D. M., & Texier, A. C. (2013). Inhibitory effect of sulfide on the nitrifying respiratory process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(7), 1344-1349.
- Bejarano Ortiz, D. I. (2010). Efecto inhibitorio del sulfuro sobre un proceso respiratorio nitrificante. Tesis de maestria. Universidad autónoma metropolitana. México D.F.
- Beristain Cardoso, R., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E. R., Gomez, J., & Field, J. A. (2006). Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 95(6), 1148-1157.
- Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Pfannkuche, O. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407(6804), 623-626.
- Borrás, L. (2008). Microbiological techniques applied to the identification and quantification of microorganisms in EBPR systems, PhD thesis. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.
- Bowman, J. P., Skerratt, J. H., Nichols, P. D. and Sly, L. I. (1991). Phospholipid fatty acid and lipopolysaccharide fatty acid signature lipids in methane-utilizing organismo. *FEMS Microbiol Ecol* 85, 15-22.

- Bowman, J. P., Sly, L. I., Nichols, P. D., & Hayward, A. C. (1993). Revised taxonomy of the methanotrophs: description of *Methylobacter* gen. nov., emendation of *Methylococcus*, validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* species, and a proposal that the family Methylococcaceae includes group I methanotrophs. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(4), 735-753.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., Stackebrandt, E. (1995). The phylogenetic position of the family Methylococcaceae. *International journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 182-185.
- Brett, S. (1997). Phosphorus removal and recovery technologies. Selper.
- Buntner, D., Sánchez, A., Garrido, J. M. (2013). Feasibility of combined UASB and MBR system in dairy wastewater treatment at ambient temperatures. *Chemical Engineering Journal*, 230, 475-481.
- Brdjanovic, D., Loosdrecht, M. C. V., Hooijmans, C. M., Alaerts, G. J., & Heijnen, J. J. (1997). Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal. *Journal of environmental engineering*, 123(2), 144-153.
- Cervantes, F. J. (Ed.). (2009). Environmental technologies to treat nitrogen pollution. *IWA Publishing*.
- Chen, C., Ren, N., Wang, A., Yu, Z., & Lee, D. J. (2008). Microbial community of granules in expanded granular sludge bed reactor for simultaneous biological removal of sulfate, nitrate and lactate. *Applied microbiology and biotechnology*, 79 (6), 1071-1077.

- Chernicharo, C. D. (2006). Post-treatment options for the anaerobic treatment of domestic wastewater. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5(1), 73-92.
- Chernicharo, C., Nascimento, M. (2001). Feasibility of a pilot-scale UASB/trickling filter system for domestic sewage treatment. *Water Science and Technology*, 44(4), 221-228.
- Coletti, F.J., Povinelli, J., Daniel, L. A. (1997). Pós-tratamento por lodos ativados de efluentes provenientes de processos anaeróbios de tratamento de esgoto sanitário; Determinação de constantes cinéticas. In: Anais: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19, Foz do Iguaçu, ABES.
- Colleran, S., Pender, S. (2002). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of sulphate-containing wastewaters. *Water Science & Technology*, 45(10), 231-235.
- Costa, C., Dijkema, C., Friedrich, M., Garcia-Encina, P., Fernandez-Polanco, F., & Stams, A. J. M. (2000). Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 53 (6), 754-762.
- Claros, J. (2012). Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amonioacal. Tesis doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia, España.

- Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P. L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., & Blackall, L. L. (2000). Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (3), 1175-1182.
- Daelman, M.R.J., van Voorthuizen, E.M., van Dongen, L.G.J.M., Volcke, E.I.P. & van Loosdrecht, M.C.M. (2012). Methane emission during municipal wastewater treatment. *Water Research*, 46 (11), 3657.
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K. H., Wagner, M. (2001). In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11), 5273-5284.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (1999). The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all Bacteria: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. *Systematic and applied microbiology*, 22 (3), 434-444.
- De Zwart, J. M., & Kuenen, J. G. (1992). C1-cycle of sulfur compounds. *Biodegradation*, 3 (1), 37-59.
- Díaz, I., Pérez, S. I., Ferrero, E. M., & Fdz-Polanco, M. (2011). Effect of oxygen dosing point and mixing on the microaerobic removal of hydrogen sulphide in sludge digesters. *Bioresource technology*, 102(4), 3768-3775.
- Durán, F., Carretero, L., Giménez, J.B., Robles, A., Ruano, M.V., Gatti, M.N., Ribes, J., Ferrer, J., & Seco, A. (2010). A Novel Pilot Plant for the Study of Submerged Anaerobic Membrane Bioreactor

(SAMBR) Applied to Domestic Wastewater Treatment. Proceedings of the 12th World Congress on Anaerobic Digestion. *International Water Association (IWA)*, Guadalajara (Mexico).

Ekama, G. A., & Marais, G. V. R. (1979). Dynamic behavior of the activated sludge process. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 534-556.

Elferink, O., Visser, A., Pol, H., Look, W., & Stams, A. J. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, 15 (2-3), 119-136.

Eller, G., Stubner, S., & Frenzel, P. (2001). Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS microbiology letters*, 198(2), 91-97.

Environmental Protection Agency, EPA (1992). Plastic Pellets in the Aquatic Environment: Sources and Recommendations. Washington, DC, EPA 842-B-92-010

Ettwig, K. F., Shima, S., De Pas Schoonen, V., Katinka, T., Kahnt, J., Medema, M. H., & Strous, M. (2008). Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environmental microbiology*, 10(11), 3164-3173.

Ettwig, K. F., Van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K. T., Jetten, M. S., & Strous, M. (2009). Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Applied and environmental microbiology*, 75 (11), 3656-3662.

- Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M., & Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464 (7288), 543-548.
- Erguder, T. H., Boon, N., Vlaeminck, S. E., & Verstraete, W. (2008). Partial nitrification achieved by pulse sulfide doses in a sequential batch reactor. *Environmental science & technology*, 42 (23), 8715-8720.
- Fawehinmi, F., Jefferson, B., Chan, T., & Rogalla, F. (2007). Submerged Anaerobic Membrane Bioreactors (SAMBR): Ready for the Big Ball. *Proceedings of the Water Environment Federation*, (11), 6393-6401.
- Fernández, N., Sierra-Alvarez, R., Field, J. A., Amils, R., & Sanz, J. L. (2008). Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, 70 (3), 462-474.
- Ferrer Polo J., y Seco Torrecillas A. (2007) Tratamientos Biológicos de Aguas Residuales. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Foresti, E., Zaiat, M., & Vallero, M. (2006). Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, new trends, perspectives, and challenges. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5(1), 3-19.
- Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S. I., & Fdz-Polanco, M. (2009). Present and perspectives of anaerobic treatment of domestic sewage. *Desalination and Water Treatment*, 4(1-3), 161-167.

- Furumai, H., Tagui, H., & Fujita, K. (1996). Effects of pH and alkalinity on sulfur-denitrification in a biological granular filter. *Water Science and Technology*, 34 (1), 355-362.
- Galchenko, V. F., Nesterov, A. I., Andreev, L. V., & Trotsenko, Y. A. (1980). New species of methanotrophic organismo *Methylo-cystis*. *Pushchino*: USSR Academy of Sciences.
- Gatti Marcela N (2009) Caracterización de las aguas residuales y calibración del modelo matemático BNRM1 para la simulación de los procesos de eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Departamento de ingeniería química.
- García-Usach F (2002) Influencia del tiempo de retención celular y la temperatura en los procesos de eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes de las aguas residuales. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia.
- Gebert, J. A. Gröngroft, M. Schloter, A. Gattinger (2004). Community structure in a methanotroph biofilter as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 240 (1), 61–68.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., & Schramm, A. (2001). Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (3), 1351-1362.
- Giménez J.B. (2014). Estudio del tratamiento anaerobio de aguas residuales urbanas en biorreactores de membranas. Tesis doctoral. Departamento de ingeniería química. Universidad de Valencia.

- Giménez J.B., Robles A., Carretero L., Durán F., Ruano M.V., Gatti M.N., Ribes J., Ferrer J., & Seco A. (2011). Experimental study of the anaerobic urban wastewater treatment in a submerged hollow-fibre membrane bioreactor at pilot scale. *Bioresource Technology* 102, 8799–8806.
- Giménez, J. B., Martí, N., Ferrer, J., & Seco, A. (2012). Methane recovery efficiency in a submerged anaerobic membrane bioreactor (SAnMBR) treating sulphate-rich urban wastewater: evaluation of methane losses with the effluent. *Bioresource technology*, 118, 67-72.
- Guidotti, T. L. (1994). Occupational exposure to hydrogen sulfide in the sour gas industry: some unresolved issues. *International archives of occupational and environmental health*, 66 (3), 153-160.
- Grady, C. P. L., Jr., Daigger, G. T., & Lim, H. C. (1999) Biological wastewater treatment. Second edition, revised and expanded. *Marcel Dekker, Inc.* New York. Basel.
- Grady Jr, C. L., Daigger, G. T., Love, N. G., Filipe, C. D., & Leslie Grady, C. P. (2011). Biological wastewater treatment (No. Ed. 3). *IWA Publishing*.
- Grady Jr, C. L., Daigger, G. T., Love, N. G., Filipe, C. D., & Leslie Grady, C. P. (2011). Biological wastewater treatment (No. Ed. 3). *IWA Publishing*.
- Greenberg, A. E., Klein, G., & Kaufman, W. J. (1955). Effect of phosphorus on the activated sludge process. *Sewage and industrial wastes*, 277-282.

- GTZ/TWB. (2001). Anaerobic treatment of slaughterhouse waste and wastewater. Frankfurt, Germany.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M. C., & Marais, G. V. R. (1995). The activated sludge model No. 2: biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*, 31 (2), 1-11.
- Hanson, R. S., & Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic organism. *Microbiol Rev* 60, 439-471.
- Harremoës, P., Haarbo, A., Winther-Nielsen, M., & Thirsing, C. (1998). Six years of pilot plant studies for design of treatment plants for nutrient removal. *Water science and technology*, 38 (1), 219-226.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., & Saunders, J. R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of general Microbiology*, 139(6), 1147-1153.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M. C., & Marais, G. V. R. (1995). Wastewater and biomass characterization for the activated sludge model no. 2: biological phosphorus removal. *Water Science and Technology*, 31(2), 13-23.
- Hesselmann, R. P., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J. R., & Zehnder, A. J. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology*, 22 (3), 454-465.

- Helmer, C., & Kunst, S. (1998). Low temperature effects on phosphorus release and uptake by microorganisms in EBPR plants. *Water Science and Technology*, 37 (4), 531-539.
- Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., Van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1998). The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water science and technology*, 37 (9), 135-142.
- Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC (2006). IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, vol. 4, Agriculture, Forestry and Other Land Use, edited by S. Eggleston et al., *Inst. for Global Environ. Strategies*, Hayama, Japan.
- Ilies, P., & Mavinic, D. S. (2001). The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate. *Water Research*, 35 (8), 2065.
- Islas-Lima, S., Thalasso, F., & Gomez-Hernandez, J. (2004). Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water research*, 38(1), 13-16.
- Janssen, A. J. H., Sleyster, R., Van der Kaa, C., Jochemsen, A., Bontsema, J., & Lettinga, G. (1995). Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 47 (3), 327-333.
- Jeison, D., & van Lier, J. B. (2007). Cake formation and consolidation: main factors governing the applicable flux in anaerobic submerged membrane bioreactors (AnSMBR) treating acidified wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 56 (1), 71-78.

