UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería Ciencias y Administración

Instituto de Agroindustria

NITRIFICACIÓN-DESNITRIFICACIÓN VÍA NITRITO EN REACTORES DE DISCOS ROTATORIOS BAJO DOS MODALIDADES DE OPERACIÓN: CONTINUA Y SECUENCIADA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
DE RECURSOS NATURALES

GUSTAVO ANDRÉS CIUDAD BAZAUL

Temuco- Chile

2007

Agradecimientos

A los proyectos FONDECYT 1030317, FONDECYT 1070574 y DIUFRO 160601, por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo.

Al Programa ALFA, Red INGAM, Proyecto “Ciencias e Ingeniería para la protección ambiental”, por el financiamiento de mi estadía en la Universidad de Santiago de Compostela, España y a la Universidad de La Frontera por haberme otorgado una beca de estudio durante los años de mi formación.

Al Dr. Christian Antileo por su apoyo y por la posibilidad de participar en su grupo de trabajo, al Dr. Cristian Bornhardt por su apoyo y confianza. Al Dr. David Jeison por toda su ayuda en los comienzos.

Al Dr. Ramón Méndez Pampín de la Universidad de Santiago de Compostela, por toda su ayuda y por darme la posibilidad de hacer mi estadía en su grupo de investigación.

A toda la comunidad española que me abrió sus puertas, Rubén, Jose, Mónica Isaac y a la Asu porque me recibió como su hijo.

A la Dra. María de la Luz Mora, porque desde siempre me apoyó en todo.

A todos los que han pasado y están aún en mi grupo de trabajo: Fernando Huenupán, Daniel Rojas, Rodrigo Romero, Rodrigo González, Erwin Kehr, Francisco Jaramillo, Hardy Medina, Sandra Kreuter, Arne Werner, Laura Azócar, Oscar Cándia, María José Flores, Carolina Beltrán, Steve Millar y a los que se me olvidan también, por su apoyo, confianza y paciencia.

A Isaac Reyes y a Eduardo Gutiérrez por esos increíbles jam sessions que liberaron todo mi stress.

A Olivia Haeslope por su apoyo, ayuda y amistad, a Jorge Cabrera por todos los cafés que me invitó y por su siempre incondicional ayuda, a Anita Videla por todos los reactivos con los que me salvó, las entradas al jazz y su amistad, a Lorena Leal por su ayuda y paciencia, a Olga Rubilar por su larga amistad, a mi familia y en especial a mis padres y mi hermanita por su apoyo, a la Laura por todo su cariño, apoyo y ayuda incondicional en los buenos y malos momentos, y a mis amigos de toda la vida, por ser mis amigos, Jaime, Javier, Mauricio, Daniel, Cristian, Rodrigo, Ernesto.

NITRIFICACIÓN-DESNITRIFICACIÓN VÍA NITRITO EN REACTORES DE DISCOS ROTATORIOS BAJO DOS MODALIDADES DE OPERACIÓN: CONTINUA Y SECUENCIADA

Gustavo Andrés Ciudad Bazaul

Esta tesis fue realizada bajo la supervisión del Director de Tesis, Dr. Cristian Bornhardt y del Codirector Dr. Christian Antileo, del Departamento de Ingeniería Química y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

.....	.....
Director Postgrado en Ciencias de Recursos Naturales	**Director de Post Grado Universidad de La Frontera**
.....	.....
Director tesis Dr. Cristian Bornhardt B.	**Codirector tesis Dr. Christian Antileo H.**
.....	.....
Dr. Rolando Chamy M.	**Dra. Lorna Guerrero S.**
.....	.....
Dr. Hellmuth Leal L.	**Dra. Gladys Vidal S.**

Temuco- Chile

2007

1. ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN GENERAL 1

RESUMEN 2
ABSTRACT 4

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES GENERALES 6

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL 7
1.2. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO 9
1.2.1 NITRIFICACIÓN 9
1.2.2 DESNITRIFICACIÓN 13
1.3. OPERACIÓN DE UN REACTOR DISCONTINUO SECUENCIADO 15
1.3.1 REMOCIÓN DE NITRÓGENO A TRAVÉS DE NITRIFICACIÓN-DESNITRIFICACIÓN SIMULTÁNEA (NDS) 15
1.3.2 DURACIÓN DE LAS ETAPAS AERÓBICA Y ANÓXICA DE UN SBR 18
1.3.3 EFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO NITRÓGENO (DQO/N) 19
1.3.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OD 19
1.4. REACTORES DE BIOPELÍCULA (BIOMASA INMOVILIZADA) 20
1.5. ALCANCE DE LA TESIS 22
1.6 HIPÓTESIS 23
1.7 OBJETIVOS 24
1.7.1 OBJETIVO GENERAL 24
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS 25

2.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA 26
2.1.1 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO NITRITO ($N\text{-}NO_2^-$) 26
2.1.2 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO NITRATO ($N\text{-}NO_3^-$) 27
2.1.3 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO AMONIACAL TOTAL ($N\text{-}NH_4^+$) 28
2.1.4 pH 29
2.1.5 TEMPERATURA 29

2.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS **29**
2.2.1 EXTRACCIÓN DE ARNR 16S 30
2.2.2 VISUALIZACIÓN DEL ARNR 16S, HIBRIDACIÓN *DOT-BLOT* Y CUANTIFICACIÓN 30
2.2.3 MICROSCOPÍA DE EPIFLUORESCENCIA 31
2.2.4 MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) 31
2.3 REACTORES **32**
2.3.1 REACTOR RESPIROMÉTRICO-TITULOMÉTRICO BATCH DE BIOMASA SUSPENDIDA (RBBS) 32
2.3.2 REACTORES DE DISCOS ROTATORIOS RDR1 Y RDR2 33
2.4 SENSOR VIRTUAL DE NAT **35**
2.5 CÁLCULOS **36**
2.5.1 GRADO DE ACUMULACIÓN DE NITRITO 36
2.5.2 GRADO DE OXIDACIÓN DE NAT 36
2.5.3 TASA DE OXIDACIÓN DE NAT 36
2.6 PLAN DE TRABAJO **37**
2.6.1 OPERACIÓN DEL REACTOR BATCH DE BIOMASA SUSPENDIDA, RBBS 37
2.6.2 OPERACIÓN DEL REACTOR DE DISCOS ROTATORIOS NITRIFICANTE, RDR1 37
2.6.3 OPERACIÓN DE REACTOR DE DISCOS ROTATORIOS NITRIFICANTE DESNITRIFICANTE RDR2 38

CAPÍTULO III. ESTUDIOS CINÉTICOS **40**

3.1. RESUMEN **41**
3.2. INTRODUCCIÓN **42**
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS **44**
3.3.1 SISTEMA DE CONTROL 44
3.3.2 BIOMASA NITRIFICANTE 44
3.3.3 CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE BACTERIAS NITRIFICANTES 45
3.3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 47
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN **53**
3.4.1 DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE RENDIMIENTO $Y_{O_2/S}$ 53
3.4.2 CÁLCULO DIFERENCIADO DE K' PARA BAO Y BNO 55
3.4.3 CÁLCULO DIFERENCIADO DE KS PARA BAO Y BNO 58
3.4.4 DISTRIBUCIÓN BACTERIANA 62
3.5. CONCLUSIONES **63**

CAPÍTULO IV. OPERACIÓN SBR DE UN REACTOR DE BIOPELÍCULA RDR NITRIFICANTE 64

4.1. RESUMEN 65
4.2. INTRODUCCIÓN 65
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS 67
4.3.1 ESTRATEGIA OPERACIONAL 67
4.3.2. CONTROL SUPERVISOR DE PH 68
4.3.3 BIOMASA Y TOMA DE MUESTRAS 69
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 69
4.4.1 VALIDACIÓN DE LA PREDICCIÓN EN LÍNEA DE LA CONCENTRACIÓN DE NAT 69
4.4.2 CONTROL SUPERVISOR DE PH 70
4.4.3 NITRIFICACIÓN PARCIAL 72
4.4.4 TASA DE OXIDACIÓN DE AMONIO EN UN RDR CON NITRIFICACIÓN PARCIAL 74
4.4.5 DISTRIBUCIÓN Y COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LA BIOPELÍCULA 76
4.5. CONCLUSIONES 78

CAPÍTULO V. COMPARACIÓN DE OPERACIÓN SBR Y CONTINUA EN UN RDR NITRIFICANTE 79

5.1. RESUMEN 80
5.2. INTRODUCCIÓN 80
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS 81
5.3.1 ESTRATEGIAS OPERACIONALES 81
5.3.2 CRITERIO DE COMPARACIÓN ENTRE LA MODALIDAD SBR Y CONTINUA 84
5.3.3 BIOMASA Y TOMA DE MUESTRAS 84
5.3.4 MODELACIÓN DE UN RDR NITRIFICANTE CONTINUO 84
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 86
5.4.1 OPERACIÓN SBR 86
5.4.2 OPERACIÓN CONTINUA 91
5.4.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA LA OPERACIÓN SBR Y CONTINUA 96
5.4.4 MODELACIÓN DE UN RDR OPERADO EN CONTINUO 99
5.5. CONCLUSIONES 106

CAPÍTULO VI. REMOCIÓN GLOBAL DE NITRÓGENO EN UN REACTOR DE BIOPELÍCULA RDR OPERADO EN MODO SBR 108

6.1. RESUMEN 109
6.2. INTRODUCCIÓN 109
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS 110
6.3.1 ESTRATEGIAS DE OPERACIÓN 110
6.3.2. BIOMASA Y TOMA DE MUESTRAS 111
6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 112
6.4.1 PUESTA EN MARCHA Y APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA MEDICIÓN EN TIEMPO REAL 112
6.4.2 EFECTO DE LA RELACIÓN DQO/N Y LA CONCENTRACIÓN DE OD 115
6.5. CONCLUSIONES 120

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL 121

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES 126

NOMENCLATURA 128

REFERENCIAS 131

PUBLICACIONES 140

ANEXOS 142

A1. MODELO 143
A2. PROGRAMA RESPIROMETRÍA 148
A3. PROGRAMA SENSOR VIRTUAL DE NAT Y CONTROL SUPERVISOR DE PH 153

2. ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES GENERALES 6

Figura 1.1. Esquema del ciclo biogeoquímico del nitrógeno 7
Figura 1.2. Esquema del proceso de nitrificación y desnitrificación 12
Figura 1.3. Perfiles teóricos de las concentraciones de acetato, nitrato, PHB y oxígeno 17

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS 25

Figura 2.1. Instrumentación y control del RBBS 33
Figura 2.2. Instrumentación y control de los reactores de discos rotatorios RDR1 y RDR2 34
Figura 2.3. Material textil de soporte 34

CAPÍTULO III. ESTUDIOS CINÉTICOS 40

Figura 3.1. Control de la aireación durante los experimentos cinéticos 48
Figura 3.2 Respiración endógena y exógena de las actividades en conjunto de BAO y BNO, en la determinación de los coeficientes de rendimiento durante un ensayo respirométrico 54
Figura 3.3. Estrategia de diferenciación de bacterias nitrificantes por OD, en la determinación de K'_{BAO} y K'_{BNO} 56
Figura 3.4. Ejemplo de estimación de constantes cinéticas a través de linerización de las zonas de limitación por oxígeno 57
Figura 3.5. Estrategia de diferenciación por producción de protones, para el cálculo de Ks_{BAO} por titulometría 59
Figura 3.6. Estimación de Ks y $r_{Nmáx}$ para BAO, a través de linerización de las zonas de limitación por amoníaco 60
Figura 3.7. Estrategia para el cálculo de Ks_{BNO} por respirometría 61

CAPÍTULO IV. OPERACIÓN SBR DE UN REACTOR DE BIOPELÍCULA RDR NITRIFICANTE 64

Figura 4.1. Influencia de la concentración de sustrato en la tasa específica de crecimiento de las BAO, según cinética de Haldane 66

Figura 4.2. Operación del control supervisor de pH 68
Figura 4.3. Validación experimental de la predicción en línea de la concentración de NAT a diferentes concentraciones de OD 70
Figura 4.4. Ciclos SBR operados con control supervisor de pH y pH constante 71
Figura 4.5. Ejemplos de ciclos SBR con control supervisor de pH a diferentes concentraciones de OD 73
Figura 4.6. Evolución de nitrito y nitrato durante ciclos SBR operados mediante control supervisor de pH 74
Figura 4.7. Fotografías por SEM 78

CAPÍTULO V. COMPARACIÓN DE OPERACIÓN SBR Y CONTINUA EN UN RDR NITRIFICANTE 79

Figura 5.1. Operación SBR con control supervisor de pH a distintas concentraciones de OD 87
Figura 5.2 Estrategias de control de pH en la operación SBR a 5,0 mg O_2/L 90
Figura 5.3. Operación continua con pH constante a distintas concentraciones de OD 91
Figura 5.4. Operación continua a pH 7,5 para diferentes concentraciones de OD 92
Figura 5.5. Operación continua a pH 8,5, a diferentes concentraciones de OD 93
Figura 5.6. Promedios de los estados estacionarios de la operación continua a pH 7,5 a diferentes concentraciones de OD 94
Figura 5.7. Promedios de los estados estacionarios de la operación continua a pH 8,5 a diferentes concentraciones de OD 95
Figura 5.8. Fotografías tomadas de la operación SBR y continua 98
Figura 5.9. Comparación de NAT experimental versus NAT simulado a distintas concentraciones de OD 100
Figura 5.10. Comparación de la concentración de nitrito experimental versus la simulada, a distintas concentraciones de OD 101
Figura 5.11. Comparación de la concentración de nitrato experimental versus la simulada, a distintas concentraciones de OD 102
Figura 5.12. Simulación del efecto de la concentración de OD y pH en la acumulación de nitrito, en un RDR operado en continuo con un TRH de 12 h, a 20 ºC 103
Figura 5.13. Simulación del efecto de la concentración de OD y pH en la oxidación de amonio, en un RDR operado en continuo con un TRH de 12 h, a 20 ºC 104

Figura 5.14. Simulación del efecto de la concentración de OD y pH en la función objetivo Z, en un RDR operado en continuo con un TRH de 12 h, a 20 ºC 105

Figura 5.15. Diagrama de bloques del supervisor virtual 106

CAPÍTULO VI. REMOCIÓN GLOBAL DE NITRÓGENO EN UN REACTOR DE BIOPELÍCULA RDR OPERADO EN MODO SBR 108

Figura 6.1. Ciclos del periodo de puesta en marcha del RDR2 112

Figura 6.2. Ciclo típico de eliminación conjunta de MO y nitrógeno 114

Figura 6.3. Efecto de la relación DQO/N y la concentración de oxígeno en la tasa de oxidación de NAT 115

Figura 6.4. Remoción de nitrógeno 117

Figura 6.5. Efecto de la cantidad de DQO agregada, sobre la velocidad de consumo de DQO 118

Figura 6.6. Efecto conjunto de la relación DQO/N y concentración de OD, en la remoción de nitrógeno 119

3. ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO III. ESTUDIOS CINÉTICOS 40

Tabla 3.1. Coeficiente de rendimiento para BAO y BNO 54
Tabla 3.2. Estimación de K' y r'máx mediante respirometría para microorganismos BAO y BNO 57
Tabla 3.3. Estimación de Ks y $r_{Nmáx}$ mediante respirometría y titulación para microorganismos BAO y BNO 62

CAPÍTULO IV. OPERACIÓN SBR DE UN REACTOR DE BIOPELÍCULA RDR NITRIFICANTE 64

Tabla 4.1. Composición de sustrato sintético para SBRDR 67
Tabla 4.2. Resumen operación SBR con la aplicación del control supervisor de pH 75
Tabla 4.3. Comparación de resultados con otros trabajos 76
Tabla 4.4. Resultados de epifluorescencia e hibridación *dot-blot* 77

CAPÍTULO V. COMPARACIÓN DE OPERACIÓN SBR Y CONTINUA EN UN RDR NITRIFICANTE 79

Tabla 5.1. Estrategias de operación aplicadas al RDR 82
Tabla 5.2. Rango de trabajo para cada parámetro 85
Tabla 5.3. Resumen de resultados para diferentes estrategias de control de pH en la operación SBR a concentraciones limitantes y no limitantes de oxígeno 88
Tabla 5.4. Hibridación ARNr 16s *dot-blot* de la biopelícula, para determinar la distribución bacteriana de BAO y BNO durante la aplicación de dos modalidades de operación 97
Tabla 5.5. Parámetros iniciales (Valor inicial), rango de trabajo de cada uno de los parámetros (mínimo y máximo) y parámetros entregados por la rutina de ajuste. 99

CAPÍTULO VI. REMOCIÓN GLOBAL DE NITRÓGENO EN UN REACTOR DE BIOPELÍCULA RDR OPERADO EN MODO SBR 108

Tabla 6.1. Composición del sustrato usado en la etapa anóxica 110

RESUMEN GENERAL

RESUMEN

La remocion de compuestos nitrogenados de residuos líquidos, tanto domésticos como industriales, es necesaria para evitar impactos negativos en los cuerpos hídricos receptores.

En este trabajo se estudió la nitrificación parcial como una alternativa al proceso convencional de remoción biológica de nitrógeno, debido a que disminuye el requerimiento de oxígeno, materia orgánica (MO) y produce menor cantidad de lodo.

Para esta investigación se planteó que la utilización de un monitoreo avanzado, modelación y control en tiempo real del proceso, podría optimizar la nitrificación parcial. Además se planteó que la nitrificación parcial podría ser incrementada, no sólo al inhibir a las bacterias nitrito oxidantes (BNO), sino que al aumentar la actividad de las bacterias amonio oxidantes (BAO). Por otro lado, se planteó que la incorporación de una operación SBR (*Sequencing Batch Reactor*) en un reactor de biopelícula, permitiría llevar a cabo la nitrificación y desnitrificación simultáneamente en un solo reactor.

Para el trabajo experimental se utilizaron 3 reactores: un reactor *batch* de biomasa suspendida (RBBS) para estudios cinéticos y dos reactores de biopelícula del tipo discos rotatorios (RDR), uno nitrificante (RDR1) y otro nitrificante-desnitrificante (RDR2). Para todos los estudios se utilizó un efluente sintético.

En una primera etapa se propuso una metodología para el estudio cinético segregado de las poblaciones nitrificantes en el RBBS, basándose en que las BNO son más sensibles a bajas concentraciones de oxígeno que las BAO y que sólo ocurre producción de protones en la reacción de oxidación del amonio a nitrito por parte de las BAO. Estas propiedades se aplicaron en el diseño de ensayos cortos de respirometría y titulación.

Para las BAO se obtuvo que la constante de saturación de oxígeno (K'_{BAO}), fue de 0,9 mg O_2/L. Para las BNO la K'_{BNO} fue de 1,4 mg O_2/L y la constante de saturación de sustrato (Ks_{BNO}) tuvo un valor de $2{,}2 \times 10^{-4}$ mg N-HNO_2/L. Estos resultados muestran que la utilización de las diferencias de afinidad por el oxígeno de las BAO y BNO, para la determinación de K' de ambas poblaciones de bacterias, mostró ser un método aceptable.

En una segunda etapa se estudió la nitrificación parcial en el RDR1 operado en modo SBR, donde se desarrolló una metodología para la medición en línea de la concentración de nitrógeno amoniacal total (NAT) mediante un sensor virtual y un control supervisor de pH. Estas herramientas permitieron controlar la concentración de sustrato de las BAO en una

concentración óptima, y a la vez inhibir a las BNO por amoníaco, obteniendo una acumulación de nitrito superior 80%a estable en el tiempo(249 días) para una concentración de NAT inicial de 150 mg N/L.

En una tercera etapa el RDR1 fue operado en modo continuo con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 12h y con una concentración inicial de NAT de 150 mg N/L. En esta etapa se alcanzaron mayores tasas de oxidación de NAT, pero una inestable acumulación de nitrito en el tiempo.