- Juliette, L. Y., Hyman, M. R., & Arp, D. J. (1993). Inhibition of ammonia oxidation in *Nitrosomonas europaea* by sulfur compounds: thioethers are oxidized to sulfoxides by ammonia monooxygenase. *Applied and environmental microbiology*, 59 (11), 3718-3727.
- Kampschreur, M. J., Temmink, H., Kleerebezem, R., Jetten, M. S., & van Loosdrecht, M. (2009). Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research*, 43 (17), 4093-4103.
- Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M., & Wagner, M. (2000). Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Applied and environmental microbiology*, 66 (11), 5043-5052.
- Kato, M. T., Field, J. A., Kleerebezem, R., & Lettinga, G. (1994). Treatment of low strength soluble wastewaters in UASB reactors. *Journal of fermentation and bioengineering*, 77 (6), 679-686.
- Keller, J., & Hartley, K. (2003). Greenhouse gas production in wastewater treatment: process selection is the major factor. *Water Science & Technology*, 47 (12), 43-48.
- Kim, J., Lingaraju, B. P., Rheume, R., Lee, J. Y., & Siddiqui, K. F. (2010). Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science & Technology*, 15(4), 391-396.
- Khan, A. A., Gaur, R. Z., Tyagi, V. K., Khursheed, A., Lew, B., Mehrotra, I., & Kazmi, A. A. (2011). Sustainable options of post treatment of UASB effluent treating sewage: a review. *Resources, Conservation and Recycling*, 55 (12), 1232-1251.

- Knobel, A. N. & Lewis, A. E. (2002). A mathematical model of a high sulphate wastewater anaerobic treatment system. *Water Research*, 36, 257-265.
- Knowles, R. (2005). Denitrifiers associated with methanotrophs and their potential impact on the nitrogen cycle. *Ecological Engineering*, 24 (5), 441-446.
- Krishnakumar, B., & Manilal, V. B. (1999). Bacterial oxidation of sulphide under denitrifying conditions. *Biotechnology Letters*, 21(5), 437-440.
- Laanbroek, H. J., Geerligs, H. J., Sijtsma, L., & Veldkamp, H. (1984). Competition for sulfate and ethanol among *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, and *Desulfovibrio* species isolated from intertidal sediments. *Applied and environmental microbiology*, 47 (2), 329-334.
- Kuenen, J. G., & Tuovinen, O. H. (1981). The genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira*. In *The prokaryotes* (pp. 1023-1036). Springer Berlin Heidelberg.
- Lettinga, G., Roersma, R., & Grin, P. (1983). Anaerobic treatment of raw domestic sewage at ambient temperatures using a granular bed UASB reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 25 (7), 1701-1723.
- Lettinga, G., de Zeeuw, W., Ouborg, E. (1981). Anaerobic treatment of wastes containing methanol and higher alcohols. *Water Research*, 15 (2), 171-182.

- Lens, P., & Kuenen, J. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science & Technology*, 44 (8), 57-66.
- Lew, B., Tarre, S., Beliavski, M., Dosoretz, C., & Green, M. (2009). Anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for domestic wastewater treatment. *Desalination*, 243 (1), 251-257.
- Liao, B.Q., Kraemer, J.T. & Bagley, D.M., (2006). Anaerobic membrane bioreactors: Applications and research directions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 36 (6), 489-530.
- Lomans, B. P., Van der Drift, C., Pol, A., & den Camp, H. O. (2002). Microbial cycling of volatile organic sulfur compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59 (4), 575-588.
- Mahmoud, N., (1995). High strength sewage treatment in a UASB reactor and an integrated UASB-digester system. *Trends Biotechnology* 19, 363-370.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (1999). Diversidad metabólica de los microorganismos. *Biología de microorganismos. Prentice Hall Iberia*, 473-531.
- Mahmood, Q., Zheng, P., Cai, J., Wu, D., Hu, B., & Li, J. (2007). Anoxic sulfide biooxidation using nitrite as electron acceptor. *Journal of hazardous materials*, 147 (1), 249-256.
- McCarty, G. W. (1999). Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, 29 (1), 1-9.

- Manconi, I., Carucci, A., Lens, P., & Rossetti, S. (2006). Simultaneous biological removal of sulphide and nitrate by autotrophic denitrification in an activated sludge system. *Water Science & Technology*, 53 (12), 91-99.
- Marklund & Morling (1994). Biological phosphorus removal at temperatures from 3-degrees-C to 10-degrees-C—a full-scale study of a sequencing batch reactor. *J. Civil Eng.*, 21 (1), pp. 81–88.
- Márquez, J. E., Revah, S., & Le Borgne, S. (2010). Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitotóxicas, relevancia ambiental y biotecnología. *Mensaje bioquímico*, 34.
- Márques, M. C., Coelho, R., De Lacey, A. L., Pereira, I. A., & Matias, P. M. (2010). The Three-Dimensional Structure of [NiFeSe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough: A Hydrogenase without a Bridging Ligand in the Active Site in Its Oxidised “as-Isolated” State. *Journal of molecular biology*, 396 (4), 893-907.
- Martinelle, K., Westlund, A., & Häggström, L. (1996). Ammonium ion transport—a cause of cell death. *Cytotechnology*, 22(1-3), 251-254.
- Melse, R. W., van der Werf, A. W. (2005). Biofiltration for mitigation of methane emission from animal husbandry. *Environmental science & technology*, 39 (14), 5460-5468.
- Metcalf y Eddy, Inc. (1995). Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. 3ª Edición. *McGraw-Hill*, New York, USA.
- Metcalf y Eddy, Inc. (1991). Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. *McGraw-Hill*. New York, USA.

- McCartney, D. M., & Oleszkiewicz, J. A. (1993). Competition between methanogens and sulfate reducers: effect of COD: sulfate ratio and acclimation. *Water Environment Research*, 655-664.
- Modin, O., Fukushi, K., & Yamamoto, K. (2007). Denitrification with methane as external carbon source. *Water research*, 41 (12), 2726-2738.
- Moawad, A., Mahmoud, U. F., El-Khateeb, M. A., & El-Molla, E. (2009). Coupling of sequencing batch reactor and UASB reactor for domestic wastewater treatment. *Desalination*, 242 (1), 325-335.
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1996). Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (6), 2156-2162.
- Morgan-Sagastume, F., Larsen, P., Nielsen, J. L., & Nielsen, P. H. (2008). Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water research*, 42(4), 843-854.
- Moraes, B. S., Souza, T. S. O., & Foresti, E. (2012). Effect of sulfide concentration on autotrophic denitrification from nitrate and nitrite in vertical fixed-bed reactors. *Process Biochemistry*, 47 (9), 1395-1401.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Peeva, L., & Livingston, A. (2000). Microbial sulfate reduction in a liquid–solid fluidized bed reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 70 (4), 370-380.

- Neculita, C. M., Zagury, G. J., & Bussière, B. (2007). Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria. *Journal of Environmental Quality*, 36(1), 1-16.
- Nielsen, H., Daims, H., & Lemmer, H. (2009). FISH handbook for biological wastewater treatment. *IWA publishing*, London.
- O'Flaherty, V., Lens, P., Leahy, B., & Colleran, E. (1998). Long-term competition between sulphate-reducing and methane-producing bacteria during full-scale anaerobic treatment of citric acid production wastewater. *Water Research*, 32 (3), 815-825.
- Osaka, T., Ebie, Y., Tsuneda, S., & Inamori, Y. (2008). Identification of the organismol community involved in methane-dependent denitrification in activated sludge using DNA stable-isotope probing. *FEMS Microbiol Ecol* 64: 494–506.
- Parkin, G. F., Lynch, N. A., Kuo, W. C., Van Keuren, E. L., & Bhattacharya, S. K. (1990). Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate. *Research Journal of the Water Pollution Control Federation*, 780-788.
- Park, S., Lee, C. H., Ryu, C. R., & Sung, K. (2009). Biofiltration for reducing methane emissions from modern sanitary landfills at the low methane generation stage. *Water, air, and soil pollution*, 196 (1-4), 19-27.
- Philippot, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1577 (3), 355-376.

- Puig, S., Corominas, L., Vives, M. T., Balaguer, M. D., Colprim, J., & Colomer, J. (2005). Development and implementation of a real-time control system for nitrogen removal using OUR and ORP as end points. *Industrial & engineering chemistry research*, 44 (9), 3367-3373.
- Rabus, R., Wilkes, H., Schramm, A., Harms, G., Behrends, A., Amann, R., & Widdel, F. (1999). Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the b-subclass of Proteobacteria. *Environmental microbiology*, 1 (2), 145-158.
- Reyes, M., Borrás, L., Seco, A., & Ferrer, J. (2015). Identification and quantification of microbial populations in activated sludge and anaerobic digestion processes. *Environmental technology*, 36(1), 45-53.
- Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E., & Gomez, J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*, 38 (14), 3313-3321.
- Ribes, J., Torecillas, A. S., Usach, F. G., Pinzón, F. D., Polo, J. F. (2012). BioCalibra: dispositivo para la calibración y seguimiento de procesos de fangos activados. *Tecnología del agua*, 32(337), 64-71.
- Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1984). Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 139(4), 351-354.
- Ruiz-Martinez, A., Martin Garcia, N., Romero, I., Seco, A., & Ferrer, J. (2012). Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource technology*, 126, 247-253.

- Ruth, J. H. (1986). Odor thresholds and irritation levels of several chemical substances: a review. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 47 (3), A-142.
- Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1984). Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*, 139 (4), 351-354.
- Sanz, I., & Fdz-Polanco, F. (1990). Low temperature treatment of municipal sewage in anaerobic fluidized bed reactors. *Water research*, 24 (4), 463-469.
- Sears, K., Alleman, J. E., Barnard, J. L., & Oleszkiewicz, J. A. (2004). Impacts of reduced sulfur components on active and resting ammonia oxidizers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31 (8), 369-378.
- Seviour, R., & Nielsen, P. (2010). Microbial communities in activated sludge plants. *IWA Publishing*, 31, 91-125.
- Sierra-Alvarez, R., Beristain-Cardoso, R., Salazar, M., Gómez, J., Razo-Flores, E., & Field, J. A. (2007). Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment. *Water Research*, 41 (6), 1253.
- Singh, K. S., & Viraraghavan, T. (1998). Start-up and operation of UASB reactors at 20 C for municipal wastewater treatment. *Journal of fermentation and bioengineering*, 85 (6), 609-614
- Serafim, L., Lemos, P., & Reis, M. (2002). Effect of pH control on EBPR stability and efficiency. *Water Science & Technology*, 46 (4-5), 179-184.

- Sorokin, D. Y., Muyzer, G., Brinkhoff, T., Kuenen, J. G., & Jetten, M. S. (1998). Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic Nitrobacter species, *N. alkalicus* sp. nov. *Archives of microbiology*, 170 (5), 345-352.
- Sousa, J. T., & Foresti, E. (1996). Domestic sewage treatment in an upflow anaerobic sludge blanket-sequencing batch reactor system. *Water Science and Technology*, 33(3), 73-84.
- Smolders, G. J. F., Van der Meij, J., Van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1994). Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence. *Biotechnology and Bioengineering*, 43 (6), 461-470.
- Smolders, G. J. F., Van der Meij, J., Van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1994). Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnology and Bioengineering*, 44 (7), 837.
- Smolders, G. J. F., Van der Meij, J., Van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1995). A structured metabolic model for anaerobic and aerobic stoichiometry and kinetics of the biological phosphorus removal process. *Biotechnology and bioengineering*, 47 (3), 277-287.
- Sly, L. I., Bryant, L. J., Cox, J. M., & Anderson, J. M. (1993). Development of a biofilter for the removal of methane from coal mine ventilation atmospheres. *Applied microbiology and biotechnology*, 39 (3), 400-404.
- Speece, R. E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental science & technology*, 17 (9), 416A-427A.