Al comparar la operación SBR y continua del RDR1, se pudo determinar que con la aplicación del control supervisor de pH en la operación SBR, la acumulación de nitrito fue independiente de la concentración de oxígeno disuelto (OD), indicando que la microcinética (pH y NH_3) tiene un rol esencial en el mantenimiento de una nitrificación parcial estable; este resultado fue corroborado mediante la aplicación de un modelo. Además, la operación SBR contribuyó a la formación de una biopelícula más compacta y enriquecida con BAO (>95 %). En la operación continua la biopelícula fue más esponjosa y disminuyó el porcentaje de las BAO (70 %), aumentando la presencia de las BNO.

En una cuarta etapa se aplicaron las metodologías desarrolladas en las etapas anteriores a un proceso de remoción conjunta de MO y de nitrógeno (nitrificación-desnitrificación), para lo cual se utilizó el RDR2 operado en modalidad SBR. La nitrificación y desnitrificación estaban separadas temporalmente en una etapa aeróbica y una anóxica, respectivamente. La etapa aeróbica fue alimentada con una fuente de nitrógeno (150 mg N-NH_4^+/L) y en la etapa anóxica se agregó MO exógena (150 a 600 mg DQO/L) para realizar la desnitrificación. Mediante el monitoreo y control en tiempo real del proceso se determinó la duración de las etapas aeróbica (nitrificación) y anóxica (desnitrificación). Un aumento en la relación DQO/N, incrementó la remoción de nitrógeno (de 58 a 90 %), y aumentó la tasa de oxidación de NAT (de 3 a 7 mg N/L/h), lo que podría indicar la presencia de nitrificación heterotrófica.

En la etapa aeróbica se encontraron remociones de nitrógeno del orden de 30%, atribuidas al fenómeno de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS). La remoción de nitrógeno en la etapa aeróbica disminuyó significativamente al aumentar la relación DQO/N.

ABSTRACT

In this research the partial nitrification was studied as an alternative to the conventional process of nitrogen removal, incorporating an advanced monitoring and a real time control process. For this investigation a suspended biomass batch reactor (SBBR) and two biofilm rotating disk reactors (RDR1 and RDR2) were used. For all the studies a synthetic effluent was used.

In the first stage a methodology for the segregated kinetic study of the nitrifying populations, Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) and Nitrite Oxidizing Bacteria (NOB) was proposed. In this study, the nitrifying bacteria could be differentiated in two aspects: a) oxygen affinity: due to the higher sensitivity of NOB to low dissolved oxygen (DO) concentrations, and b) protons release: they are only produced during ammonium oxidation to nitrite (AOB activity). These properties ware aplied to short respirometric and titrimetric assay.

For the AOB, the oxygen saturation coefficient (K'_{BAO}) was 0.9 mg O_2/L, and the substrate saturation coefficient (Ks_{BAO}) was 0.3 mg N-NH_3/L. For the NOB the oxygen saturation coefficient (K'_{BNO}) was 1.4 mg O_2/L and the substrate saturation coefficient (Ks_{BNO}) was $2.2x10^{-4}$ mg N-HNO_2/L.

In the second stage partial nitrification in a SBR (*Sequencing Batch Reactor*) operation mode was studied. In this study a methodology for on-line measurement of the total ammonia nitrogen concentration (TAN) and a supervisory pH control was developed. These tools allowed to control the substrate concentration of the BAO at an optimal concentration, and simultaneously to inhibit the BNO, obtaining a stable nitrite accumulation > 80% (249 days).

In the third stage the nitrification in a traditional continuous operation was studied. During this stage higher TAN oxidation rates were reached, but with an unstable nitrite accumulation. The empirical data of the continuous operation were compared with data simulated by a model, showing a high correlation with the tendencies of nitrogen compounds.

When the SBR and continuous operation modes were compared, it was determined that the SBR mode with supervisory pH control presented more stable partial nitrification with nitrite accumulation > 80% for 249 days. Molecular analyses showed that the SBR operation with supervisory pH control at low DO concentrations contributed to the enrichment of the BAO (> 95%) over the BNO (< 5%) populations.

In the fourth stage the methodologies developed in the previous stages were applied to a global nitrogen removal process (nitrificationn-denitrification), for which a RDR operated in SBR mode was used. In this stage the nitrification and denitrification were separated in an aerobic and anoxic step, respectively. The aerobic step was fed with an ammonia nitrogen source, and only in the anoxic step exogenous organic matter was added. Using an on line monitoring and a real time control, the aerobic and anoxic step durations were determined.

The organic carbon/nitrogen ratio (COD/N) added in the anoxic step affected the global process. An increase in the COD/N increased the TAN oxidation rate, which can indicate a heterotrophic nitrification presence. In the aerobic step a 30% of nitrogen loss was found, attributed to simultaneous nitrification denitrification (SND). In this study, the SND and denitrification was favored at opposite conditions of COD/N, being the denitrification the process that governed the global nitrogen removal.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El nitrógeno amoniacal y compuestos oxidados de nitrógeno (nitrito y nitrato), al ser vertidos directamente a los cuerpos hídricos, provocan toxicidad en la fauna acuática, disminuyen el oxígeno disuelto (OD), acidifican el medio y aceleran el proceso de eutrofización.

Para llevar a cabo la remoción del nitrógeno de las aguas residuales existen métodos fisicoquímicos y biológicos. Los primeros generalmente no resuelven el problema, y trasladan el contaminante de una fase a otra. Sin embargo, mediante la aplicación de tratamientos biológicos, se obtiene como producto final CO_2 y N_2, gases que son devueltos a la atmósfera (Cervantes *et al.*, 2000). La remoción biológica se basa en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno, el que está compuesto por diversos procesos naturales mediados por microorganismos, que mantienen un constante equilibrio entre las distintas formas de nitrógeno (Figura 1.1) (Wiesmann, 1994).

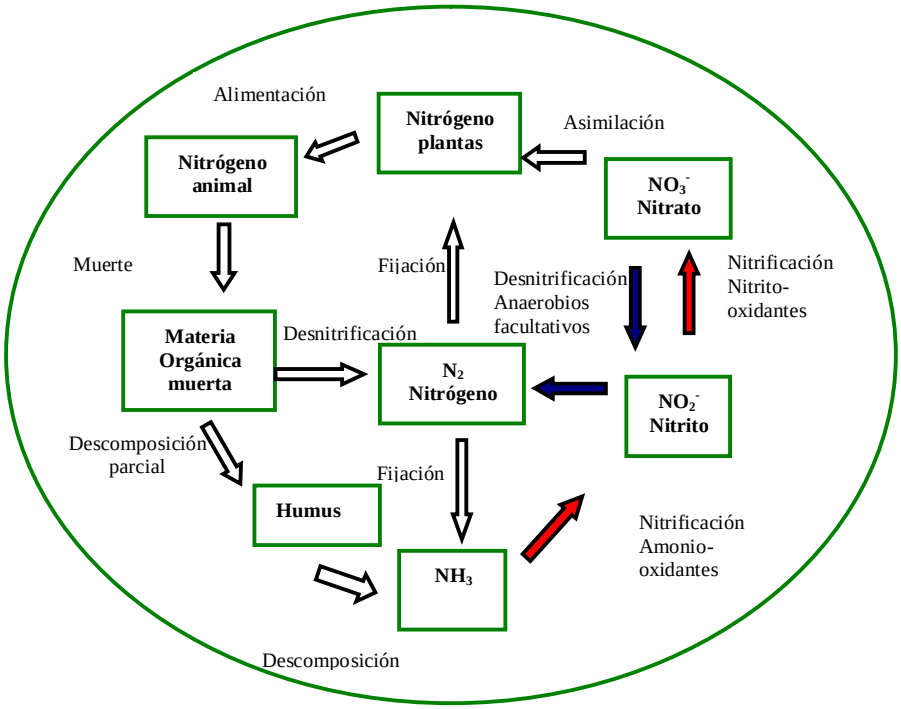

Figura 1.1. Esquema del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

Flechas rojas proceso de nitrificación; flechas azules proceso de desnitrificación

La remoción biológica de nitrógeno convencional, consiste en un tratamiento mediante dos procesos secuenciales: nitrificación y desnitrificación. La nitrificación contribuye a la remoción de nitrógeno por la oxidación del amonio a nitrato. Posteriormente, la desnitrificación reduce el nitrato a nitrógeno gas (N_2) (Figura 1.1).

En el proceso global (nitrificación-desnitrificación) la etapa de nitrificación es especialmente problemática por la baja tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes, en comparación a las bacterias desnitrificantes, debido a que ambas compiten por espacio y OD (Bernet *et al.*, 2001). Además, la tasa de nitrificación es sensible a diversos factores, tales como pH, temperatura, concentración de OD, concentración de sustrato y concentración de biomasa (Anthonisen *et al.*, 1976).

Diversas investigaciones se han enfocado en la aplicación de la remoción biológica de nitrógeno a aguas residuales con altas cargas nitrogenadas (> 100 mg $N\text{-}NH_4^+/L$). Sin embargo, generalmente la relación DQO/nitrógeno contenida en ellos es inferior a la necesaria para realizar la desnitrificación (Chen *et al.*, 2004). Por otro lado, nitrificar altas cargas de nitrógeno implica elevados costos de aireación (Cecen, 1996). Esto ha impulsado una nueva generación de tratamientos biológicos, como la nitrificación vía nitrito o la implementación de la nitrificación – desnitrificación simultánea (NDS), que permiten tratar altas cargas nitrogenadas con bajo contenido en materia orgánica (MO). Sin embargo, estos sistemas han resultado ser inestables en el tiempo, lo que dificulta su aplicación a gran escala.

Por otro lado, la utilización de tratamientos con biomasa inmovilizada (reactores de biopelícula), ha permitido avances en la remoción biológica de nitrógeno. Los reactores de biomasa inmovilizada permiten mantener mayores concentraciones de bacterias que los tratamientos de biomasa suspendida, disminuyendo el tamaño de los reactores y evitando la pérdida de bacterias de lento crecimiento, como las que realizan la nitrificación (Sievers *et al.*, 2003).

1.2. REMOCIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

1.2.1 Nitrificación

Es el proceso más utilizado en la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales, y se basa en la oxidación biológica del nitrógeno amoniacal por parte de bacterias aeróbicas quimioautolitotróficas.

En la nitrificación participan dos poblaciones de bacterias, las bacterias amonio oxidantes (BAO) y las bacterias nitrito oxidantes (BNO). Las BAO oxidan el amonio a nitrito, en un proceso denominado nitritación (Ecuación (1.1)). Dentro de este grupo de bacterias se encuentran géneros como *Nitrosococcus sp* y *Nitrosospira sp*, siendo las más estudiadas *Nitrosomonas sp* (NS).

Las BNO oxidan el nitrito a nitrato en un proceso denominado nitratación (Ecuación (1.2)). Dentro de este grupo de bacterias se encuentran géneros como *Nitrospira sp*, *Nitrospina sp* y *Nitrococcus sp*, siendo las más estudiadas *Nitrobacter sp* (NB) (Philips *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2000).

$$NH_4^+ + \frac{3}{2}O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + 2H^+ \qquad (1.1)$$

$$NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_3^- \qquad (1.2)$$

En la nitritación, las BAO transforman el amonio en hidroxilamina (NH_2OH) mediante la enzima amonio mono oxigenasa. Posteriormente, convierten la hidroxilamina en nitrito mediante la enzima hidroxilamina óxido reductasa. Durante esta etapa (nitritación) ocurre el mayor consumo de oxígeno (3,16 g O_2/g N-NH_4^+) (Cervantes *et al.*, 2000; Wiesmann, 1994). Además, existe liberación de protones que acidifican el medio, lo que implica mantener un constante control del pH.

En la nitratación, las BNO realizan la oxidación de nitrito a nitrato mediante un complejo enzimático denominado nitrito óxido reductasa.

Cinética de la nitrificación

Las bacterias nitrificantes, al ser quimioautolitotróficas se caracterizan por tener velocidades de crecimiento (μ) bajas en comparación a bacterias heterotróficas (0,7 y 7,2 1/d, respectivamente) (Wiesmann, 1994). Las expresiones matemáticas que interpretan las velocidades de crecimiento específico de las BAO (Ecuación (1.3)) y BNO (Ecuación (1.4)), fueron descritas por Pirsing *et al*. (1996), y son características de la cinética de Haldane. En la cinética de la nitrificación se consideran dos tipos de inhibición: por sustrato y competitiva. Además, se incluye el efecto producido por la limitación de sustrato (nitrógeno) y OD. Esto muestra la gran sensibilidad de las bacterias nitrificantes a la variación de la concentración de sus sustratos.

$$m_{BAO} = m_{\max,BAO} \cdot \frac{c_{NH3}}{Ks_{BAO} \cdot \left[1 + \frac{c_{HNO2}}{Ki_{BAO}}\right] + c_{NH3} + \frac{c_{NH3}^{2}}{Ki,s_{BAO}}} \cdot \frac{c'}{K'_{BAO} + c'} \tag{1.3}$$

$$m_{BNO} = m_{\max,BNO} \cdot \frac{c_{HNO2}}{Ks_{BNO} \cdot \left[1 + \frac{c_{NH3}}{Ki_{BNO}}\right] + c_{HNO2} + \frac{c_{HNO2}^{2}}{Ki,s_{BNO}}} \cdot \frac{c'}{K'_{BNO} + c'} \tag{1.4}$$

Donde:

Y_{B/O_2} = Coeficiente de rendimiento de formación de bacterias por oxígeno consumido

c' = Concentración de OD

c_B = Concentración de bacterias

Ki = Constante de inhibición

Ki,s = Constante de inhibición por sustrato

μ = Velocidad de crecimiento específico de las bacterias

$\mu_{máx}$ = Velocidad máxima de crecimiento específico de las bacterias

(Para mayor detalle, ver capítulo Nomenclatura).

Los verdaderos sustratos de las bacterias nitrificantes son las formas no iónicas de amonio y nitrito (NH_3 y HNO_2, respectivamente), debido al menor requerimiento energético involucrado

en el transporte de éstos hacia el interior de la célula (Philips *et al.*, 2002). El pH y la temperatura determinan el equilibrio químico entre las formas iónicas y no iónicas.

A pH alcalinos (> 7,0), el equilibrio químico se desplaza hacia la formación de amoníaco (NH_3) y hacia la formación de nitrito. Esta situación favorece a las BAO por sobre las BNO. La actividad de las BNO es fuertemente dependiente de la concentración de amoníaco; a valores por sobre 1 mg N-NH_3, la actividad decrece exponencialmente. A pH menores a 6,0, tanto las BAO como las BNO decrecen su actividad (Fdzpolanco *et al.*, 1994).

A medida que aumenta la temperatura, se favorece la formación de NH_3. Temperaturas entre 28-30ºC estimulan el crecimiento de las BAO por sobre las BNO (Hellinga *et al.*, 1998).

Las bacterias nitrificantes poseen una constante de afinidad por el OD (K'), aproximadamente un orden de magnitud mayor que la constante de afinidad por el sustrato (Ks). Por lo tanto, la concentración de OD tiene un efecto mayor en la velocidad de crecimiento específica (μ) cuando su concentración es baja (Wiesmann, 1994). El OD sin duda es uno de los parámetros más relevantes en la nitrificación (Hidaka *et al.*, 2002); concentraciones menores a 2 mg O_2/L pueden limitar parcial o totalmente la actividad de las bacterias nitrificantes.

En síntesis, se puede afirmar que el pH, la temperatura y la concentración de OD, pueden tener un efecto de activación-desactivación sobre el metabolismo de las BAO y BNO. Este hecho pone en evidencia la importancia del control automático permanente en un sistema de tratamiento, principalmente del pH y de la concentración de OD.

Nitrificación vía nitrito

Como se plantea en la Figura 1.2, el nitrito es un intermediario común en el proceso nitrificación-desnitrificación (Paso 2). La formación de nitrato en la nitrificación y la formación de nitrito en la desnitrificación implican un gasto innecesario de energía (OD y MO respectivamente). En el proceso global, nitrificar solamente hasta nitrito requiere un 25% menos de consumo de OD en la etapa aerobia, y de un 40 a un 60% de ahorro en MO en la etapa anóxica; sumado a esto, se produce un 300% menos de biomasa (Bernet *et al.*, 2001; Garrido *et al.*, 1997a; Jenicek *et al.*, 2004; Picioreanu *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004a).

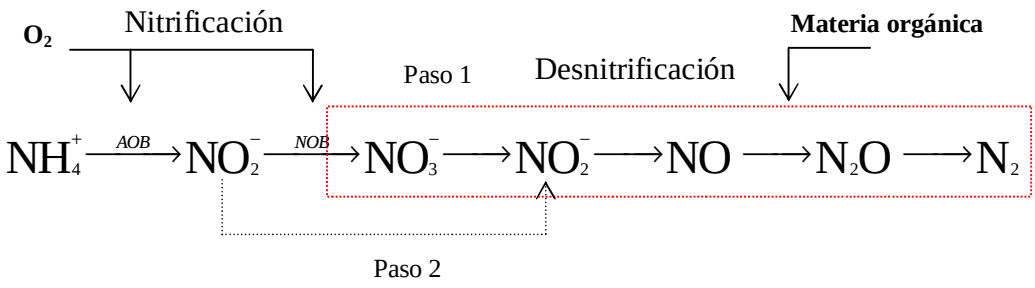

Figura 1.2. Esquema del proceso de nitrificación y desnitrificación

Para rllevar a cabo la nitrificación vía nitrito, o también llamada nitrificación parcial, se requiere reducir la actividad de las bacterias que realizan la nitratación (BNO). Estudios confirman que la concentración de OD es un interesante parámetro de control para producir nitrificación vía nitrito (Garrido *et al.*, 1997b), debido a que las BAO y BNO poseen distinta afinidad por éste (K'_{BAO} = 0,3 mg O_2/L y K'_{BNO} =1,1 mg O_2/L, respectivamente) (Wiesmann, 1994). Esto implica una mayor sensibilidad de las BNO a bajas concentraciones de OD (Turk y Mavinic, 1989; Wiesmann, 1994).

Estudios en nitrificación parcial, han logrado valores cercanos al 80% de acumulación de nitrito, en base a la aplicación de concentraciones de OD < 2,5 mg O_2/L (Bernet *et al.*, 2001; Ciudad *et al.*, 2005; Garrido *et al.*, 1997b; Ruiz *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2006).

Por otra parte, el control del pH es significativamente influyente en la acumulación de nitrito, debido a que gobierna el equilibrio de las formas iónicas y no iónicas de los sustratos. Desde este punto de vista, los pH alcalinos tienen dos efectos en las BNO: a) Inhibición por amoníaco y b) limitación por sustrato, ya que desplazan el equilibrio hacia la formación de nitrito (Villaverde *et al.*, 1997). Autores como Villaverde *et al.* (2000), concluyen que la principal causa de acumulación de nitrito en un reactor nitrificante, es la inhibición ejercida por el amoníaco sobre las BNO, lo que también es corroborado por Gee y Kim (2004). Villaverde *et al.*, (2000) demostraron que la concentración de amoníaco a la cual se manifiesta inhibición, aumentaba con el tiempo, variando de 0,1 a 10 mg N-NH_3/L. Esto puede ser consecuencia del crecimiento o de la aclimatación de las BNO al amoníaco (Villaverde *et al.*, 2000). Hellinga *et al.* (1998), para evitar la aclimatación de las bacterias BNO, proponen

trabajar en reactores de biomasa suspendida a altas temperaturas (28-34ºC) y con una baja retención de sólidos, eliminando de este modo a las bacterias menos favorecidas (BNO). Este proceso se conoce como "SHARON" (***S**ingle Reactor **H**igh **A**ctivity Ammonia **R**emoval **O**ver **N**itrite*). Sin embargo, mantener la temperatura por sobre los 28ºC, implica elevados costos energéticos.