- Takai, K., Suzuki, M., Nakagawa, S., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Inagaki, F., & Horikoshi, K. (2006). *Sulfurimonas paralvinellae* sp. nov., a novel mesophilic, hydrogen-and sulfur-oxidizing chemolithoautotroph within the Epsilonproteobacteria isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete nest, reclassification of *Thiomicrospira denitrificans* as *Sulfurimonas denitrificans* comb. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56 (8), 1725-1733.
- Texier, A. C., & Gomez, J. (2002). Tolerance of nitrifying sludge to p-cresol. *Biotechnology letters*, 24(4), 321-324.
- Thalasso, F., Vallecillo, A., Garcia-Encina, P., & Fdz-Polanco, F. (1997). The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Research*, 31 (1), 55-60.
- Thorndycroft, F.H., Butland, G., Richardson, D.J., & Watmough, N.L. (2007). A new assay for nitric oxide reductase reveals two conserved glutamate residues form the entrance to a proton-conducting channel in the organismol enzyme. *Biochem. J.* 401, 111-119.
- Timmermans, P., & Van Haute, A. (1983). Denitrification with methanol: fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium* sp. *Water Research*, 17 (10), 1249-1255.
- Van Haandel, A. C., & Lettinga, G. (1994). *Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate*. John Wiley & Sons.
- Van der Ha, D., Bundervoet, B., Verstraete, W., & Boon, N. (2011). A sustainable, carbon neutral methane oxidation by a partnership of

methane oxidizing communities and microalgae. *Water research*, 45 (9), 2845-2854.

Van de Last, A. R. M., & Lettinga, G. (1992). Anaerobic treatment of domestic sewage under moderate climatic (dutch) conditions using upflow reactors at increased superficial velocities. *Water Science & Technology*, 25 (7), 167-178.

Von Sperling, M., Freire, V. H., & de Lemos Chernicharo, C. A. (2001). Performance evaluation of a UASB-activated sludge system treating municipal wastewater. *Water Science & Technology*, 43 (11), 323-328.

Visser, A., Beeksmá, I., Van der Zee, F., Stams, A. J. M., & Lettinga, G. (1993). Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulphate concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40 (4), 549-556.

Vyrides, I., Conteras, P. A., & Stuckey, D. C. (2010). Post-treatment of a submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBR) saline effluent using powdered activated carbon (PAC). *Journal of hazardous materials*, 177 (1), 836-841.

Wang, J., Lu, H., Chen, G. H., Lau, G. N., Tsang, W. L., & van Loosdrecht, M. (2009). A novel sulfate reduction, autotrophic denitrification, nitrification integrated (SANI) process for saline wastewater treatment. *Water research*, 43 (9), 2363-2372.

Wang, Y., Inamori, R., Kong, H., Xu, K., Inamori, Y., Kondo, T., & Zhang, J. (2008). Nitrous oxide emission from polyculture constructed wetlands: effect of plant species. *Environmental pollution*, 152(2), 351-360.

- Wang, A. J., Chen, C., Liu, C. S., Ren, N. Q., & Lee, D. J. (2010). An Innovative Integrated Reactor System for Simultaneous Removal of Carbon, Sulfur and Nitrogen Based on Biological Niches. *Water Infrastructure for Sustainable Communities: China and the World*, 409.
- Whang, L. M., Park, J. K. (2006). Competition between polyphosphate-and glycogen-accumulating organisms in enhanced-biological-phosphorus-removal systems: effect of temperature and sludge age. *Water Environment Research*, 4-11.
- Waki, M., Suzuki, K., Osada, T., & Tanaka, Y. (2005). Methane-dependent denitrification by a semi-partitioned reactor supplied separately with methane and oxygen. *Bioresource technology*, 96(8), 921-927.
- Waki, M., Yasuda, T., Yokoyama, H., Hanajima, D., Ogino, A., Suzuki, K., & Tanaka, Y. (2009). Nitrogen removal by co-occurring methane oxidation, denitrification, aerobic ammonium oxidation, and anammox. *Applied microbiology and biotechnology*, 84 (5), 977.
- Walia R. (2007). Polishing of effluent from UASB reactor: ORP as a monitoring parameter, PhD thesis. Roorkee, India: Indian Institute of Technology.
- Ward, J. A., Slater, G. F., Moser, D. P., Lin, L. H., Lacrampe-Couloume, G., Bonin, A. S., & Sherwood Lollar, B. (2004). Microbial hydrocarbon gases in the Witwatersrand Basin, South Africa: implications for the deep biosphere. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68 (15), 3239-3250.
- Werner, M., & Kayser, R. (1991). Denitrification with biogas as external carbon source. *Water Science & Technology*, 23 (4-6), 701-708.

- Widdel, F., Bak, F. (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The prokaryotes*. Springer New York, 3352-3378.
- Whittenbury, R., Phillips, K. C., & Wilkinson, J. F. (1970). Enrichment, isolation and some synthetic budding organism. *Archiv für Mikrobiologie* 59, 324. Properties of methane-utilizing organism. *Journal of General Microbiology* 61, 205.
- Whittenbury R, Dalton H (1981). The methylotrophic organism. In: Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds) *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of organism*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 894–902
- Wu, D., Ekama, G. A., Lu, H., Chui, H. K., Liu, W. T., Brdjanovic, D. & Chen, G. H. (2013). A new biological phosphorus removal process in association with sulfur cycle. *Water research*, 47 (9), 3057-3069.
- Wu, M. L., van Teeseling, M. C., Willems, M. J., van Donselaar, E. G., Klingl, A., Rachel, R., & van Niftrik, L. (2012). Ultrastructure of the denitrifying methanotroph “Candidatus Methyloirabilis oxyfera,” a novel polygon-shaped bacterium. *Journal of bacteriology*, 194 (2), 284-291.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga. *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101 (14), 5494-5500.
- Yuan, X., Kumar, A., Sahu, A. K., and Ergas, S. J. (2011). Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor. *Bioresource technology*, 102 (3), 3234-3239.

ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I. PERFILES OBTENIDOS CON LAS SONDAS INSTALADAS EN LA PLANTA PILOTO

La información suministrada por las distintas sondas instaladas en la planta piloto (pH, OD, redox (ORP) y temperatura) proporcionan una idea de la tendencia de cada una de estas variables en el sistema. Toda la información fue visualizada en tiempo real permitiendo comparar estos valores con las analíticas realizadas en el laboratorio.

La Figura 84 muestra a modo de ejemplo los perfiles obtenidos durante el la etapa II (día 372) cuando la nitrificación estaba bien establecida. La Figura 84a muestra la concentración de OD en la zona aerobia y la frecuencia de la soplante. La Figura 84b muestra el pH al inicio (pH7) y final (pH13) de la zona aerobia y el pH al final de la zona anóxica (pH5). La Figura 84c presenta la concentración de amonio (NH₁₁) y nitrato (NO₁₁) al final de la zona aerobia, y la tendencia del potencial redox (ORP) al final de la zona anóxica.

Tal y como se muestra en la Figura 84 la concentración de OD en la etapa II se mantuvo en valores entre 1,5 y 2,0 mg l⁻¹. Para mantener esta consigna la soplante funcionaba a una frecuencia promedio de 40Hz. La soplante estaba conectada a un variador de frecuencia, conectado igualmente al PLC de la planta piloto, que permitía de manera automática modificar la frecuencia para mantener la consigna de oxígeno en los valores deseados.

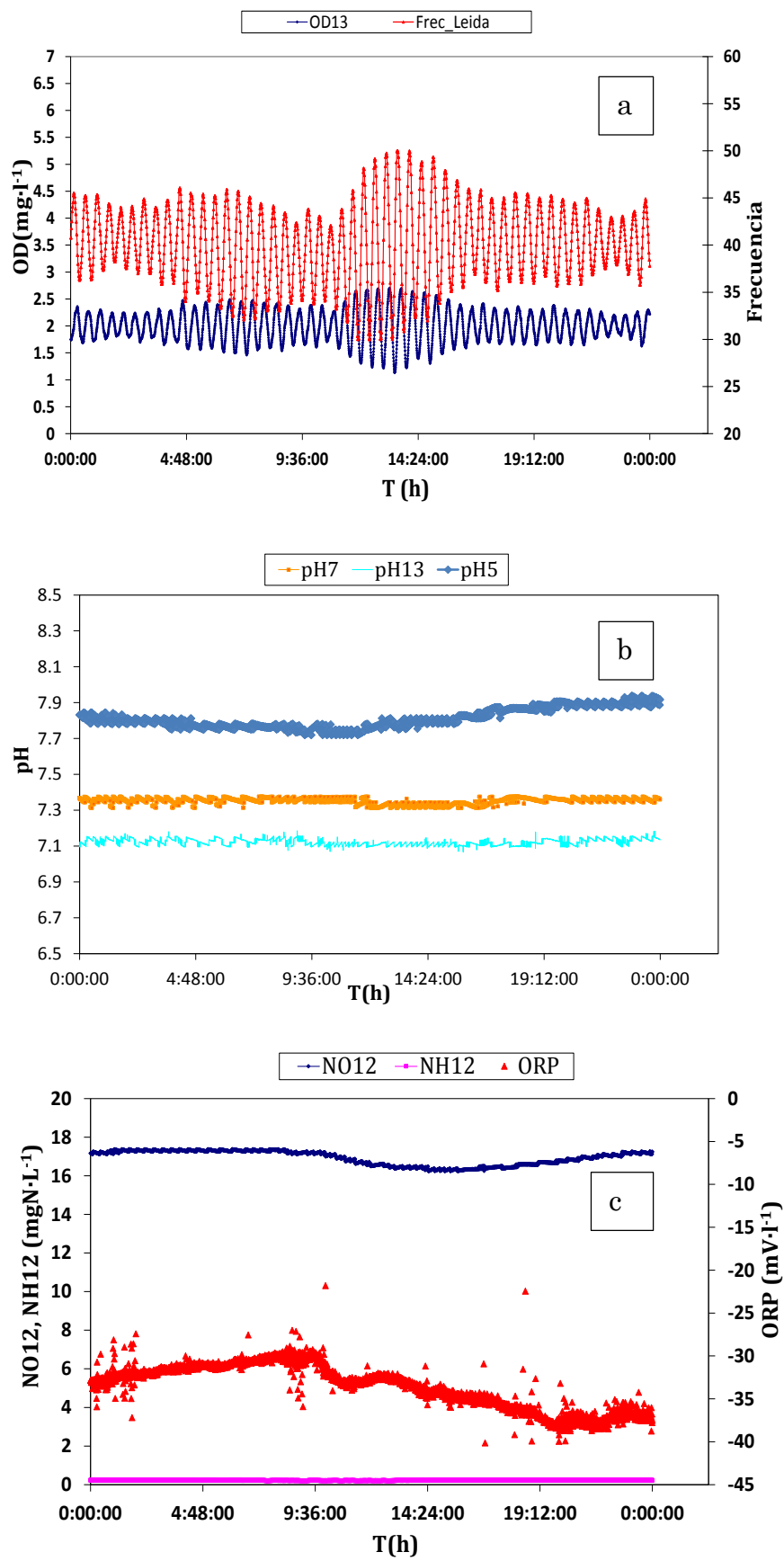


Figura 84. Perfiles obtenidos con las sondas instaladas en la planta piloto etapa II.

Los valores de pH que se muestran en la Figura 84b corresponden con valores típicos registrados en los procesos de nitrificación. Como se puede observar en la figura, el pH en la zona aerobia experimenta un descenso como consecuencia del proceso de nitrificación. Es decir, la evolución del pH entre el inicio y final de la zona aerobia refleja el potencial de nitrificación.