Por lo tanto, las condiciones para mantener estable en el tiempo una eficiente oxidación de nitrógeno amoniacal total (NAT), en concomitancia con inhibición de la oxidación de nitrito, es uno de los problemas mas recurrente (Fux *et al.*, 2004). Por otro lado, el nitrito puede ser inhibitorio para las bacterias desnitrificantes, sin embargo se ha probado que estas bacterias pueden aclimatarse en el tiempo a la presencia de nitrito (Chung y Bae, 2002).

1.2.2 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso respiratorio anóxico, realizado principalmente por bacterias heterotróficas. Los géneros más representativos incluyen *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*. La desnitrificación es llevada a cabo en una serie de pasos hasta la formación de N_2 (Figura 1.1). En cada uno de estos pasos participan distintas enzimas. La más importante es la óxido nitroso reductasa, que cataliza la transformación de N_2O a N_2. Esta enzima es inhibida en presencia de OD, liberando N_2O al ambiente (gas invernadero).

La capacidad de desnitrificar está relacionada con la cantidad de sustrato biodegradable presente (relación carbono orgánico/nitrógeno). Generalmente, en los tratamientos biológicos de residuos líquidos, la presencia de sustrato fácilmente degradable es baja, especialmente en RILes (Maurer *et al.*, 1999). Con una relación carbono nitrógeno (C/N) mayor a 4, la tasa de desnitrificación se incrementa en un factor de 1,5 a 1,7; a relaciones C/N menores a 2,5 no se alcanza una desnitrificación satisfactoria, por lo tanto se necesita una fuente externa de carbono (Helmer-Madhok *et al.*, 2002).

Las Ecuaciones (1.5) y (1.6) muestran la estequiometría de la desnitrificación cuando se utiliza como fuente de carbono al metanol. Se puede observar además que a diferencia de la nitrificación, existe producción de hidroxilos, que incrementan el pH del medio (Halling-Sorensen y Jorensen, 1993).

$$NO_3^- + \frac{1}{3}CH_3OH \rightarrow NO_2^- + \frac{2}{3}H_2O \tag{1.5}$$

$$NO_2^- + \frac{1}{2}CH_3OH \rightarrow \frac{1}{2}N_2 + \frac{1}{2}CO_2 + \frac{1}{2}H_2O + OH^- \tag{1.6}$$

Cinética de la desnitrificación

La velocidad de crecimiento específica (μ) de las bacterias desnitrificantes está controlada por la presencia de MO (DQO, Demanda Química de Oxígeno) y por la concentración de aceptores de electrones (nitrito o nitrato). La cinética de la desnitrificación se puede representar por la ecuación de Monod con doble limitación (Ecuación (1.7)) (Cervantes *et al.*, 2000; Wiesmann, 1994).

$$m = m_{\max} \cdot \frac{c_{NO_X^-}}{K_N + c_{NO_X^-}} \cdot \frac{c_{DQO}}{K_{DQO} + c_{DQO}} \tag{1.7}$$

Donde:

NO_x = $N\text{-}NO_2^-$ + $N\text{-}NO_3^-$

Cuando se utiliza al nitrito como aceptor de electrones, la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{máx}$) es menor que cuando se utiliza nitrato (1,5 y 2,6 1/d, respectivamente), lo que implica una menor producción de biomasa (Wiesmann, 1994). Por otro lado, Gee y Kim (2004) mostraron que la desnitrificación a partir de nitrito es de 3 a 5 veces más rápida que cuando se utiliza nitrato, reduciendo además el requerimiento de MO.

El pH puede influir en la acumulación de intermediarios indeseados. A pH menores que 6, se acumula ácido nitroso, el cual es tóxico para las bacterias. La desnitrificación es favorecida a pH alcalinos (6-9) (Cervantes *et al.*, 2000).

1.3. OPERACIÓN DE UN REACTOR DISCONTINUO SECUENCIADO

1.3.1 Remoción de nitrógeno a través de nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS)

Las formas clásicas de eliminar biológicamente el nitrógeno requieren trabajar con más de un reactor, en forma separada y bajo distintas configuraciones. Un ejemplo son los sistemas con pre y post desnitrificación. Estos sistemas necesitan de una fuente adicional de carbono en los reactores desnitrificantes (generalmente metanol), lo que aumenta el costo del tratamiento. Una alternativa de tratamiento es la nitrificación-desnitrificación simultánea (NDS). Esto implica que la nitrificación y desnitrificación ocurren en el mismo reactor y al mismo tiempo. Diversos son los estudios que avalan las ventajas que tendría utilizar este proceso en la eliminación conjunta de MO y nitrógeno (Chiu *et al.*, 2007; Gibbs *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 1997; Pochana y Keller, 1999; Pochana *et al.*, 1999; Sen y Dentel, 1998; Third *et al.*, 2003; Third *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 1999). La NDS ofrece ventajas por sobre los tratamientos convencionales, como ahorros en espacio e infraestructura. Sin embargo, las condiciones a las cuales ocurre una eficiente NDS aún no están establecidas (Chiu *et al.*, 2007).

La NDS puede ser explicada en forma física y biológica (Munch *et al.*, 1996). La explicación física es que la NDS ocurre como una consecuencia de un gradiente en la concentración de OD entre los flóculos microbianos o biopelícula y el seno del fluido. Las bacterias nitrificantes existirían en zonas con alta concentración de OD, mientras que bacterias desnitrificantes se encontrarían activas en zonas con baja concentración de OD, como al interior de los flóculos o biopelícula, formando un consorcio simbiótico similar al de los gránulos anaeróbicos.

Una de las explicaciones biológicas se basa en que muchas bacterias desnitrificantes presentan actividad nitrificante en condiciones aeróbicas, como las del género *Pseudomonas* y *Paracoccus denitrificans*; este fenómeno se asocia a la enzima periplasmática nitrato reductasa (Robertson *et al.*, 1995). Por otro lado se ha probado la existencia de nitrificación heterotrófica, atribuida principalmente a *Thiosphaera pantotropha*. Además, algunas bacterias nitrificantes pueden llevar a cabo la desnitrificación en presencia de pequeñas concentraciones de OD (Bock *et al.*, 1995). Por lo tanto, el nitrógeno amoniacal puede ser directamente convertido en nitrógeno gaseoso (N_2) sin acumulación de nitrito ni de nitrato (Helmer y Kunst, 1998; Helmer *et al.*, 1999).

Para que ocurra NDS, es necesaria la existencia simultánea de zonas aeróbicas y anóxicas. Por lo tanto, puede ser llevada a cabo en reactores de biopelícula, sumado a una operación en modalidad SBR, que se basa en la alternancia temporal de periodos de alimentación, aeróbicos, anóxicos y vaciado.

Los reactores SBR trabajan en base a ciclos previamente programados. Un ciclo puede contener muchas etapas, dentro de las que se destaca: llenado, mezclado sin aireación, aireación, reposo, sedimentación y drenado. En la etapa de mezclado sin aireación, las bacterias nitrificantes consumen todo el OD remanente, dejando el reactor en condiciones anóxicas para el comienzo de la desnitrificación. Para evitar la oxidación de la MO la etapa inicial es anóxica. Además, en la etapa aeróbica generalmente se opera a concentraciones bajas de OD (0,5 mg O_2/L) a las cuales la velocidad de nitrificación se hace igual a la velocidad de desnitrificación (Pochana y Keller, 1999).

Beun *et al*. (2000a) y (2000b) plantearon que en un reactor operado en modo SBR, existen dos periodos de acuerdo a la presencia o ausencia de MO fácilmente degradable: periodo de saciedad (*feast*) y periodo de hambruna (*famine*) (Figura 1.3).

El periodo de saciedad (Figura 1.3A), se produce cuando existe un exceso de MO exógena. Este sustrato difundirá al interior de la biopelícula, almacenándose como un sustrato de reserva (lípidos, glicógeno y Poli-β-hidroxibutirato) para condiciones adversas. El sustrato de reserva dominante es el PHB (Poli-β-hidroxibutirato). La penetración del oxígeno es baja porque es consumido rápidamente por las bacterias autotróficas y heterotróficas. En el periodo de saciedad el oxígeno es usado en la nitrificación, oxidación del acetato y crecimiento de biomasa aeróbica (procesos llevados a cabo en la zona clara de la Figura 1.3. El nitrato formado en la nitrificación difundirá al interior de la biopelícula, pero también hacia al seno del líquido.

El periodo de hambruna (Figura 1.3B), se produce cuando no existe MO exógena. Por lo tanto, el PHB almacenado puede ser usado como fuente de MO para la desnitrificación, lo que explicaría por qué el fenómeno NDS es propio de los sistemas operados en modalidad SBR. En éste periodo la penetración del oxígeno es mayor que en el periodo de saciedad, por que la concentración de oxígeno en el medio es mayor.

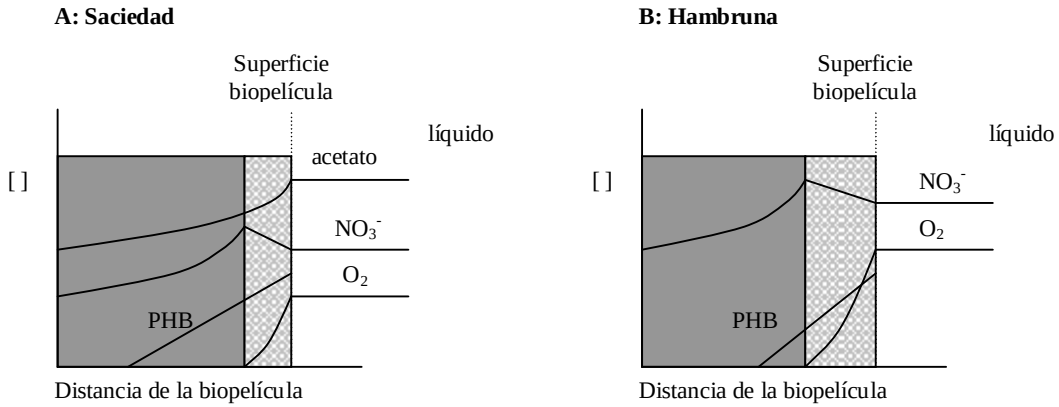

Figura 1.3. Perfiles teóricos de las concentraciones de acetato, nitrato, PHB y oxígeno durante el periodo de: A) saciedad y B) hambruna en una operación SBR. Zona oscura: corresponde a la zona anóxica. Zona clara: corresponde a la zona aeróbica (Beun, 2000).

Diversos estudios confirman la presencia de NDS en reactores operados en modalidad SBR. Helmer y Kunst (1998) observaron un 90% de pérdida de nitrógeno inorgánico en un reactor de biomasa inmovilizada RDR nitrificante, bajo condiciones limitantes de OD. Este mismo efecto fue reportado por Siegrist *et al*. (1998). Peng *et al.* (2004b) aplicaron la tecnología SBR en la remoción completa de nitrógeno con nitrificación vía nitrito, donde prolongaron el periodo anóxico para eliminar todo el nitrito producido. En la etapa aeróbica lograron una producción estable de nitrito por 150 días. Gee y Kim (2004), en un reactor de biomasa suspendida, lograron producir 80% de acumulación de nitrito ($N\text{-}NO_2^-/N\text{-}NO_x^-$) gracias a la mantención de una alta concentración de amoníaco en el reactor.

Pynaert *et al*. (2003) en un RDR, lograron remover 89% del nitrógeno de la alimentación en forma de N_2, sin la presencia de MO. Una explicación a este fenómeno es que bacterias nitrificantes autotróficas oxidan parte del amonio a nitrito, usando el OD como aceptor de electrones. Posteriormente, en condiciones anóxicas el nitrito puede ser usado como aceptor de electrones, produciendo una oxidación anaeróbica del amonio a N_2 (Ecuación (1.8)), este fenómeno se conoce como Anammox (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) (Jetten *et al.*, 1998; Mulder *et al.*, 1995).

$$NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O \quad (1.8)$$

1.3.2 Duración de las etapas aeróbica y anóxica de un SBR

Una de las principales ventajas de la tecnología SBR es la flexibilidad para ajustar la duración de cada etapa (Peng *et al.*, 2004a). Por ejemplo, Marazioti *et al*. (2003) utilizaron un SBR con un ciclo total de 12 horas, con 6 horas de duración de cada etapa (aeróbica y anóxica), obteniendo una desnitrificación casi completa en la etapa anóxica. Sin embargo, trabajos de Chen *et al*. (2004) y Wang *et al*. (2004b), proponen un sistema de control para determinar en línea la duración de cada etapa, basado en un monitoreo en tiempo real del potencial de óxido reducción (POR) y del pH.

El potencial de óxido reacción (POR) de una solución depende de la oxidación y reducción del agente presente, y se determina por la diferencia de potencial entre un electrodo inerte inmerso en la solución y un electrodo de referencia. Una disminución en el valor de POR indicaría la falta de MO. El incremento en los valores de POR, indicaría la acumulación de nitrato. Por otro lado, bruscas caídas en el valor de POR (*nitrate knee*), indican desaparición de nitrato y el fin de la etapa anóxica (desnitrificación). Con el valor de pH se puede monitorear la duración de la etapa aeróbica, debido a que en ésta se producen protones (oxidación del amonio). Por lo tanto, cuando no existe consumo de carbonato o NaOH (solución neutralizante para mantener pH constante) indicaría el fin de la etapa aerobia. Gee y Kim (2004), en un reactor de biomasa suspendida con nitrificación-desnitrificación vía nitrito, proponen un monitoreo constante del pH y la concentración de nitrito, para determinar la duración de ambas etapas. El fin de la etapa aeróbica fue determinada en conjunto por la estabilización del pH y la máxima acumulación de nitrito. En el caso de la etapa anóxica, Gee y Kim (2004) monitorearon el aumento en el valor de pH (Ecuación (1.6)), mostrando que cuando el pH permanecía constante, indicaba el fin de la etapa anóxica.

En la presente investigación se determinó la duración de la etapa aeróbica mediante el consumo de carbonato y el seguimiento de la concentración de NAT. Para determinar la duración de la etapa anóxica se monitoreó el aumento del pH.

1.3.3 Efecto de la relación carbono nitrógeno (DQO/N)

Al aplicar NDS, se debe tener en cuenta las interacciones producidas entre bacterias autotróficas y heterotróficas. En general las bacterias heterotróficas se consideran más dominantes que las autotróficas. La presencia de MO puede inhibir la nitrificación, debido principalmente a la competencia por el OD entre autotróficos y heterotróficos (Yun *et al.*, 2004). Sin embargo, la desnitrificación depende de la relación DQO/N. Estudios con NDS en RDRs, han demostrado que con relaciones DQO/N mayores a 1,5, la biomasa heterotrófica domina las capas externas de la biopelícula, mientras que la biomasa autotrófica domina las capas internas de ésta (Okabe *et al.*, 1995).

En esta investigación se aplicaron relaciones DQO/N en el rango comprendido ente 4 y 1, con el fin de observar el efecto en la acumulación de nitrito y en la desnitrificación.

1.3.4 Efecto de la concentración de OD

El efecto de la concentración de OD es más complejo en bacterias desnitrificantes que en nitrificantes, debido a que las bacterias desnitrificantes poseen enzimas que se inactivan en presencia de OD. Munch *et al.* (1996), propuso que cuando se conocen las tasas de nitrificación y desnitrificación, se puede establecer una expresión matemática que indique el valor de OD al cual la nitrificación y desnitrificación presentan las mismas velocidades.

La mayoría de los estudios realizados con NDS están dirigidos a trabajar a bajas concentraciones de OD en la fase aeróbica, de modo de promover la formación de nitrito, que posteriormente es desnitrificado en la fase anóxica (Gee y Kim, 2004; Pynaert *et al.*, 2004; Udert *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004).

Por otro lado, Gee y Kim (2004) demostraron que la alternancia de periodos cortos aeróbicos y anóxicos (2-6 h), no afecta las tasas de oxidación de NAT ni de nitrito, debido a que mayores periodos anóxicos afectan a la actividad de las BNO porque tienen un mayor tiempo de *lag* (retardo) comparado a las BAO. Esto sería una ventaja para promover la nitrificación parcial (Yoo *et al.*, 1999).

1.4. REACTORES DE BIOPELÍCULA (BIOMASA INMOVILIZADA)

Debido al lento crecimiento de las bacterias autotróficas, la inmovilización de biomasa tiene ventajas significativas, comparado a los sistemas suspendidos convencionales (lodos activos), especialmente en mantener una alta concentración de bacterias (Sievers *et al.*, 2003).

La inmovilización consiste en la fijación de microorganismos a un medio o soporte, con el fin de concentrar las bacterias, disminuyendo el espacio requerido para el tratamiento. Una consecuencia de lo anterior es permitir el tratamiento de altas cargas nitrogenadas. Además, la inmovilización provee una resistencia natural a condiciones desfavorables, como cambios bruscos de pH o a la presencia de sustancias inhibitorias. Lo anterior se debe a un efecto de dilución formado por un gradiente de concentración en los distintos estratos de la biopelícula (Halling-Sorensen y Jorensen, 1993).

Un ejemplo de este tipo de reactores son los reactores de discos rotatorios (RDR), que consisten esencialmente en un set de discos montados en un eje horizontal que rotan, donde la biomasa se encuentra adherida a la superfice de los discos. Este tipo de reactor permite obtener un alta concentración de biomasa por m^2 (Lindemann y Wiesmann, 2000). Además, cuando se trabajan parcialmente sumergidos, no requieren aireación.

En este tipo de reactores, la rotación del disco genera una película de líquido en la superficie de cada disco. Si el disco se encuentra parcialmente sumergido, la rotación expone la película al aire, produciendo una difusión molecular del OD al interior de la biopelícula. Con la difusión de sustratos hacia el interior de la biopelícula sucede el mismo fenómeno.

Bajo ciertas condiciones, los factores difusionales pueden predominar por sobre los cinéticos (Antileo *et al.*, 2003). Esto se debe a que la biopelícula ofrece una resistencia al transporte de OD, sustrato y metabolitos. Schramm *et al.* (1997) mostraron que el OD en biopelículas nitrificantes es restringido a los primeros 2 μm.

Los parámetros que controlan la transferencia de masa en los reactores de biomasa inmovilizada, son los coeficientes de transferencia de masa k_L y k_La (h^{-1}). Estudios relacionados con el efecto de la velocidad de rotación del disco, indican que la rotación es directamente proporcional al aumento de la tasa de nitrificación (Boller *et al.*, 1994).

Las resistencias difusionales que presentan los reactores de biopelícula, se transforman en una ventaja en sistemas con NDS operados en modalidad SBR, ya que permiten trabajar en

condiciones limitantes de OD en el interior de la biopelícula, donde el nitrato o nitrito producido en las capas externas de la biopelícula (nitrificación), difunden hacia las capas internas para ser desnitrificados (Gieseke *et al.*, 2001).

Pynaert *et al*. (2004) propusieron un procedimiento para la puesta en marcha de un RDR con la modalidad OLAND (*Oxygen-Limited Autotrophic Nitrification-Denitrification*). Éste se basó en la adición secuencial de dos tipos de inóculos: bacterias autotróficas nitrificantes y lodo metanogénico granular. La primera es una fuente de BAO y la segunda como una posible fuente de bacterias Anammox y bacterias desnitrificantes. La biopelícula nitrificante sirvió como matriz para la inmovilización de bacterias anaeróbicas. Con este procedimiento lograron una remoción total de nitrógeno de 250 mg N/L/d por 100 días en forma estable.

En este trabajo se utilizó como inóculo una mezcla de bacterias nitrificantes y heterotróficas.

Por otro lado, el comportamiento de la nitrificación frente a la variación de los sustratos y el pH no es lineal (Antileo *et al.*, 2003), por lo tanto, la creación de modelos que interpreten la dinámica del proceso frente a cambios del medio, es una herramienta que permite formular estrategias de operación, destinadas a acumular nitrito en forma estable. La modelación de la acumulación de nitrito ha sido poco estudiada, y menos aún la utilización de ésta como una herramienta para diseñar condiciones de operación. Existen trabajos como los de Picioreanu *et al*. (1997), quienes propusieron un modelo para describir el efecto de la concentración de OD en la acumulación de nitrito en un reactor air-lift. El modelo predijo que el OD es la herramienta de control más eficaz para acumular nitrito en este tipo de reactores.