La Figura 84c muestra la tendencia de la concentración de amonio y nitrato al final de la zona aerobia, esto permitiría conocer en todo momento la tendencia de la concentración de estos compuestos a la salida del sistema y poder actuar sobre el proceso, en caso que fuera necesario. El valor del potencial redox al final de la zona anóxica indica, de forma indirecta, la concentración de nitrato existente.

La Figura 85 muestra los perfiles obtenidos en la etapa III hacia el día 660 cuando la nitrificación no estaba bien establecida. Tal y como se explicó anteriormente, en la figura se puede observar la concentración de OD en la zona aerobia, pH en la zona aerobia y anóxica, potencial redox al final de la zona anóxica y concentración de amonio y nitrato al final de la zona aerobia. Se observa que el sistema de control en la planta mantenía la concentración de OD en los valores deseados. Cuando la nitrificación no está bien establecida no se observan cambios de pH significativos y la concentración de amonio al final de la zona aerobia es alta y nitrato baja. En general las sondas instaladas permitieron observar en tiempo real la tendencia de estos parámetros y comprobar el estado de los procesos biológicos.

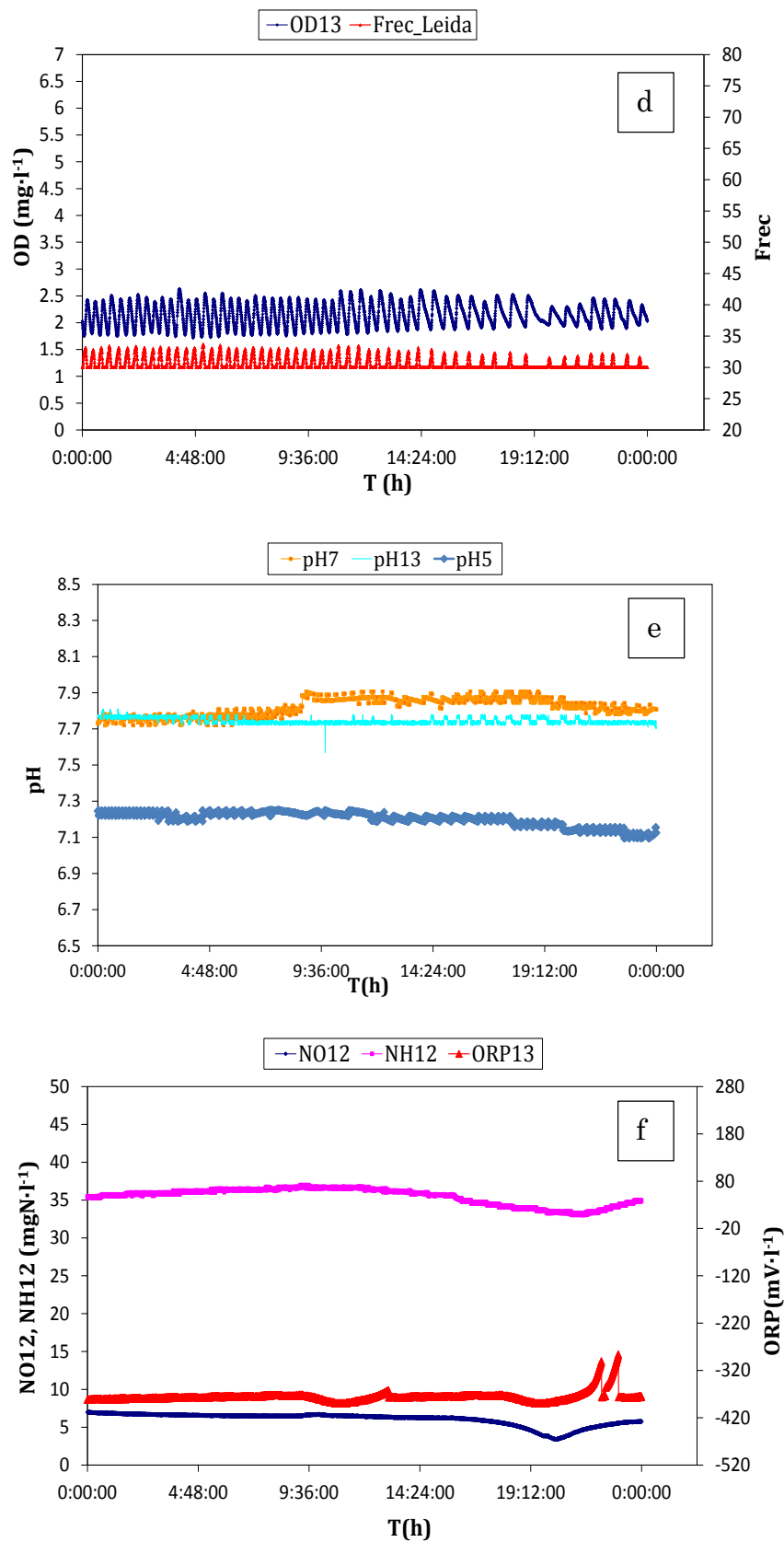


Figura 85. Perfiles obtenidos con las sondas instaladas en la planta piloto etapa III.

7.2 ANEXO II. NOMENCLATURA

AMO	Ammonia monooxigenasa
AGV	Ácidos grasos volátiles
AnMBR	Anaerobic Membrane BioReactor AnMBR
AUFB	Aerobic Upflow Fluidized Bed
A2/O	Esquema anaerobio-anóxico-aerobio
ATP	Trifosfato de adenosina
ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
AMO	Ammonium Mono-oxygenase enzyme
CYTC	Citocromo c
CO ₂	Dióxido de carbono
CG	Cromatografía gaseosa
CIP	Tanque de almacenamiento, Clean-in-place
DQO	Demanda química de oxígeno
DBO	Demanda biológica de oxígeno
DAF	Sistemas de Flotación por Aire Disuelto
DMP	2,6-dimetilfenol
DEN	Desnitrificantes
EDAR	Estacion Depuradora de Agua Residuales
EBPR	Enhanced Biological Phosphorus Removal
FADH	Formaldehido deshidrogenasa
FDH	Formiato deshidrogenasa
FISH	Técnica de hibridación in situ, Fluorescence In Situ Hybridization
HFC	Hidrofluorocarbonos
HAO	Hydroxyalanine Oxidoreductase enzyme
INSHT	Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
MBR	Reactor Biológico de Membranas
NH ₄	Nitrógeno amoniacal (NH ₄ ⁺)
NO ₃	Nitrato (NO ₃ ⁻)
NO ₂	Nitrito (NO ₂ ⁻)

Nxr	Enzima nitrito oxidoreductasa
Nap	Enzima nitrato reductasa
Nor	Enzima óxido nítrico reductasa
OSHA	Agencia para la Seguridad y la Salud en el Trabajo
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno, Oxygen Uptake Rate
OPC	Servidor OPC, OLE for Process Control
PTM	Presiones Transmembrana
PAO	Polyphosphate Accumulating Organisms
PHA	Polihidroxiclcanoatos
PHB	Poli-beta-hidroxibutirato
PHV	Poli-beta-hidroxivalerato
Poli-p	Polifosfato
PO4	Ortofosfafo (PO_4^{3-})
PAC	Carbón activado en polvo, Powdered Activated Carbón
PLC	Programador automático, Program Logic Control
PC	Personal Computer
PFC	Perfluorocarbonos
PI	Fluorocromo, Ioduro de propidio
Rae	Reactor aerobio
RuMP	Ribulosa monofosfato, Pathway for formaldehyde
SANI	Sulfate, autotrophic denitrification, nitrification integrated
SCADA	Sistema de adquisición de datos
SAnMBR	Submerged Anaerobic Membrane BioReactor SMBR
SBR	Reactor Secuencial por Lotes, Sequencing Batch Reactor
SRB	Organismos sulfatorreductores, Sulfate Reducing Bacteria
SF6	Hexafluoruro de azufre
SO4	Sulfato (SO_4^{2-})
S2O3	Tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)
TRH	Tiempo de Retención Hidráulico
TRC	Tiempo de Retención Celular
UASB	Reactor Anaerobio de Flujo Ascendente
USBB	Up-flow staged bed
UCT	Esquema de University of Cape Town

7.3 ANEXO III. RESUMEN DE LOS CRITERIOS DE CALIDAD PARA LA REUTILIZACIÓN DE AGUA DEPURADA SEGÚN LOS USOS DEL AGUA (RD1620/2007).

1. Uso Urbano	Criterios de calidad. Valor Máximo
1.1 Residencial: Riego de jardines privados y descarga de aparatos sanitarios.	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- 0 UFC Sólidos en suspensión: 10 mg ·l ⁻¹
1.2 Servicios: Riego de zonas verdes urbanas, baldeo de calles, sistemas contra incendios, lavado industrial de vehículos.	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- 0 UFC Sólidos en suspensión: 10 mg ·l ⁻¹ Turbidez: 10UNT Legionella spp. 100 UFC ·l ⁻¹
2. Riego agrícola	
2.1 Riego de cultivos con sistema de aplicación del agua regenerada	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- 100 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 20 mg ·l ⁻¹ Turbidez: 10 UNT Legionella spp. 1000 UFC ·l ⁻¹
2.2 Riego de productos para consumo humano con tratamiento industrial posterior, riego de pastos y	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- 1000 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 35 mg ·l ⁻¹

acuicultura.	Taenia saginata. 1 huevo l^{-1}
2.3 Riego de cultivos leñosos que impida el contacto del agua con los frutos, flores, viveros, invernaderos sin contacto directo, cultivos industriales no alimentarios, forrajes, cereales y semillas.	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- 10.000 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 35 mg l^{-1} Legionella spp. 1000 UFC l^{-1}
3. Uso industrial	
3.1 Aguas de procesos y limpieza excepto en la industria alimentaria y otros usos industriales.	Escherichia coli- 10.000 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 35 mg l^{-1} Turbidez: 15 UNT Legionella spp. 1000 UFC l^{-1}
3.2 Aguas de proceso y limpieza para uso en la industria alimentaria.	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- 10.000 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 35 mg l^{-1} Legionella spp. 1000 UFC l^{-1}
3.3 Torres de refrigeración y condensadores evaporativos	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- ausencia Sólidos en suspensión: 5 mg l^{-1} Legionella spp. ausencia UFC l^{-1}
4. Usos recreativos	
4.1 Riego de campos de golf	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- 200 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 20 mg l^{-1}

	Turbidez: 10 UNT
4.2 Estanques, masas de agua y caudales ornamentales en los que está impedido el acceso público.	Escherichia coli- 10.000 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 35 mg ·l ⁻¹ PT: 2 mg ·l ⁻¹ (En aguas estancada)
5. Usos ambientales	
5.1 Recarga de acuíferos por percolación localizada a través del terreno.	Escherichia coli- 1000 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 35 mg ·l ⁻¹ NT: 10 mg N ·l ⁻¹ NO ₃ :25 mgNO ₃ ·l ⁻¹ (5,6 mg N-NO ₃ ·l ⁻¹)
5.2 Recarga de acuíferos por inyección directa	Nematodos intestinales: 1 huevo/10L Escherichia coli- 0 UFC/100ml Sólidos en suspensión: 10 mg ·l ⁻¹ NT: 10 mg N ·l ⁻¹ NO ₃ :25 mgNO ₃ ·l ⁻¹ (5,6 mg N-NO ₃ ·l ⁻¹)
5.3 Riego de bosques, zonas y de otro tipo no accesible al público. Silvicultura	Sólidos en suspensión: 35 mg ·l ⁻¹