Antileo *et al*. (2007), propusieron un modelo para un RDR totalmente sumergido, el cual ha sido desarrollado en base a la consideración de todos los aspectos cinéticos de inhibición (competitiva, por sustrato) y limitaciones por sustrato. Además, el modelo considera todos los aspectos difusionales de transporte de masa en las interfases gas-líquido, líquido-biopelícula y difusión al interior de la biopelícula.

En este trabajo se compararon datos empíricos con los entregados por un modelo desarrollado por Antileo *et al*. (2007), el cual pretende ser incorporado en un control supervisor del proceso de nitrificación para un reactor de biopelícula (Azócar *et al.*, 2007).

1.5. ALCANCE DE LA TESIS

En esta tesis pueden ser distinguidos 3 tópicos: A) Cinética bacteriana; B) Nitrificación en reactor de biopelícula operado en modo SBR y modo continuo, y C) Remoción global de nitrógeno. Estos tópicos están enfocados principalmente a la aplicación de una remoción global de nitrógeno vía nitrito y al uso de un control y monitoreo avanzado del proceso.

En **Capítulo I** se hace un análisis general de la problemática del nitrógeno y de los procesos biológicos para eliminarlo. En el **Capítulo II** se detalla la metodología necesaria para la realización de esta Tesis. En el **Capítulo III** se estudió la cinética de las bacterias nitrificantes, desde un punto de vista práctico, con posibles aplicaciones industriales. Se hace una descripción en detalle de la posibilidad de aplicar ensayos de respirometría y titulación, al estudio segregado de las BAO y BNO. En el **Capítulo IV** se estudia la incorporación de herramientas matemáticas, tendientes a mejorar la eficiencia de la nitrificación parcial en una operación SBR. En el **Capítulo V** se hace una comparación entre una operación continua tradicional y una operación SBR mejorada, en cuanto a la estabilidad de la nitrificación parcial y a la velocidad del proceso biológico. Además, se discute la aplicación un modelo matemático, concebido para simular la nitrificación parcial operada en continuo. En el **Capítulo VI** se discute la aplicación de los resultados anteriores en un proceso global de remoción de nitrógeno (nitrificación-desnitrificación), estudiando además las interrelaciones producidas en el proceso global al modificar la relación DQO/N y concentración de OD. Finalmente, en el **Capítulo VII** se hace una discusión general de los resultados obtenidos.

1.6 HIPÓTESIS

En base a los antecedentes entregados, se plantearon las siguientes Hipótesis:

1. La aplicación de herramientas matemáticas permitirá la búsqueda de rangos óptimos de operación para la nitrificación vía nitrito.

2. Controlar la concentración de amoníaco en el reactor permitirá incrementar la actividad de las bacterias amonio oxidantes por sobre las bacterias nitrito oxidantes.

3. Debido a que la nitrificación ocurre en presencia de OD y la desnitrificación en condiciones anóxicas, un reactor de biomasa inmovilizada, alimentado con una fuente de amonio y carbono (orgánico), operado bajo la modalidad de sistemas secuenciados de condiciones aerobias y anóxicas, permitirá la creación de un sistema intensivo de tratamiento de aguas residuales, para transformar NH_4^+ a N_2 en un solo reactor.

1.7 OBJETIVOS

Para esta tesis doctoral se plantearon los siguientes Objetivos:

1.7.1 Objetivo General

Estudiar la remoción biológica de nitrógeno vía nitrito en reactores de biopelícula del tipo discos rotatorios bajo dos modalidades de operación: continua y secuenciada.

1.7.2 Objetivos Específicos

Reactor nitrificante:

1. Diseñar estrategias para la obtención de parámetros cinéticos de las bacterias nitrificantes, en reactores operados en modalidad secuencial.
2. Obtener una biopelícula nitrificante para la acumulación de nitrito en un reactor de discos rotatorios.
3. Validar experimentalmente un modelo matemático para simular la nitrificación vía nitrito en un RDR nitrificante.

Reactor nitrificante-desnitrificante:

1. Obtener una biopelícula nitrificante-desnitrificante en un reactor de discos rotatorios secuencial.
2. Desarrollar una modalidad de operación para determinar la duración de los periodos aeróbico y anóxico en un reactor de discos rotatorios secuencial.
3. Evaluar el efecto de la relación carbono/nitrógeno sobre la acumulación de nitrito en un reactor de discos rotatorios secuencial.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA

La metodología analítica se realizó de acuerdo a metodología estandarizada (APHA, 1992).

2.1.1 Determinación de nitrógeno nitrito ($N\text{-}NO_2^-$)

Principios del método

El nitrito ($N\text{-}NO_2^-$) se determina por la formación de un colorante azo púrpura rojizo, producido de pH 2,0 a 2,5 por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED). El rango de aplicación del método para medidas espectrofotométricas es de 10 a 1000 μg de $N\text{-}NO_2^-$ /L, y se puede aplicar al de 5 a 50 μg de N/L si se usan un recorrido de luz de 5 cm y filtro de color verde. El sistema de color obedece a la ley de Beer hasta 180 μg N/L con 1 cm de recorrido de luz a 543 nm. Diluyendo las muestras se puede determinar concentraciones más altas de $N\text{-}NO_2^-$.

Procedimiento

- Eliminación de sólidos suspendidos, si la muestra los presenta, a través de un filtro de membrana de 0,45 μm de diámetro de poro.
- Desarrollo del color; si el pH de la muestra no estuviera comprendido entre 5 y 9, se ajusta a ese valor con HCl 1 N o NH_4OH. Se añaden 2 mL de reactivo de color a 50,0 mL de muestra a una porción diluida a 50 mL y se mezcla.
- Medición de la absorbancia a 543 nm, entre 10 minutos y 2 horas después de añadir el reactivo de color a las muestras y patrones.

Cálculos

Se prepara una curva patrón comparando la absorbancia de los patrones con la concentración de $N\text{-}NO_2^-$. Se calcula la concentración de la muestra por regresión lineal a partir de la curva patrón.

2.1.2 Determinación de nitrógeno nitrato ($N\text{-}NO_3^-$)

Principio del método

La determinación de nitrato se basa en la absorbancia que este compuesto presenta a 220 nm. Debido a que en general la MO también absorbe a 220 nm, se debe realizar una segunda determinación a 275 nm. A esta longitud de onda absorbe la MO pero no el nitrato. De este modo se relaciona la concentración de nitrato versus la recta de absorbancia a 275 y 220 nm determinada a partir de la solución patrón de nitrato.

Procedimiento

Se prepara la muestra con una dilución conocida, se agita y se verte en cubetas de cuarzo. Posteriormente se lee en el espectrofotómetro la absorbancia a 220 nm y se resta la absorbancia a 275 nm.

Cálculos

Debido a la interferencia que causa el nitrito en la medición del nitrato, se utilizó una curva de calibrado para el nitrito, que permite obtener la relación de absorbancia entre ambas especies nitrogenadas.

En función de lo anterior, la ecuación para el cálculo de nitrógeno nitrato, considerando la interferencia de nitrito, es la que se muestra a continuación:

$$N - NO_3^- = \frac{(Abs_{NO_2^- + NO_3^-} - Abs_{NO_2^-})}{A} + B \qquad (2.1)$$

Donde:

$N - NO_3^-$: Concentración de nitrógeno como nitrato.

$Abs_{NO_2^- + NO_3^-}$: Absorbancia de nitrito + nitrato leída a 220 – 275 nm.

$Abs_{NO_2^-}$: Absorbancia del nitrito calculada a partir de su concentración.

A : Pendiente de la recta de la curva de calibrado del nitrato.

B : Intercepto de la recta de la curva de calibrado del nitrato

2.1.3 Determinación de nitrógeno amoniacal total ($N\text{-}NH_4^+$)

Principios del método

El nitrógeno total amoniacal se mide llevando la muestra sin destilar o destilada a pH básico**,** esto con la finalidad de permitir la difusión del amoníaco a través de la membrana del electrodo selectivo y determinar la concentración con la ayuda de un potenciómetro.

Procedimiento

- A partir de la solución patrón de nitrógeno amoniacal, se prepara por dilución una serie de estándares cubriendo el rango de concentración esperada para la muestra.
- Se transfieren 100 mL de cada solución estándar a un matraz de 150 mL, se sumerge el electrodo en la solución estándar de menor concentración y se agita con la ayuda de un agitador magnético. Se debe mantener la misma temperatura de trabajo (alrededor de 25ºC) y una velocidad de agitación suave para minimizar posibles pérdidas de amoníaco de las soluciones.
- Se agrega 1 mL de NaOH 10 N o un volumen suficiente de esta solución para obtener un pH sobre 11. Si hay presencia de plata o mercurio, se recomienda utilizar la solución de NaOH/EDTA. Se debe utilizar la misma solución y el mismo volumen en todos los estándares y muestras.
- Hay que mantener el electrodo sumergido hasta obtener una lectura estable en ± 0,1 mV (al menos por 2 min a 3 min).

Luego se realiza una regresión del logaritmo negativo de la concentración versus el potencial en mV.

- Para la determinación de nitrógeno amoniacal en las muestras, se toma una alícuota de 100 mL de muestra declorada y se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente pero ahora interpolando la lectura en mV obtenida en la curva de calibración confeccionada.

Cálculos

La concentración puede ser determinada ya sea por:

a) Interpolación en la curva de calibración

$$N - NH_4^+ (mg / L) = 10^{-A} \cdot B \qquad (2.2)$$

En que:

A: valor obtenido desde la curva de calibración al interpolar el potencial medido;

B: factor de dilución.

O bien por:

b) Medición directa en unidades de concentración (mg/L)

2.1.4 pH

La medición del pH fue realizada a través de un electrodo y de un equipo Hach EC 310.

2.1.5 Temperatura

La temperatura del reactor fue medida con el mismo equipo de medición de pH.

2.1.6 Concentración de OD

La medición del OD se realizó mediante un electrodo WTW Oxi 171.

2.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS *

En orden de caracterizar y determinar cambios tanto en la distribución y morfología bacteriana de BAO y BNO, se realizaron análisis moleculares a la biomasa.

Para el RBBS se tomaron muestras líquidas, en el caso del RDR1 se tomaron secciones de biopelícula de 2x2 cm.

*Todos los análisis microbiológicos fueron realizados en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, a cargo del Dr. Homero Urrutia.

2.2.1 Extracción de ARNr 16s

La comunidad bacteriana fue recolectada por centrifugación de la muestra a 9300 r.p.m. por 5 min. Posteriormente, el *pellet* obtenido fue lavado en buffer PBS (120 mM NaCl y 2,7 mM KCl en 10 mM de buffer fosfato a pH 7,6). Todas las muestras fueron procesadas usando un método de extracción, basado en la lisis bacteriana en presencia de dietilpirocarbonato (DEPC) (Summers, 1970). Todas las soluciones usadas para la extracción de ARNr total e hibridación, fueron tratadas con DEPC para inhibir la actividad ARNasa (Sambrook *et al.*, 1989). La concentración final del extracto de ARNr, fue determinada por espectrofotometría a 260 nm (Ausbel *et al.*, 1998).

2.2.2 Visualización del ARNr 16s, hibridación *dot-blot* y cuantificación

La hibridación se realizó usando sondas específicas para el ARNr 16s. Las sondas NSO190 y NSO1225, se usaron para reconocer a la subclase β de la Clase Proteobacterias, pertenecientes al grupo BAO (Okabe *et al.*, 1999b). Las sondas NIT3 (para *Nitrobacter*), NTSPA 689 y NTSPA 1026 (para Nitrospira), se usaron para reconocer a la subclase α de la Clase Proteobacterias, pertenecientes al grupo BNO (Mobarry *et al.*, 1996; Okabe *et al.*, 1999a). La sonda EUB338 (Amann *et al.*, 1990), se consideró como señal total (ARNr total extraído de las muestras). La concentración de ARNr, calculada para cada muestra hibridada, se expresó en porcentaje con respecto al total (Raskin *et al.*, 1994). Todas las sondas fueron detectadas por una reacción quimioluminiscente entre la fosfatasa alcalina y su substrato CSPD. La señal de hibridación (SH) producida por esta reacción luminiscente fue detectada en un film sensible a la fluorescencia (ECL *hyperfilm*).

El film que detectó la señal de hibridación (SH), se digitalizó en escala de grises y fue procesado para el análisis de imágenes. Cada SH fue estimada de acuerdo a la escala de grises, usando el programa *Quantity One* (Bio-Rad, versión 4.2). Este programa transformó automáticamente la escala de grises de cada SH en concentración de ARN. Esto se realizó usando una curva de calibración, construida con las diluciones seriadas de concentraciones conocidas de ARNr 16s de *Escherichia coli*, las cuales fueron hibridadas con la sonda EUB338 (Ausbel *et al.*, 1998; Sambrook *et al.*, 1989).

El porcentaje de BAO se calculó como el máximo valor detectado por NS0190 o NSO1225, ya que reconocen a especies del mismo género *Nitrosomonas* sp., y NSO1225 reconoce además a

Gallionella ferruginea. El porcentaje de BNO correspondió a lo cuantificado por NIT3 más lo máximo detectado por NTSPA685 o NTSPA1026, ya que NIT3 reconoce al género *Nitrobacter* sp, la sonda NTSPA685 reconoce a las bacterias *Nitrospira sp*. (*N. marina* y *N. moscoviensis*) y la sonda NTSPA1026 reconoce solo a la especie del mismo género *Nitrospira moscoviensis*.

2.2.3 Microscopía de epifluorescencia

Se realizó un recuento total de células por epifluorescencia, de acuerdo a Hobbie *et al*. (1977). Las muestras fueron fijadas en formalina al 3%, luego fueron teñidas usando naranja de acridina al 1%. Posteriormente, las muestras fueron filtradas al vacío, a través de un filtro de policarbonato negro de 3,4 mm de diámetro y 0,2 μm de poro.

Los filtros de policarbonato negro fueron observados con un aumento de 1000X en un microscopio de fluorescencia (Zeiss AxiosKop 2 plus) y se contaron 10 campos como mínimo, que contenían entre 30 y 150 células por campo.

2.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras fueron fijadas en una solución de 5% de glutaraldehido, preparado en buffer cacodilato de sodio (0,067 M, pH = 6,2), según lo descrito por Ladd y Costerton (1990). Finalmente, las muestras fueron observadas en un microscopio ETEC (ETEC *Corporation, Autoscan*) y se tomaron 2 fotografías por muestra. Un mínimo de 10 campos fueron observados.

2.3 REACTORES

2.3.1 Reactor respirométrico-titulométrico batch de biomasa suspendida (RBBS)

La Figura 2.1 ilustra el esquema del reactor. Se utilizó un reactor *batch* de biomasa suspendida de 2,4 L construido en acrílico transparente, el cual fue llenado y sellado completamente. El reactor se mantuvo homogeneizado por un agitador mecánico (HEIDOLPH, RSR 2050, Germany), a 360 r.p.m. La temperatura (T) se mantuvo en 20ºC, mediante una camisa conectada a un termostato (Julabo, Modelo EC, Germany). La transmisión de T/pH y OD, se realizó con dos electrodos, HACH (EC 310, USA) y WTW (Oxi 701, Germany), respectivamente. El pH se controló en un valor de 8,0, mediante la adición de Na_2CO_3 0,2 M, con una bomba de membrana (LANG, *type* ELADOS EMP II, 41 L/h, Germany). La aireación fue suministrada, a través de aireadores de pecera con un flujo máximo de 5 L/min (COSMOS double type 1000, China) y fue regulada por una válvula electromagnética (Festo, 457, MSG-24DC, Germany).

La Figura 2.1 ilustra también el sistema de control del reactor. El sistema fue automatizado a través de un PLC (*Programmable Logic Controller*) (Siemens, Simatic S7-200), operado con una interfase PC/PLC programada en Mathlab 6.5. La temperatura, pH, consumo de solución de Na_2CO_3 y concentración de OD, fueron medidos y registrados en línea, aproximadamente cada dos segundos, por el programa de adquisición de datos KepServer.

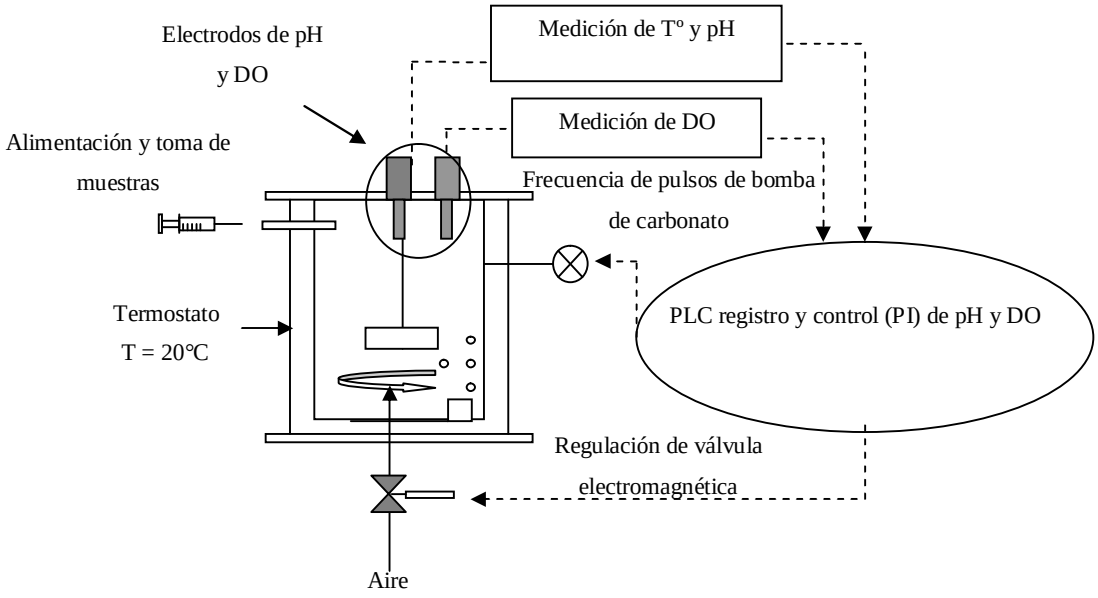

Figura 2.1. Instrumentación y control del RBBS

2.3.2 Reactores de discos rotatorios RDR1 y RDR2

Tanto el RDR1 como el RDR2 fueron de las mismas características. La instrumentación y sistema de control, son esquematizados en la Figura 2.2. Cada reactor consistió de un disco simple de 35,4 cm de diámetro, con un área específica de 35 m^2/m^3.

Con el fin de evitar entradas exógenas de aire durante la operación, el disco se operó completamente sumergido, en un volumen de reacción de 8 L. El disco fue cubierto con un material textil, que actuó como soporte para la biomasa y que incrementó la superficie en un factor de 2,4 (Figura 2.3).

El disco fue rotado por un motor externo a 3 r.p.m. La temperatura se mantuvo alrededor de 20 ºC a través de un baño termoregulado (Julabo, Model EC, Alemania).

El sistema de monitoreo y control se realizó del mismo modo que en el RBBS.

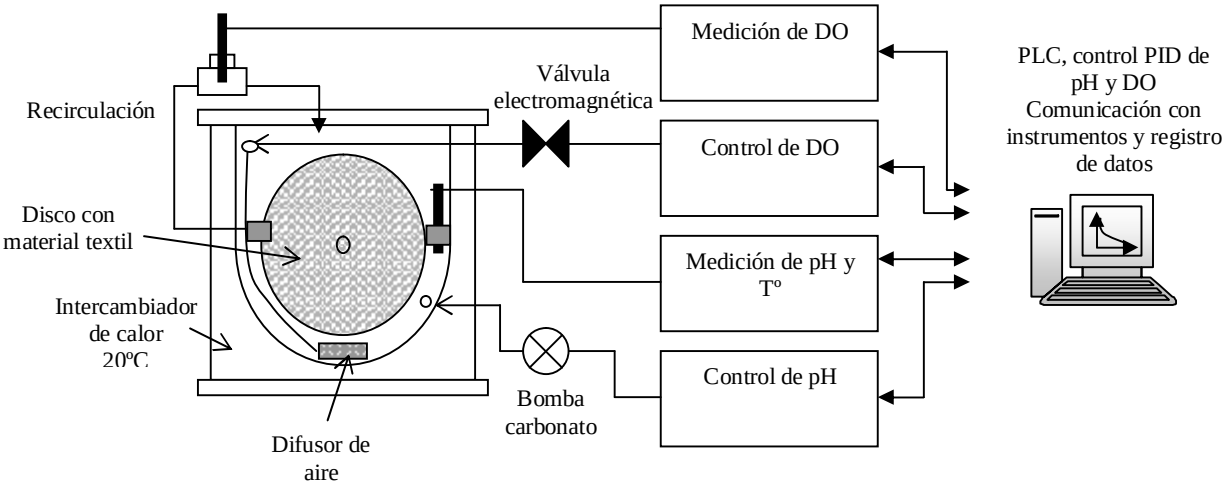

Figura 2.2. Instrumentación y control de los reactores de discos rotatorios RDR1 y RDR2

Figura 2.3. Material textil de soporte de 35 m^2/m^3 de área específica

2.4 SENSOR VIRTUAL DE NAT

Esta metodología se desarrolló solo para ser aplicada en una operación SBR y permitió un monitoreo en línea de la concentración de NAT (Antileo *et al.*, 2006).

Producto de la actividad de las BAO en la oxidación del amonio se liberan protones que acidifican el medio. Por lo tanto, el consumo de una solución de carbonato para el control del pH, es proporcional a la oxidación de amonio (Ecuaciones (2.3-2.6)). Para el control del pH se definió un coeficiente de rendimiento $Y^*_{CO3/NAT,}$ entre el consumo de carbonato y el consumo de amonio.

$$NH_4^+ + 1{,}5O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O \quad (2.3)$$

$$CO_3^{2-} + H^+ \leftrightarrow HCO_3^- \quad (2.4)$$

$$HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow CO_2 + H_2O \quad (2.5)$$

$$NH_4^+ + 1{,}5O_2 + CO_3^{2-} \Rightarrow NO_2^- + 2H_2O + CO_2 \quad (2.6)$$

El método para el cálculo de NAT (Ecuación (2.7)), se definió en función del número de pulsos entregados por la bomba de carbonato (Ns), equivalentes al volumen de la solución de carbonato (Vs) entregado al reactor durante un pulso, y la concentración inicial de NAT_0 de cada ciclo.

$$NAT = \frac{NAT_0 \cdot V_R - \dfrac{N_S \cdot V_S \cdot c_C \cdot 14 gN/mol}{Y^*_{CO_3^{2-}/NH_4^+}}}{V_R} \quad (2.7)$$

Al final de cada ciclo, $Y^*_{CO3/NAT}$ fue calculado experimentalmente para ser utilizado en el ciclo siguiente.

El programa computacional del sensor virtual de NATse incluye en el Anexo A3.

2.5 CÁLCULOS

2.5.1 Grado de acumulación de nitrito

Éste se expresó en porcentaje (%), y se calculó como se muestra en la Ecuación (2.8).

$$\%\ acumulación\ \ NO_2^- = \frac{\left[N - NO_2^-\right]}{\left[N - NO_2^-\right] + \left[N - NO_3^-\right]} \cdot 100 \qquad (2.8)$$

Para el caso de la operación SBR, se consideró solo la concentración final de nitrito, en el caso de la operación continua, la de salida.

2.5.2 Grado de oxidación de NAT

Éste se expresó en porcentaje (%), y se calculó como se muestra en la Ecuación (2.9).

$$\%\ oxidación\ \ NAT = \frac{\left[NAT_0\right] - \left[NAT_F\right]}{\left[NAT_0\right]} \cdot 100 \qquad (2.9)$$

2.5.3 Tasa de oxidación de NAT

Ésta se calculó de la pendiente de la concentración de NAT en función del tiempo durante un ciclo batch para la operación SBR, y de las concentraciones de entrada/salida de NAT y el TRH, para la operación continua (Ecuación (2.10)).

$$r_{NAT} = \frac{\left[NAT_0\right] - \left[NAT_F\right]}{\Delta t} \qquad (2.10)$$

2.6 PLAN DE TRABAJO

A continuación se muestran las etapas y actividades realizadas en esta tesis:

2.6.1 Operación del reactor batch de biomasa suspendida, RBBS

A) Diseño de experimentos para la determinación de parámetros cinéticos de las BAO y BNO

- Diseño de experimentos
- Inoculación del RBBS con biomasa nitrificante previamente operada en condiciones sin limitación de OD y de sustrato
- Ensayos respirométricos para la determinación de K'_{BAO}, K'_{BNO} y Ks_{BNO}
- Ensayos titulométricos para la determinación de Ks_{BAO}
- Redacción de artículo

2.6.2 Operación del reactor de discos rotatorios nitrificante, RDR1

A) Formación de una biopelícula de biomasa nitrificante en el RDR1

- Inoculación de reactor RDR1 con biomasa nitrificante
- Operación SBR del RDR1 a 3 r.p.m 150 mg $N\text{-}NH_4^+$/L, 1,0 mg O_2/L y a pH 7,5.
- Implementación de sensor virtual de NAT
- Implementación de control supervisor de pH
- Operación de ciclos SBR a 0,6 mg O_2/L con control supervisor de pH
- Operación de ciclos SBR a 0,8 mg O_2/L con control supervisor de pH
- Operación de ciclos SBR a 1,0 mg O_2/L con control supervisor de pH
- Operación de ciclos SBR a 5,0 mg O_2/L con control supervisor de pH
- Operación de ciclos SBR a 1,0 mg O_2/L con pH constante de 7,5
- Operación de ciclos SBR a 5,0 mg O_2/L con pH constante de 8,5
- Redacción de artículo

B) Validación experimental de un modelo matemático para simular la nitrificación parcial en un RDR operado en continuo

- Operación continua del RDR1 con un TRH de 12 horas, pH constante de 7,5 y 0,6 mg O_2/L
- Operación continua del RDR1 con un TRH de 12 horas, pH constante de 7,5 y 1,0 mg O_2/L
- Operación continua del RDR1 con un TRH de 12 horas, pH constante de 7,5 y 2,0 mg O_2/L
- Operación continua del RDR1 con un TRH de 12 horas, pH constante de 7,5 y 5,0 mg O_2/L
- Operación continua del RDR1 con un TRH de 12 horas, pH constante de 8,5 y 0,6 mg O_2/L
- Operación continua del RDR1 con un TRH de 12 horas, pH constante de 8,5 y 1,0 mg O_2/L
- Operación continua del RDR1 con un TRH de 12 horas, pH constante de 8,5 y 2,0 mg O_2/L
- Operación continua del RDR1 con un TRH de 12 horas, pH constante de 8,5 y 5,0 mg O_2/L
- Simulación del proceso y comparación con datos experimentales
- Redacción de artículo

2.6.3 Operación de reactor de discos rotatorios nitrificante desnitrificante RDR2

A) Formación de una biopelícula de biomasa nitrificante desnitrificante en el RDR2

- Selección de inóculo de bacterias nitrificantes y heterotróficas
- Estudios en reactor batch de biomasa suspendida
- Inoculación del RDR2
- Operación SBR del RDR2 a C/N de 4 mg DQO/mg N, 50 mg N-NH_4^+/L

B) Desarrollo de herramientas para determinar en tiempo real la duración de la etapa aeróbica y etapa anóxica del RDR2

- Implementación del sensor virtual de NAT para determinar la duración de la etapa aeróbica
- Implementación del monitoreo del cambio de la pendiente de ascenso del pH para determinar la duración de la etapa anóxica

C) Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno en la operación de RDR2

- Operación SBR del RDR2 a pH 7,5, 150 mg N-NH_4^+/L y 1,5 mg O_2/L en la etapa aeróbica y C/N 2 en la etapa anóxica
- Operación SBR del RDR2 a pH 7,5, 150 mg N-NH_4^+/L y 1,5 mg O_2/L en la etapa aeróbica y C/N 3 en la etapa anóxica
- Operación SBR del RDR2 a pH 7,5, 150 mg N-NH_4^+/L y 1,5 mg O_2/L en la etapa aeróbica y C/N 4 en la etapa anóxica
- Operación SBR del RDR2 a pH 7,5, 150 mg N-NH_4^+/L y 2,0 mg O_2/L en la etapa aeróbica y C/N 2 en la etapa anóxica
- Operación SBR del RDR2 a pH 7,5, 150 mg N-NH_4^+/L y 2,0 mg O_2/L en la etapa aeróbica y C/N 3 en la etapa anóxica
- Operación SBR del RDR2 a pH 7,5, 150 mg N-NH_4^+/L y 2,0 mg O_2/L en la etapa aeróbica y C/N 4 en la etapa anóxica
- Redacción de artículo

CAPÍTULO III. ESTUDIOS CINÉTICOS

Capítulo basado en artículo publicado:

Ciudad, G., Werner, A., Bornhardt, C., Muñoz, C., and Antileo, C. (2006) Differential kinetics of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification. Process Biochemistry, **41**(8), 1764-1772.

3.1. RESUMEN

Uno de los mayores inconvenientes del cálculo de constantes cinéticas en el proceso de nitrificación, es la diferenciación cinética de las dos poblaciones microbianas que participan: bacterias amonio oxidantes (BAO) y bacterias nitrito oxidantes (BNO).

Para el caso de este estudio, las bacterias nitrificantes se pueden diferenciar en dos aspectos: a) afinidad por el oxígeno: las BNO son más sensibles a bajas concentraciones de oxígeno que las BAO y b) producción de protones: esto sólo ocurre en la reacción de oxidación del amonio a nitrito por parte de las BAO.

Estas propiedades se aplicaron en el diseño de ensayos cortos de respirometría y titulación, mediante los cuales se pudo calcular separadamente para cada población bacteriana, los siguientes parámetros cinéticos: coeficientes de rendimiento $Y_{O_2/S}$, constante de saturación por oxígeno K', tasa máxima de consumo de oxígeno $r'_{máx}$, constante de saturación por sustrato Ks y tasa máxima de consumo de nitrógeno $r_{Nmáx}$.

Dependiendo del ensayo realizado, para minimizar las interferencia de las BNO en la cinética de las BAO, se utilizaron las siguientes condiciones: A) determinación K'_{BAO}: concentraciones de OD < 2,0 mg O_2/L, B) determinación de Ks_{BAO}: monitoreo del requerimiento de una solución de carbonato para mantener pH constante.

Para las BAO se encontró que la constante de saturación de oxígeno (K'_{BAO}), fue de 0,9 mg O_2/L y la constante de saturación por sustrato (Ks_{BAO}) fue de 0,3 mg N-NH_3/L. Para las BNO la constante de saturación de oxígeno (K'_{BNO}) fue de 1,4 mg O_2/L y la constante de saturación de sustrato (Ks_{BNO}) tuvo un valor de $2{,}2 \times 10^{-4}$ mg N-HNO_2/L.

Los ensayos respirométricos y titulométricos demostraron ser un método rápido y sencillo para el cálculo de concentraciones de amonio, nitrito y cinética de la nitrificación, sin necesidad de medir directamente la concentración de sustrato.

3.2. INTRODUCCIÓN

Las bacterias BAO y BNO pertenecen a una misma familia (*Nitrobacteriaceae)*, poseen una fuente de carbono común (CO_2) y son bacterias aeróbicas quimioautolitotróficas. Además, las BNO dependen del producto generado por las BAO (NO_2^-). Por lo tanto, el estudio diferenciado de la cinética de estas bacterias, presenta dificultades debido sus interrelaciones. En la mayoría de los casos, la cinética de la nitrificación se estudia sólo en función de las BAO (Contreras *et al.*, 2001; Ficara *et al.*, 2000; Gernaey *et al.*, 2001).

En aguas residuales urbanas, los estudios cinéticos de nitrificación se hacen habitualmente en función de la nitritación. Esto se debe, a que generalmente la formación de nitrito es vista solo como un paso intermediario en la formación de nitrato. Sin embargo, la aplicación de tratamientos de última generación, como la nitrificación vía nitrito, aplicados a RILes con altas cargas nitrogenadas hacen imposible esta simplificación, debido a que se basan en la inhibición/limitación de las BNO. Por lo tanto, la oxidación de nitrito es la que gobierna la cinética nitrificación (Gernaey *et al.*, 2001; Langergraber *et al.*, 2003).

En función de lo anterior, para el estudio segregado de las poblaciones nitrificantes, algunos autores utilizan inhibidores para suprimir la actividad de BAO o BNO como *allylthiourea* o clorato de sodio, respectivamente (Ficara *et al.*, 2000; Gernaey *et al.*, 1998). Sin embargo, estas técnicas limitan el estudio cinético en reactores continuos, debido al efecto tóxico sobre las bacterias nitrificantes.

En los últimos años, técnicas como la respirometría y la titulación han aportado a la simplificación de los estudios cinéticos de la nitrificación (Vanrolleghem *et al.*, 2004).

La respirometría permite la estimación de parámetros cinéticos de bacterias heterotróficas y autotróficas, mediante la cuantificación e interpretación del consumo de oxígeno (Ficara *et al.*, 2000). Dependiendo de la forma de operación, existen respirómetros batch y continuos.

La respirometría en un reactor completamente cerrado, operado en batch con periodos de aireación intermitente, permite omitir el término del transporte de oxígeno y sustrato del balance de materia (Gernaey *et al.*, 2001). Por lo tanto, es posible plantear una ecuación simplificada para estudiar el proceso, en que la tasa de respiración es consecuencia directa del consumo de sustrato por parte de las bacterias, tal como se muestra en la Ecuación (3.1).

$$\frac{dc'}{dt} = -\frac{m \cdot c_B}{Y_{B/O_2}} \tag{3.1}$$

Donde:

c' = Concentración de OD

c_B = Concentración de bacterias

Y_{B/O_2} = Coeficiente de rendimiento de formación de bacterias por oxígeno consumido

μ = Velocidad de crecimiento específico de las bacterias

(Para mayor detalle, ver capítulo de Nomenclatura)

Debido a que en la nitrificación, el consumo de oxígeno es una consecuencia de la actividad en conjunto de las BAO y BNO, la Ecuación (3.1) se expresa como la Ecuación (3.2).

$$\frac{dc'}{dt} = -\frac{m_{BAO} \cdot c_{BAO}}{Y_{BAO/O_2}} - \frac{m_{BNO} \cdot c_{BNO}}{Y_{BNO/O_2}} \tag{3.2}$$

Estudios han demostrado que las BNO son más sensibles a bajas concentraciones de oxígeno en comparación a BAO, debido a que presentan constantes de saturación de oxígeno K' más altas (Bernet *et al.*, 2001; Garrido *et al.*, 1997b; Laanbroek y Gerards, 1993). Por lo tanto, a bajas concentraciones de oxígeno (< 2 mg O_2/L), las BAO debieran permanecer más activas que las BNO. Esta propiedad podría ser utilizada en experimentos respirométricos, con el fin de determinar la cinética de consumo de oxígeno de las BAO con una influencia mínima de las BNO.

Por otro lado, al aplicar el sensor virtual de NAT basado en la titulometría, se podría determinar la cinética de consumo de sustrato (N) para las BAO.

Lo anterior presenta las siguientes ventajas: a) permite diferenciar la oxidación del NAT de la oxidación del nitrito y b) permite hacer un seguimiento y registro (monitoreo) en línea la concentración de NAT en el reactor.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un procedimiento simple para el cálculo de los parámetros cinéticos K'_{BAO}, K'_{BNO}, Ks_{BAO}, Ks_{BNO}, $Y_{O_2/TAN}$ e $Y_{O_2/N+3}$ de las bacterias nitrificantes, basado en experimentos respirométricos-titulométricos, usando bajas

concentraciones de oxígeno y el monitoreo en línea del consumo de carbonato, como elementos diferenciadores de ambos grupos bacterianos.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para estos experimentos se utilizó el RBBS descrito en el capítulo II.

3.3.1 Sistema de control

Las variables de control en los experimentos respirométricos y titulométricos fueron el pH y el OD, para los cuales se utilizó un control clásico de tipo PI, programado en el PLC. En el control de pH, se reguló la frecuencia de pulsos de carbonato de la bomba de membrana. Cada pulso de carbonato entregado tuvo un volumen constante de 0,125 mL. A través de esta información, se pudo monitorear en línea los moles de carbonato suministrados al reactor.

Para controlar la concentración de OD se reguló la abertura de la válvula electromagnética, usando pulsos con modulación (PWM). Se programaron dos *set point* de OD, un mínimo y un máximo. El sistema de aireación actuó como sigue: alcanzado el *set point* máximo, la válvula se cerraba hasta que el consumo de OD por la acción biológica llegara al *set point* mínimo; posteriormente, la válvula se abría para alcanzar nuevamente el set point máximo. Esta metodología se planteó con el fin de operar el reactor con aireación intermitente, lo que permitió obtener como mínimo 6 repeticiones consecutivas durante un mismo experimento, una por cada caída de oxígeno (el programa de respirometría se muestra en el Anexo A2).

3.3.2 Biomasa nitrificante

Se utilizó biomasa suspendida proveniente de un reactor nitrificante piloto, tipo lodo activo. La concentración de biomasa en el reactor fue aproximadamente de 0,67 g SSV/L.

Para determinar la distribución bacteriana de las poblaciones de BAO y BNO presentes en el reactor usado en este estudio, se realizaron los análisis microbiológicos descritos en el Capítulo II.

3.3.3 Cálculo de parámetros cinéticos de bacterias nitrificantes

Los sustratos de las bacterias BAO y BNO, están en equilibrio químico con las formas iónicas, en función de la temperatura y pH del medio, tal como se muestra en las Ecuaciones (3.3) y (3.4) respectivamente (Wiesmann, 1994).

$$c_{NH_3} = \frac{NAT}{1+\exp\left(\frac{6344}{373+T}\right)\cdot 10^{-pH}} \tag{3.3}$$

$$c_{HNO_2} = \frac{N-NO_2^-}{1+\exp\left(-\frac{2300}{273+T}\right)\cdot 10^{pH}} \tag{3.4}$$

Donde:

NAT = Concentración de nitrógeno amoniacal total

$N\text{-}NO_2^-$ = Concentración total de nitrógeno como nitrito

T = Temperatura

A concentraciones elevadas de sustrato, la cinética de la nitrificación se puede interpretar por medio de la ecuación de Haldane, que da cuenta de la inhibición por sustrato y producto que presentan estas bacterias. Bajas concentraciones de sustrato y oxígeno, permiten estudiar la cinética de la nitrificación usando la cinética de Monod con doble limitancia, dada por la Ecuación (3.5) (Wiesmann, 1994).

$$r = r_{máx} \cdot \frac{c_N}{Ks + c_N} \cdot \frac{c'}{K' + c'} \tag{3.5}$$

Donde:

$$r = \frac{m \cdot c_B}{Y_{B/S}} \tag{3.6}$$

Donde:

Ks = Constante de saturación por sustrato

K' = Constante de saturación por oxígeno

r = Tasa de consumo

Cuando se utiliza un solo componente como limitante, la Ecuación (3.5) se reduce a la Ecuación (3.7).

$$r = r_{máx} \cdot \frac{c}{K + c} \tag{3.7}$$

Donde:

K = Constante de saturación

c = Concentración

Al integrar y linearizar la Ecuación (3.7), se obtiene la Ecuación (3.8), de modo de calcular la constante de saturación K del intercepto y la tasa máxima de consumo ($r_{máx}$) de la pendiente de la gráfica de (c_0- c)/Ln(c_0/ c) v/s t/Ln(c_0/ c) (Schreiner *et al.*, 1999; Wiesmann, 1994).

$$\frac{c_0 - c}{Ln\frac{c_0}{c}} = r_{máx}\frac{t}{Ln\frac{c_0}{c}} - K \tag{3.8}$$

Donde:

c_0 = Concentración a tiempo cero

t = Tiempo

Al utilizar separadamente el sustrato y el oxígeno como componente limitante, se pudo aplicar la Ecuación (3.8) en función de cada uno de ellos.

3.3.4 Protocolo experimental

Operación del reactor

Previo a cada experimento, la biomasa fue lavada con agua, de modo de eliminar cualquier sustrato remanente que afectara el resultado final. Posteriormente, la biomasa se aireó y se dejó en reposo por 1 ó 2 h, para garantizar el desarrollo de una fase de consumo de oxígeno sin la presencia de sustrato (respiración endógena).

En cada experimento se tomó una muestra inicial, intermedia y final. La inyección de sustrato y toma de muestra, se realizó en el reactor por una entrada especialmente diseñada con una goma flexible, que permitió el ingreso de la aguja de una jeringa e impidió la entrada de aire externo (Figura 2.1). Para la toma de muestras y el cálculo de las fracciones de nitrógeno (NAT, $N\text{-}NO_2^-$ y $N\text{-}NO_3^-$), se utilizó metodología experimental estandarizada (APHA, 1992), descrita en el Capítulo II.

Los experimentos respirométricos fueron realizados en modalidad batch. Cada experimento respirométrico se dividió en 5 etapas, tal como se muestra en la Figura 3.1: A) inoculación del reactor con la biomasa previamente lavada, B) aireación hasta superar el *set poin*t máximo, C) corte de la aireación e inicio de fase de respiración endógena, D) inyección de sustrato e inicio de la reacción y E) aplicación de aireación intermitente, medición y evaluación del consumo de oxígeno en el tiempo. Los experimentos titulométricos tuvieron las mismas etapas que los respirométricos, pero adicionalmente se monitoreó en línea el volumen gastado de Na_2CO_3, para mantener el pH constante.

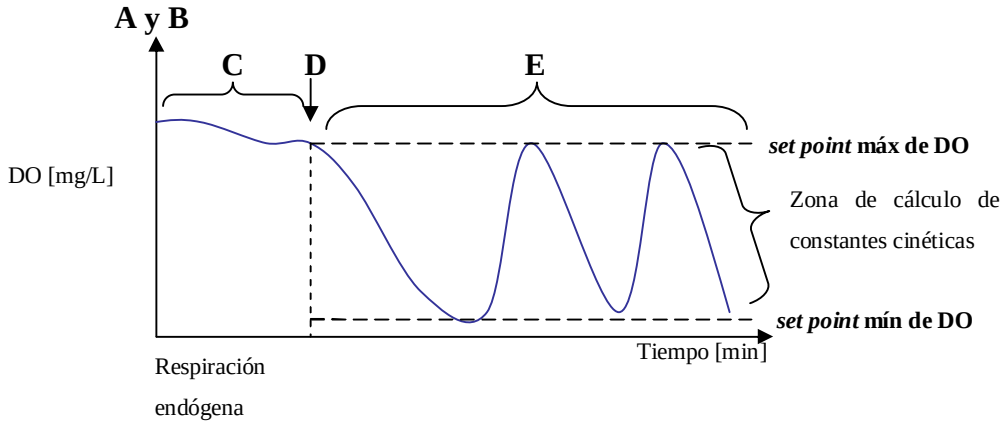

Figura 3.1. Control de la aireación durante los experimentos cinéticos: A) inoculación, B) aireación, C) respiración endógena, D) inyección de sustrato y E) aireación intermitente

Corrección por respiración endógena

Debido a que los resultados experimentales de los ensayos respirométricos deben ser solo consecuencia del consumo de sustrato inyectado, se debió restar la interferencia de la tasa de respiración endógena a la tasa de respiración medida experimentalmente

La tasa de respiración debida exclusivamente al consumo de sustrato, o respiración exógena (r'), se calculó como la diferencia de la tasa de respiración medida (r'_M), menos la tasa de respiración endógena(r'_E) (Ecuación (3.9)) (Ficara *et al.*, 2000; Schreiner *et al.*, 1999).

$$r' = r'_M - r'_E \tag{3.9}$$

La tasa de respiración endógena se calculó como la pendiente de la curva de consumo de OD, mostrada en la primera sección de la Figura 3.1, y fue normalizada a través de la división por los gramos de biomasa presentes. La tasa de respiración endógena además fue utilizada para corregir el consumo de OD, mediante la Ecuación (3.10)

$$c' = c'_M - r'_E \cdot t \tag{3.10}$$

Procedimiento para el cálculo diferenciado de las constantes cinéticas de las bacterias nitrificantes

A) Obtención de coeficientes de rendimiento $Y_{O_2/S}$

El experimento se basó en medir la cantidad estequiométrica de OD requerida para oxidar el amonio a nitrito y el nitrito a nitrato.

Este experimento se realizó con un ensayo respirométrico, donde se registró el consumo de OD en el tiempo y se midió la concentración de NAT y nitrito, a través de la toma de muestras. Para el cálculo de los coeficientes de rendimiento de oxígeno consumido por sustrato oxidado ($Y_{O_2/S}$), se utilizó la Ecuación (3.11).

$$Y_{O2/s} = \frac{\left(c'_{,n} - c'_{,n+1}\right) - r'_E \cdot t}{c_{N,n} - c_{N,n+1}} \tag{3.11}$$

Donde:

Subíndice n y n+1, indican las muestras tomadas.

Con el fin de disminuir los tiempos de experimentación, se utilizaron bajas concentraciones de sustrato y altas concentraciones de OD (Schreiner *et al.*, 1999).

Primero se determinó el coeficiente global de rendimiento de oxígeno consumido por nitrógeno oxidado ($Y_{O_2/N}$), para lo cuál se utilizó una concentración inicial de 1,4 mg N/L de NAT. La concentración inicial de OD se programó en 8,0 mg O_2/L.

Para la determinación de $Y_{O_2/N-NO_2^-}$, se utilizó una concentración inicial de 6,0 mg N/L de nitrito. Los set-point mínimo y máximo, programados para el control de la concentración de OD, fueron: mínimo de 0,1 y máximo de 8,0 mg O_2/L.

Dado que el coeficiente global de rendimiento considera la suma de las actividades de las BAO y las BNO, el coeficiente de rendimiento $Y_{O_2/TAN}$, se calculó según la Ecuación (3.12).

$$Y_{O_2/TAN} = Y_{O_2/N} - Y_{O_2/N-NO_2^-} \tag{3.12}$$

B) Determinación de K'_{BAO} y $r'_{máx, BAO}$

El experimento se basó en minimizar la interferencia de las BNO en la cinética de las BAO. Esto se realizó mediante la utilización de concentraciones de OD inferiores a 2,0 mg O_2/L. Además, se utilizaron concentraciones de amoníaco no limitantes, con el fin de aplicar la Ecuación (3.8), únicamente en función de la concentración de OD (Ecuación (3.13)), donde se calculó K'_{BAO} del intercepto y $r'_{máx, BAO}$ de la pendiente.

$$\frac{c'_0 - c'}{Ln\frac{c'_0}{c'}} = r'_{max}\frac{t}{Ln\frac{c'_0}{c'}} - K' \qquad (3.13)$$

La experiencia se realizó con un ensayo respirométrico, utilizando una concentración inicial de sustrato de 4,4 mg N-NH_3/L, valor óptimo para las BAO según cinética de Haldane (Wiesmann, 1994). Los set-point mínimo y máximo programados para el control de la concentración de OD, fueron: mínimo de 0,1 y máximo de 2,0 mg O_2/L.

Para comprobar efectivamente la baja actividad de las BNO, se midió la concentración inicial y final de nitrato.

C) Determinación de K'_{BNO} y $r'_{máx, BNO}$

El experimento se basó en utilizar concentraciones de ácido nitroso no limitantes y concentraciones de OD limitantes. La finalidad fue aplicar la Ecuación (3.8) únicamente en función de la concentración de OD (Ecuación (3.13)), donde K'_{BNO} se calculó del intercepto y $r'_{max, BNO}$ de la pendiente.

La experiencia se realizó con un ensayo respirométrico, usando una concentración inicial de sustrato de $3{,}3 \times 10^{-3}$ mg N-HNO_2/L, valor óptimo para las BNO según cinética de Haldane (Wiesmann, 1994). Los set-point mínimo y máximo, programados para el control de la concentración de OD, fueron: mínimo de 0,1 y máximo de 8,0 mg O_2/L (Wiesmann, 1994).

D) Determinación de Ks_{BAO} y $r_{Nmáx, BAO}$

El experimento se basó en eliminar la interferencia de las BNO en la cinética de las BAO. Esto se realizó, mediante la aplicación de ensayos titulométricos, cimentados en el sensor virtual de NAT descrito en el Capítulo II. Se utilizaron concentraciones de amoníaco limitantes y concentraciones de OD no limitantes. La finalidad fue aplicar la Ecuación (3.7) únicamente en función de la concentración de amoníaco (Ecuación (3.14)), donde Ks_{BAO} se calculó del intercepto y $r_{Nmáx, BNO}$ de la pendiente.

$$\frac{c_{NH_3,0} - c_{NH_3}}{Ln\frac{c_{NH_3,0}}{c_{NH_3}}} = r_{Nmax,AOB}\frac{t}{Ln\frac{c_{NH_3,0}}{c_{NH_3}}} - Ks_{AOB} \tag{3.14}$$

La experiencia se realizó con un ensayo titulométrico, donde se utilizó una concentración inicial de sustrato de 0,67 mg $N\text{-}NH_3$/L, valor que se encuentra en la zona de limitación por sustrato para las BAO según cinética de Haldane (Wiesmann, 1994). Los set-point mínimo y máximo programados para el control de la concentración de OD, fueron: mínimo de 4,0 y máximo de 8,0 mg O_2/L.

E) Determinación de Ks_{BNO} y $r_{Nmáx, BNO}$

El experimento se basó en el cálculo de las concentraciones de ácido nitroso a partir de las tasas de respiración medidas. Se utilizó concentraciones de ácido nitroso limitantes y concentraciones de OD no limitantes. La finalidad fue aplicar la Ecuación (3.8) únicamente en función de la concentración del ácido nitroso (Ecuación (3.15)), donde Ks_{BNO} se calculó del intercepto y $r_{Nmáx, BNO}$ de la pendiente.

$$\frac{c_{HNO_2,0} - c_{HNO_2}}{Ln\frac{c_{HNO_2,0}}{c_{HNO_2}}} = r_{Nmax,NOB}\frac{t}{Ln\frac{c_{HNO_2,0}}{c_{HNO_2}}} - Ks_{NOB} \tag{3.15}$$

La experiencia se realizó con un ensayo respirométrico, donde se utilizó una concentración inicial de sustrato de 6,9x10^{-4} mg N-HNO_2/L, valor que se encuentra en la zona de limitación por sustrato para las BNO según cinética de Haldane (Wiesmann, 1994). Los *set-point* mínimo y máximo programados para el control de la concentración de OD, fueron: mínimo de 4,0 y máximo de 8,0 mg O_2/L.

Durante la aireación intermitente, se determinó el perfil de la tasa de consumo de oxígeno (r') en el tiempo (Ficara *et al.*, 2000). Posteriormente, al aplicar la Ecuación (3.16) y el coeficiente de rendimiento $Y_{O_2/N-NO_2^-}$, calculado previamente en la sección A, se obtuvo el perfil de la tasa de consumo de ácido nitroso en el tiempo.

$$\frac{dc_{N-NO_2^-}}{dt} = \frac{r'}{Y_{O_2/N-NO_2^-}} \tag{3.16}$$

A la curva experimental de r', se le aplicó una regresión polinomial de orden no mayor a 4, para obtener una ecuación que describiera la Ecuación (3.16) con una alta correlación, como se muestra en la Ecuación (3.17)

$$\frac{dc_{N-NO_2^-}}{dt} = \frac{a + b \cdot t^n + c \cdot t^{n+1} + ... + d \cdot t^{n+n}}{Y_{O_2/N-NO_2^-}} \tag{3.17}$$

Integrando la Ecuación (3.17) entre 0 y t, se determinó la Ecuación (3.18), mediante la cual se pudo calcular el consumo de nitrito total en el tiempo, para aplicar posteriormente la Ecuación (3.18). La concentración de ácido nitroso, se calculó a partir de la Ecuación (3.4)

$$N-NO_2^- = \left[a \cdot t + \frac{b \cdot t}{n+1}^{n+1} + \frac{c \cdot t}{n+2}^{n+2} + \cdots + \frac{d \cdot t}{n+(n+1)}^{n+(n+1)} + c_{NO_2^-,0} \right] \cdot \frac{1}{Y_{O_2/N-NO_2^-}} \tag{3.18}$$

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diferentes experimentos cinéticos fueron llevados a cabo para determinar los coeficientes de la cinética de Monod con doble limitancia del proceso de nitrificación. Estos parámetros fueron calculados separadamente para las BAO y BNO.

3.4.1 Determinación de coeficientes de rendimiento $Y_{O_2/S}$

Durante este trabajo fue necesario calcular los coeficientes de rendimiento de las bacterias, debido a que se utilizaron como factores de conversión en experimentos posteriores. La Figura 3.2 muestra la evolución de la concentración de OD en el tiempo durante uno de los ensayos respirométricos, aplicado a la obtención del coeficiente de rendimiento $Y_{O_2/N}$. En los primeros 120 minutos se observa una lenta disminución de la concentración del OD, debido a la ausencia de sustrato, indicando esto una fase de respiración endógena. Como se trató de experimentos de corta duración, la respiración endógena se asumió como constante (Schreiner *et al.*, 1999), dando un valor de $1{,}4 \times 10^{-2}$ mg O_2/L/h/g SSV. A los 140 minutos se agregó el amonio, e inmediatamente se observó una drástica disminución de la concentración de OD, producto de la oxidación de NAT. La Figura 3.2 muestra que a los 150 minutos ocurre un cambio de pendiente, lo que indica el ingreso a una zona de limitación por sustrato. Posteriormente, una vez consumido completamente el amonio, se observó nuevamente el inicio de la fase endógena.

La Tabla 3.1 muestra los resultados obtenidos para los coeficientes de rendimiento de OD consumido por sustrato oxidado, donde se observa una alta correlación con otros estudios.

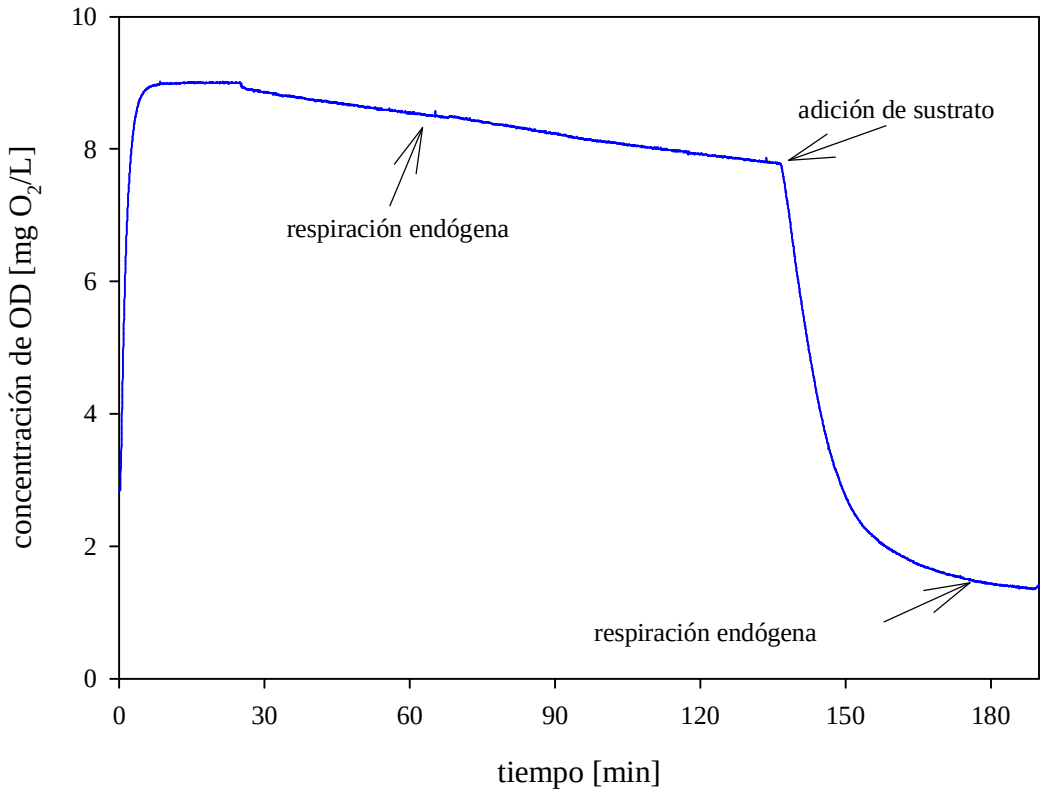

Figura 3.2 Respiración endógena y exógena de las actividades en conjunto de BAO y BNO, en la determinación de los coeficientes de rendimiento durante un ensayo respirométrico

Tabla 3.1. Coeficiente de rendimiento para BAO y BNO

Referencia	**Nitrificación total**	**BAO**	**BNO**
	$Y_{O_2/N}$ **[g O_2/g N]**	$Y_{O_2/TAN}$ **[g O_2/g NAT]**	$Y_{O_2/N+3}$ **[g O_2/g N-NO_2^-]**
Este estudio	4,2 ± 0,7	3,0 ± 0,7	1,1 ± 0,04
(Wiesmann, 1994)	4,3	3,2	1,1
(Pirsing *et al.*, 1996)	4,3	3,2	1,1
(Lindemann, 2002)	4,2	3,1	1,1

3.4.2 Cálculo diferenciado de K' para BAO y BNO

La Figura 3.3 muestra resultados de la aplicación de la estrategia para la diferenciación cinética, basado en la diferente afinidad por el OD que presentan las bacterias nitrificantes. Esta estrategia se aplicó en la determinación de K'_{BAO} y K'_{BNO}. En ambos casos, se utilizó concentraciones de oxígeno limitantes. Sin embargo, para el primer caso se aplicaron bajas concentraciones, con el fin de disminuir la actividad de las BNO.

La Figura 3.3 muestra la aplicación de aireación intermitente a los diferentes *set point* propuestos. Debido a que el intervalo de aireación para los experimentos de K'_{BAO} fue más pequeño, la determinación de K'_{BAO} tomó menos tiempo que la determinación K'_{BNO}. El diseño de los controladores PI permitió alcanzar los *set point* máximos y mínimos con gran precisión, logrando con esto una importante disminución en los tiempos de experimentación.

La curva para la determinación de K'_{BNO} de la Figura 3.3, muestra la zona de limitación por oxígeno, indicada por el cambio en las pendientes bajo los 2,0 mg O_2/L, lo que confirma el intervalo de OD elegido para la determinación de K'_{BAO}.

Dado que para estos experimentos se utilizó una concentración de sustrato no limitante, las pendientes de las zonas de decrecimiento de OD se mantuvieron constantes en cada intervalo. Cada intervalo de aireación intermitente fue procesado individualmente para el calculo de K', con lo que se obtuvo 11 repeticiones para K'_{BAO} y 6 para K'_{BNO}.

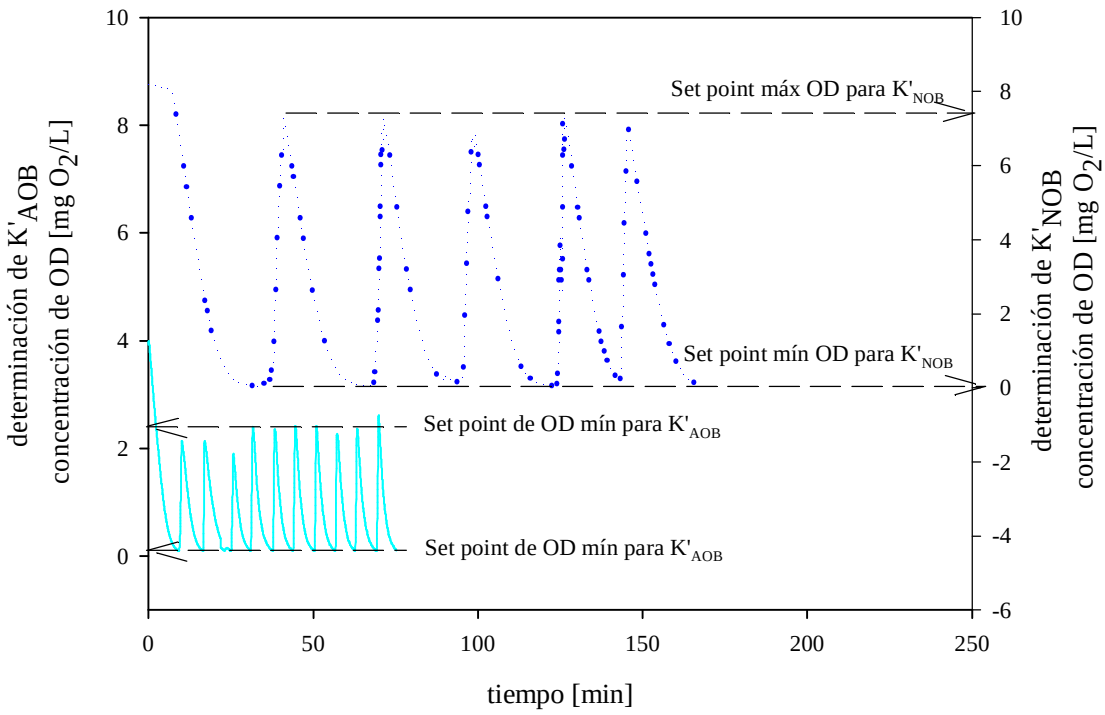

Figura 3.3. Estrategia de diferenciación de bacterias nitrificantes por OD, en la determinación de K'_{BAO} y K'_{BNO}

La Figura 3.4 muestra uno de los resultados de la obtención gráfica de K' y $r'_{máx}$, a través de la linearización de una de las zona de limitación de OD de la Figura 3.4, mediante la aplicación de la Ecuación (3.14). La curva A representa la linearización entre 1,0 y 0,45 mg O_2/L, y la curva B representa la linearización entre 2,0 y 0,4 mg O_2/L. En ambos casos se aplicó una regresión lineal de orden uno, con una correlación cercana a la unidad, donde K' se obtuvo del valor absoluto de la pendiente y $r'_{máx}$ del intercepto con el eje Y. Este procedimiento fue similar en la obtención de Ks y $r_{Nmáx}$.

La Tabla 3.2 presenta los resultados de los ensayos respirométricos para la estimación de K' y $r'_{máx}$, a partir de la Ecuación (3.13). Estas constantes tienen valores más elevados en comparación a las reportadas en literatura, lo que indica que los microorganismos estudiados en este trabajo tienen una menor afinidad por el oxígeno. Sin embargo, pudo existir una interferencia de las BNO.

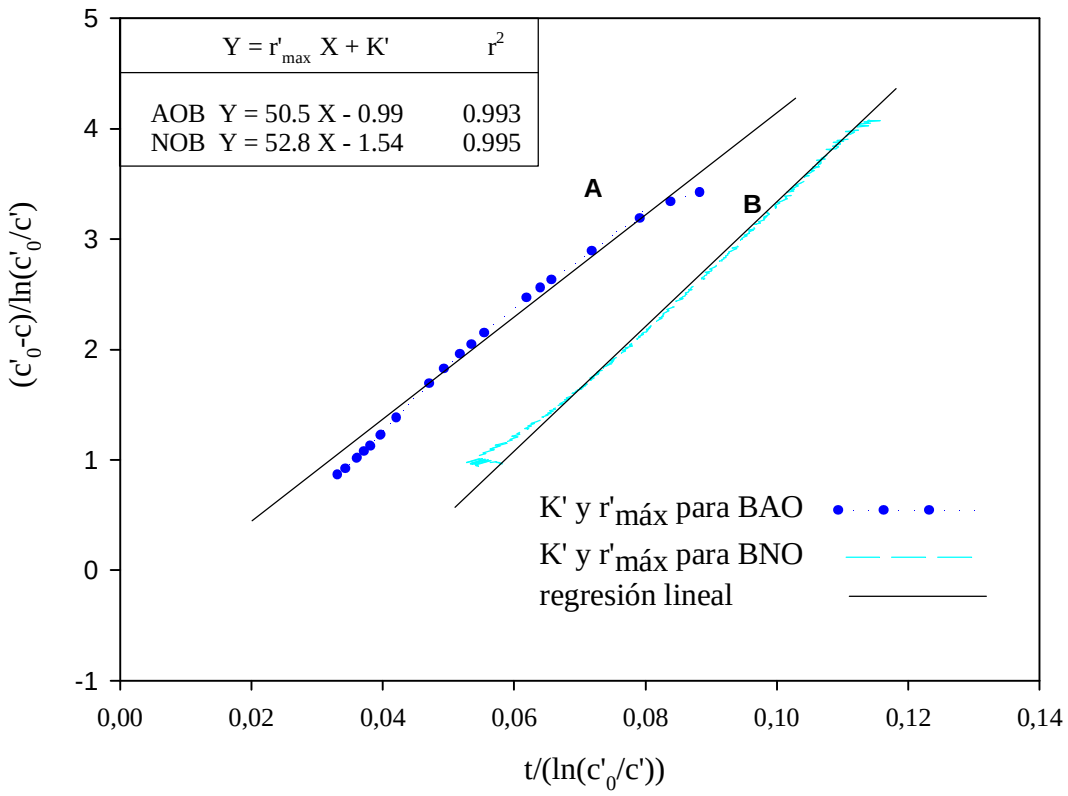

Figura 3.4. Ejemplo de estimación de constantes cinéticas a través de linerización de las zonas de limitación por oxígeno: A) estimación de K' y r'_{max} para BAO y B) estimación de K' y r'_{max} para BNO

Tabla 3.2. Estimación de K' y r'máx mediante respirometría para microorganismos BAO y BNO

	BAO		BNO	
Referencia	K' [mg O_2/L]	$r'_{máx}$ [mg O_2/L/h]	K' [mg O_2/L]	$r'_{máx}$ [mg O_2/L/h]
Este trabajo	0,9 ± 0,05	46,6 ± 3,8	1,4 ± 0,2	43,2 ± 2,7
(Wiesmann, 1994)	0,3	-	1,1	-
(Pirsing *et al.*, 1996)	0,3	-	1,3	-
(Lindemann, 2002)	0,3	-	1,3	-
(Larsen, 1992)	0,6	-	-	-

En la determinación de K'_{BAO}, se consumieron 9,8 mg $N\text{-}NH_4^+$/L, de los cuales 2,7 mg $N\text{-}NH_4^+$/L fueron oxidados hasta nitrato. Esto significa que solo un 9% del oxígeno total fue consumido por las BNO. Este resultado confirma la baja actividad de las BNO en el rango de OD < 2,0 mg O_2/L. No obstante, el valor de K'_{BAO} podría estar influenciado por el nitrito oxidado a nitrato, lo que puede ser una explicación al alto valor encontrado para esta constante (Tabla 3.2). Una desventaja de este método es que utiliza una linerarización logarítmica, lo que puede aumentar el error. Para suplir esta desventaja se utilizaron más de 6 repeticiones obteniéndose una baja desviación estándar (un error aproximado del 5 %).

En la determinación K'_{BNO}, no existe interferencia por las BAO, debido a que el sustrato utilizado es directamente el nitrito. El valor calculado para esta constante fue ligeramente superior a otros trabajos (Tabla 3.2).

3.4.3 Cálculo diferenciado de Ks para BAO y BNO

En la Figura 3.5 se presenta la estrategia aplicada para el cálculo diferenciado de Ks_{BAO} y $r_{Nmáx,BAO}$, mediante ensayos titulométricos. La línea punteada de la Figura 3.5A muestra el monitoreo en línea del consumo de carbonato en mili moles. Éste, fue calculado a través del número y volumen de pulsos de carbonato entregados al reactor, durante la oxidación del amoníaco (NH_3).

Se observa que a los 60 minutos, la bomba de control de pH no entregó más pulsos de carbonato, lo que indicó el término de la etapa de nitritación.

Usando el monitoreo en línea del gasto de carbonato y 7,28 mmol CO_3^{2-}/mmol NAT (coeficiente $Y_{CO_3^{2-}/TAN}$, calculado de experimentos previos.), se obtuvo el consumo de NAT y amoníaco en el tiempo, mediante la Ecuación (2.7) (Figura 2.6B). Con la aplicación de esta metodología se pudo medir indirectamente la concentración NAT en línea, lo que se transforma en una alternativa económica comparada con herramientas de medición en línea encontradas en el mercado, como los medidores y sensores de NAT, $N\text{-}NO_2^-$ y $N\text{-}NO_3^-$, debido a que necesitan cantidades considerables de químicos para su funcionamiento y requieren de un mantenimiento intensivo (Gernaey *et al.*, 1998). Similares aplicaciones basadas en la titulación, para medir indirectamente la concentración de NAT, fueron encontradas en trabajos como los de Gernaey *et al.* (1997) y Yuan y Bogaert, (2001), en reactores de lodo activo, y Antileo *et al.* (2006) en un reactor de discos rotatorios.

La Figura 3.5B muestra una alta correlación de la medición en línea con las mediciones experimentales. La oscilación en la medición del amoníaco, mostrada en la primera sección de la Figura 3.5B, se debe a la oscilación en el pH del medio, entre 7,7 y 8,1, para alcanzar el set point establecido. El pH promedio para este experimento fue de 8,0, con una desviación estándar de 0,03.

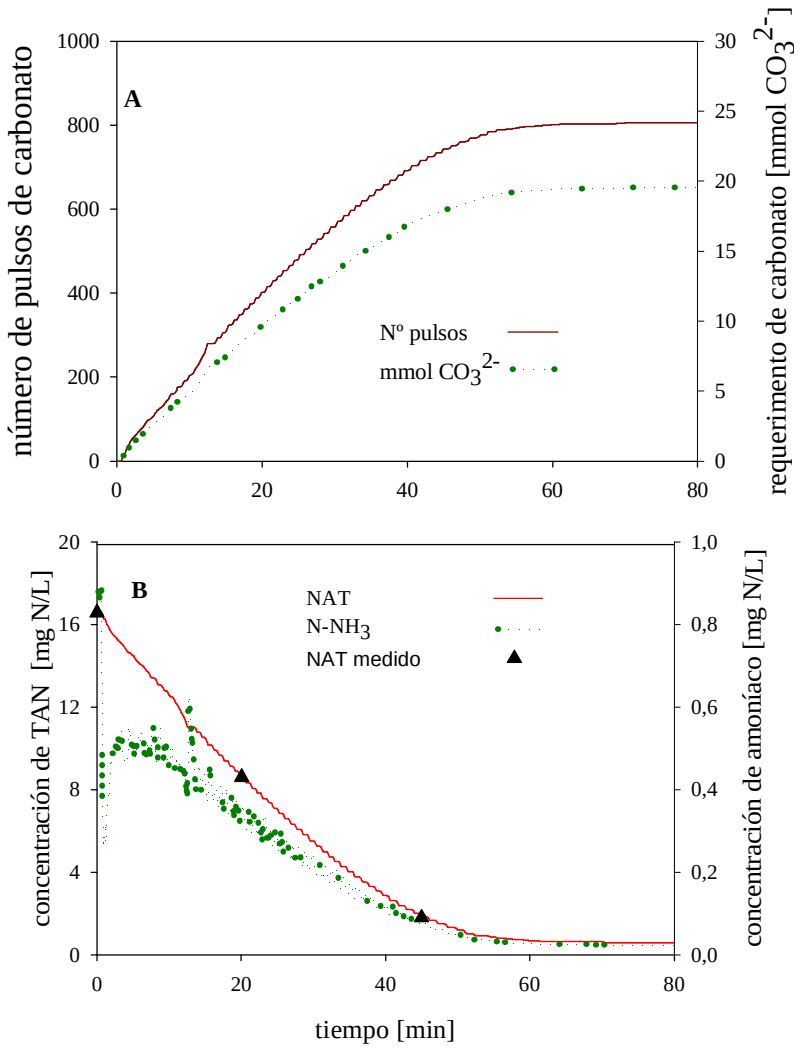

Figura 3.5. Estrategia de diferenciación por producción de protones, para el cálculo de Ks_{BAO} por titulometría: A) consumo de carbonato de sodio en el tiempo y B) consumo de NAT y N-NH_3 en el tiempo

La Figura 3.6 muestra la linearización de la curva de consumo de amoníaco (Figura 3.5B), en base a la aplicación de la Ecuación (3.13), para obtener Ks_{BAO} y $r_{Nmáx}$, del intercepto y la pendiente, respectivamente. La zona linearizada corresponde al rango comprendido entre 0,2 y 0,4 mg N-NH_3/L. Se observa una alta fluctuación en la linerización, obteniéndose un r2 sólo de 0,95, lo que pudo afectar al valor calculado debido al aumento del error.

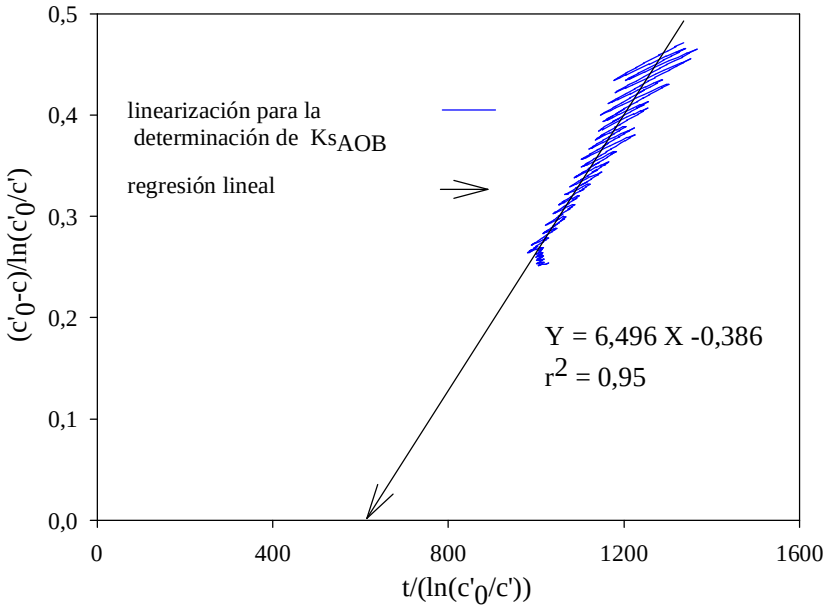

Figura 3.6. Estimación de Ks y $r_{Nmáx}$ para BAO, a través de linerización de las zonas de limitación por amoníaco

La Figura 3.7 presenta la estrategia utilizada para el cálculo de Ks_{BNO} y $r_{Nmáx,\ BNO}$. La Figura 3.7A muestra la aplicación de un ensayo respirométrico, a concentraciones de oxígeno no limitantes. Debido a que se utilizó una concentración de ácido nitroso limitante, se aprecia que a medida que se avanza en el tiempo, las pendientes de cada intervalo de aireación intermitente, disminuyen hasta quedar horizontales a los 130 minutos. Esto indica el consumo total del ácido nitroso y el inicio de una fase de respiración endógena. La Figura 3.7B muestra el cálculo de la tasa de consumo de nitrito ($r_{N\text{-}NO2^-}$) a partir del coeficiente de rendimiento $Y_{O_2/N-NO_2^-}$ y el perfil de r', construido con cada uno de los intervalos de aireación intermitente de la Figura 3.7A. Aplicando una regresión polinomial de orden 4, se obtuvo una ecuación

para reproducir $r_{N\text{-}NO2\text{-}}$ (Ecuación (3.17)). La Figura 3.7C muestra el consumo de nitrito y ácido nitroso en el tiempo, obtenido mediante la integración de la Ecuación (3.18). La predicción del consumo de nitrito tuvo una alta correlación con los valores experimentales. La fluctuación de la concentración de HNO_2 en los primeros 10 min, se explican por una variación entre 7,8 y 8,2 en el pH del medio.

De la linearización de la curva de consumo de ácido nitroso de la Figura 3.7C, se determinó Ks_{BNO} mediante la Ecuación (2.19), dando un valor aproximado de $2{,}2x10^{-4}$ mg N-HNO_2/L.

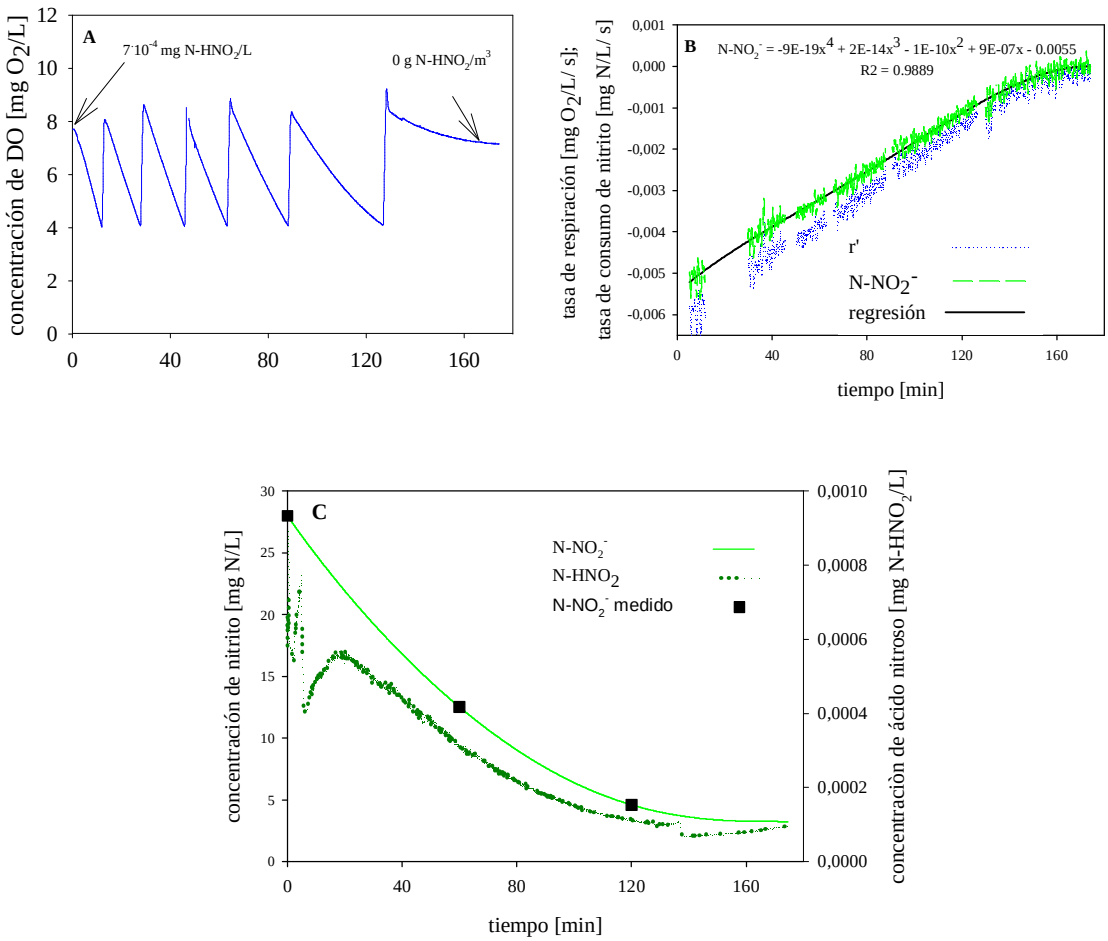

Figura 3.7. Estrategia para el cálculo de Ks_{BNO} por respirometría: A) Ensayo respirométrico a concentración de ácido nitroso limitante, B) cálculo de r_{NO2} a partir de r' y C) consumo de N-NO_2^- y N-HNO_2 en el tiempo

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos para los coeficientes de saturación de sustrato Ks y tasas máximas de consumo $r_{Nmáx}$ para las BAO y BNO. Como se observa, todos los valores calculados son superiores a la mayoría de los descritos en la literatura, lo que podría indicar que las bacterias utilizadas en este estudio son más sensibles a bajas concentraciones de sustrato, debido a que tendrían una menor afinidad por éste. Sin embargo, se debe tener en cuenta el error inherente al utilizar una linearización logarítmica.

Tabla 3.3. Estimación de Ks y $r_{Nmáx}$ mediante respirometría y titulación para microorganismos BAO y BNO

	BAO		**BNO**	
Referencia	**Ks**	**$r_{Nmáx}$**	**Ks**	**$r_{Nmáx}$**
	[mg N-NH_3/L]	**[mg NH_3/L/h]**	**[mg N-HNO_2/L]**	**[mg N-HNO_2/L/h]**
Este trabajo	0,3	2,2	$2,2 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$
(Wiesmann, 1994)	0,03	-	$0,3 \times 10^{-4}$	-
(Carrera *et al.*, 2004)	0,16	-	$1,3 \times 10^{-4}$	-
(Horn y Hempel, 1995)	0,6	-	-	-
(Bergeron, 1978)	-	-	$2,5 \times 10^{-4}$	-

La aplicación de respirometría y titulación en conjunto, para la determinación de las constantes cinéticas de la ecuación de Monod con doble limitancia, fue un método rápido y sencillo, mediante el cual fue posible determinar las constantes, sin la necesidad de tomar muestra. Además, mediante la aplicación de la metodología propuesta, se pudieron calcular constantes cinéticas diferenciadamente para BAO y BNO, lo cual podría tener aplicaciones prácticas, como un monitoreo continuo del desempeño del tratamiento biológico, por ejemplo frente a la presencia de tóxicos, variación en los sustratos, cambios bruscos de pH. Además, se podría monitorear la nitrificación parcial en cuanto a la actividad de las BNO.

3.4.4 Distribución bacteriana

En cuanto a la distribución de la población bacteriana, el análisis molecular ARNr 16s indicó que las poblaciones BAO y BNO se encontraron en una relación aproximada de 73,6% y 26,4%, respectivamente. De acuerdo a los coeficientes de rendimiento para BAO 0,147 g SSV/g N-NH_3 y para BNO 0,042 g SSV/g N-HNO_2, (Wiesmann, 1994), cerca del 77 % serían

BAO, mientras que el 23% de la población nitrificante serían BNO. Esto indica que en la población bacteriana de este estudio, hay una distribución normal de BAO y BNO. Las tasas específicas máximas de consumo de sustrato para este estudio fueron de $7{,}5x10^{-5}$ mg N/mg SSV/h para BAO, y $3x10^{-9}$ mg N/mg SSV/h para BNO, valores registrados dentro del rango reportado por la literatura clásica (Cecen *et al.*, 1995).

3.5. CONCLUSIONES

Los ensayos respirométricos y titulométricos mostraron ser un método rápido y sencillo para el cálculo de concentraciones de NAT, nitrito, cinética de la nitritación y cinética de la nitritación, sin necesidad de medir directamente la concentración de sustrato. Además, con la titulación se logró medir la concentración de NAT en línea indirectamente, a través del consumo de una solución neutralizadora de pH. Esto resulta ser una alternativa económica, comparado con las herramientas de medición en línea del comercio.

Mediante la aplicación de la metodología propuesta, se pudieron calcular constantes cinéticas diferenciadamente para BAO y BNO. Por lo tanto, esta metodología podría tener aplicaciones prácticas, como un monitoreo del desempeño del tratamiento frente a la presencia de tóxicos o cambios bruscos de pH.

La utilización de las diferencias de afinidad por el oxígeno de las BAO y BNO, para la determinación de K' y $r'_{máx}$ de ambas poblaciones de bacterias, mostró ser un método aceptable. Sin embargo, el método pude magnificar los errores debido a que se trata de una linerización logarítmica. Esta desventaja podría ser solucionada al realizar mayor número de repeticiones. El alto valor encontrado para K'_{BAO} puede indicar que este fue afectado por la utilización de oxígeno por parte de las BNO, sin embargo este fue solo un 9% del oxígeno total consumido.

Los coeficientes de saturación por sustrato, indicaron que las bacterias de este estudio tienen una fuerte dependencia de la concentración de sustrato en el medio.

CAPÍTULO IV. OPERACIÓN SBR DE UN REACTOR DE BIOPELÍCULA RDR NITRIFICANTE

Capítulo basado en artículo publicado:

Antileo, C., Werner, A., **Ciudad, G.**, Muñoz, C., Bornhardt, C., Jeison, D., and Urrutia, H. (2006) Novel operational strategy for partial nitrification to nitrite in a sequencing batch rotating disk reactor. Biochemical Engineering Journal, **32**(2), 69-78.

4.1. RESUMEN

En orden de lograr una nitrificación parcial estable en el tiempo, una nueva estrategia operacional fue estudiada. Se utilizó un RDR operado en modalidad SBR y fueron aplicadas concentraciones de OD menores a 1 mg O_2/L. La estrategia se basó en un control en tiempo real, a través de un supervisor de pH y la medición en línea de la concentración de NAT. El control supervisor mantuvo una concentración de amoníaco en el rango 3 a 4 mg N-NH_3/L, valores óptimos para el crecimiento de las BAO e inhibitorios para las BNO.

Esta estrategia permitió operar por 270 d con alta acumulación de nitrito (>84%). Sin embargo, un efecto negativo fue observado al disminuir la concentración de OD de 1,0 a 0,8 mg O_2/L: la tasa de oxidación de NAT se redujo de 4,3 a 1,6 kg N/m^2/d.

Análisis microbiológicos, revelaron la presencia de más del 95% de BAO y solamente 5% de BNO, durante la fase inicial de la formación de la biopelícula.

4.2. INTRODUCCIÓN

Hasta ahora, la mayoría de los estudios realizados con nitrificación parcial se basan en usar condiciones ambientales para reducir la tasa de crecimiento de las BNO, pero no para incrementar la actividad de las BAO (Abeling y Seyfried, 1992; Ciudad *et al.*, 2005; Fux y Siegrist, 2004; Garrido *et al.*, 1997b; Jetten *et al.*, 1998; Joo *et al.*, 2000; Mosquera-Corral *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2004a; Ruiz *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2006; Villaverde *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007; Wang y Yang, 2004; Wang *et al.*, 2004a). En este estudio, se introduce esta nueva perspectiva usando el amoníaco en concentraciones óptimas para las BAO e inhibitorias para las BNO.

De acuerdo a la cinética de Haldane (Figura 4.1), en el rango de 3 a 4 mg N-NH_3/L existe una zona óptima de concentración de amoníaco para las BAO (Wiesmann, 1994), la que permite una tasa máxima de crecimiento específico. Por lo tanto, si en un reactor se mantiene esta concentración, una tasa óptima de oxidación de sustrato y una favorable distribución de BAO en la biopelícula, pueden ser alcanzadas.

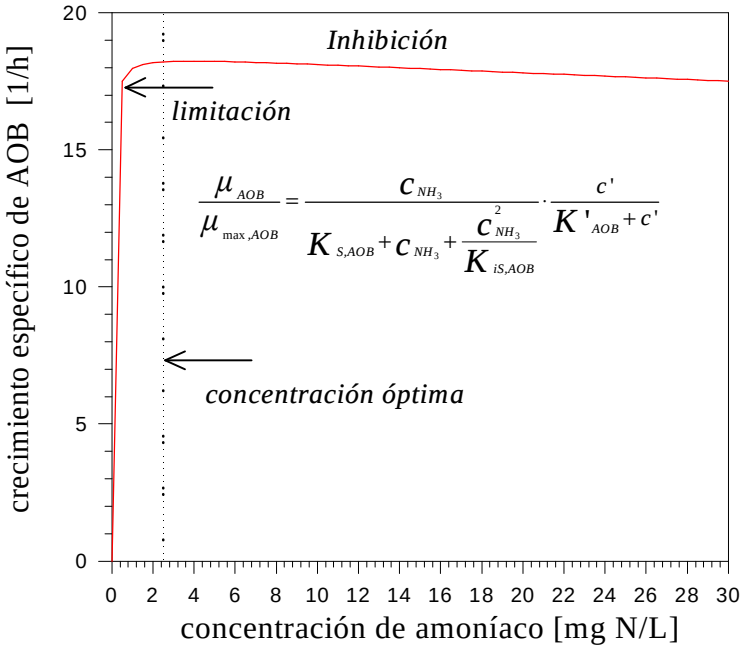

Figura 4.1. Influencia de la concentración de sustrato en la tasa específica de crecimiento de las BAO, según cinética de Haldane

Como se mostró en el capítulo I y III, la concentración de amoníaco depende de condiciones ambientales como el pH, temperatura y concentración de NAT (Ecuación (3.3)) (Wiesmann, 1994).

En base a la Ecuación (3.3), si en una operación SBR el pH es variado dinámicamente en el tiempo por un control supervisor, en función de un sensor virtual de NAT y de la temperatura, se podría establecer una concentración de amoníaco constante en el reactor. Con esta herramienta se podría actuar selectivamente sobre las bacterias nitrificantes, favoreciendo a las BAO e inhibiendo a las BNO.

En base a lo anterior, este trabajo implementó una nueva estrategia operacional, basada en la aplicación de un control supervisor de pH y de un sensor virtual de NAT, en orden de mantener una nitrificación parcial estable en un RDR operado en modalidad SBR. Además, se estudió la distribución de BAO y BNO durante la evolución de la biopelícula.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizo el RDR1 descrito en el Capítulo II.

4.3.1 Estrategia operacional

Después de un periodo de puesta en marcha de 120 d, 59 ciclos SBR fueron llevados a cabo en un tiempo total de 270 d.

En orden de promover la nitrificación parcial, el pH y concentración de OD fueron ajustados en valores para promover el crecimiento de BAO e inhibir/limitar a las BNO. Un total de 31 ciclos fueron operados a 1,0 mg O_2/L, 11 ciclos a 0,8 mg O_2/L, y 17 a 0,6 mg O_2/L. Cada ciclo tuvo las siguientes etapas: a) llenado manual del reactor con una concentración conocida de NAT y toma de muestra inicial, b) nitrificación parcial, c) interrupción de la aireación en tiempo real, cuando se detectara la oxidación completa del amonio y d) vaciado manual del reactor para el comienzo de un nuevo ciclo. La duración de las etapas de llenado y vaciado fue despreciable comparado a la duración de un ciclo completo.

Para cada ciclo, el fin de la etapa de oxidación fue detectado en línea midiendo el consumo de carbonato, y fue definida como el tiempo al cual la bomba de carbonato cesó los pulsos (1 h). En este punto, la aireación fue interrumpida automáticamente hasta el comienzo de un nuevo ciclo.

Todos los sustratos fueron preparados con un relación constante de N:P:Mg = 340:10:1. La composición del sustrato sintético se muestra en la Tabla 3.1. Se utilizó una solución de micronutrientes en una relación de 0,5 mL/g N-NH_4^+, de acuerdo a Ciudad *et al*. (2005).

Tabla 4.1. Composición de sustrato sintético para SBRDR

Compuesto	Unidades	Concentración
$(NH_4)_2SO_4$	mg N/L	707,1
$MgSO_4{\cdot}7H_2O$	mg Mg/L	3,6
K_2HPO_4	mg P/L	43,9
KH_2PO_4	mg P/L	43,9

4.3.2. Control supervisor de pH

De acuerdo a la cinética de Haldane, el crecimiento óptimo de las BAO ocurre entre 3 y 4 N-NH_3/L (Figura 4.1) (Wiesmann, 1994). Por lo tanto, basado en el equilibrio químico de NH_3/NH_4^+ presentado en la Ecuación (3.3) del Capítulo III, este trabajo propone un control supervisor de pH acoplado a un monitoreo en línea del amonio (sensor virtual de NAT descrito en Capítulo II). El control supervisor de pH calcula el valor requerido de pH, el cual es ingresado en el reactor por el control PI, como se muestra en la Figura 4.2. (Anexo A3)

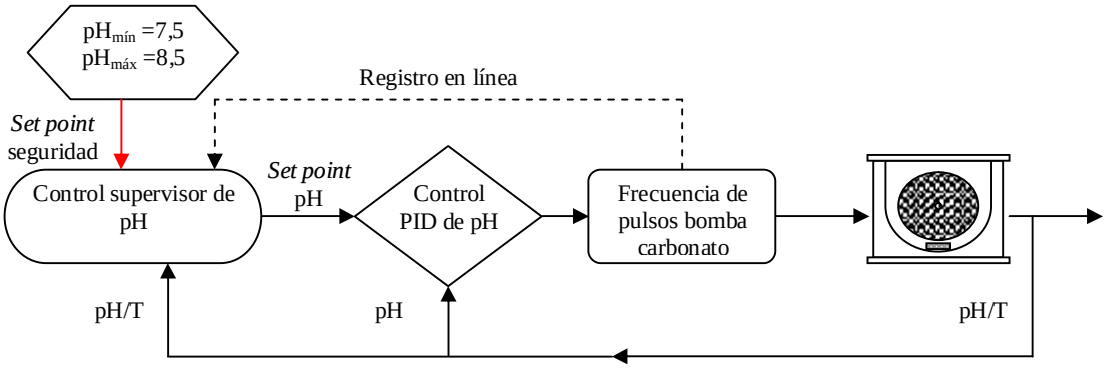

Figura 4.2. Operación del control supervisor de pH

Para el cálculo del *set point* de pH se requirió conocer en todo momento la concentración de NAT. Por lo tanto, se utilizó el sensor virtual de NAT.

Al final de cada ciclo, $Y^*_{CO3/NAT}$ fue calculado experimentalmente para ser utilizado en el ciclo siguiente. Cuando se aplicó el control supervisor de pH, el pH fue variado dinámicamente en el tiempo. Por lo tanto, el cálculo de la Ecuación (2.7) fue corregido, considerando solo el carbonato requerido para neutralizar los H^+ y no para incrementar el pH.

De acuerdo al equilibrio químico de NH_4^+/NH_3 (Ecuación (2.7)), el $pH_{set\ point}$ puede ser calculado durante todo el tiempo de operación, a través de la Ecuación (4.1). En esta ecuación se consideró la temperatura, concentración de NAT y concentración óptima de amoníaco ($c_{NH3,opt}$), definida por literatura.

$$pH_{\text{Set point}}(t) = \log\left(\frac{c_{NH_3,\text{opt}} \cdot \exp\left(\frac{6344}{273+T(t)}\right)}{TAN(t) - c_{NH_3,\text{opt}}}\right) \tag{4.1}$$

El control supervisor se basó en la Ecuación (2.7) y (4.1) y fue programado en Mathlab 6.5 (Anexo).

4.3.3 Biomasa y toma de muestras

El inóculo se tomó de un reactor nitrificante de biomasa suspendida. Con el fin de incrementar la actividad de las BAO, antes de la inoculación las bacterias fueron cultivadas a pH 8,6 y a una concentración de OD de 2,5 mg O_2/L.

Para el análisis de NAT, nitrito y nitrato, se tomaron muestras al inicio y al final de cada ciclo (50 mL aproximadamente). Para validar el método de medición en línea de NAT, se eligieron ciclos al azar, donde se tomó mayor cantidad de muestras (> 5).

Para un seguimiento de la evolución de las poblaciones de BAO y BNO se realizaron análisis microbiológicos descritos en el Capítulo II.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados a continuación, corresponden a la operación del RDR1 en modalidad SBR por un periodo de 270 d.

4.4.1 Validación de la predicción en línea de la concentración de NAT

La Figura 4.3 muestra la alta correlación existente entre mediciones experimentales (símbolos rojos) y la predicción de la concentración de NAT durante tres ciclos SBR a diferentes concentraciones de oxígeno. En el eje derecho se muestra los moles de carbonato requeridos para neutralizar los protones producidos por la oxidación de NAT, los cuales fueron transformados en concentración de NAT mediante la Ecuación (3.5).

La exactitud de la predicción de NAT, dependió del coeficiente de rendimiento $Y^*_{CO3/NAT}$ (Ecuación (2.7)), el cual presentó variaciones entre un experimento y otro (1 a 2,5 mol CO_3^{2-} /mol NH_4). Por lo tanto, tuvo que ser calculado periódicamente. A pesar de este inconveniente, la medición en línea de la concentración de NAT en base al consumo de carbonato resultó ser confiable y válido, representando un método fácil y simple de aplicar en el monitoreo en línea de reactores operados en modo SBR. Una ventaja de este método fue, que al ser desarrollado con elementos comunes en las plantas de tratamiento a escala industrial (PLC, sensor de OD, pHmetro), podría ser una alternativa económica comparado con los equipos de medición en línea del mercado.

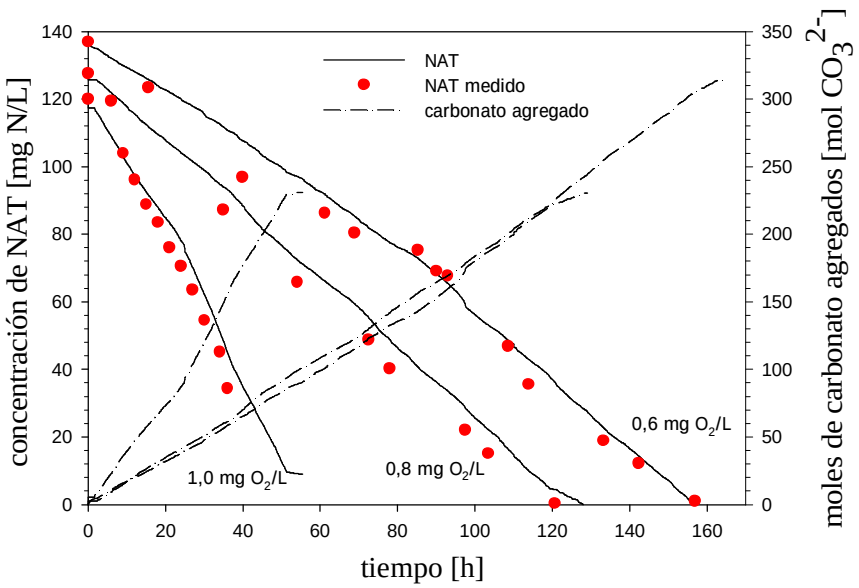

Figura 4.3. Validación experimental de la predicción en línea de la concentración de NAT a diferentes concentraciones de OD

4.4.2 Control supervisor de pH

En orden de mantener una concentración de amoníaco constante se aplicó un control supervisor de pH, mediante el cual el *set point* de pH fue variado durante toda la duración del ciclo SBR.

La Figura 4.4 muestra la comparación de 3 ciclos SBR, un ciclo realizado con el control supervisor de pH y dos realizados a pH constante. Para los ciclos con el control supervisor de

pH, la oxidación total de NAT se alcanzó antes de 80 h (Figura 4.4A). Por otro lado, en los ciclos a pH constante la oxidación total de NAT fue alcanzada después de 110 h (pH 7,5) y 90 h (pH 8,5). La mayor duración del ciclo operado a pH 7,5, se debe a una limitación por sustrato (< 2 mg N/L). Durante las primeras 40 horas del ciclo a pH 8,5, hubo una alta concentración de amoníaco (20 a 10 mg N-NH_3/L), lo que afectó posiblemente por inhibición a las BAO, aumentando la duración del ciclo (Figura 4.4B) (Abeling y Seyfried, 1992; Villaverde *et al.*, 1997). Sin embargo, en este ciclo no se observaron diferencias significativas entre la operación con el control supervisor y pH constante de 8,5, debido probablemente al efecto protector de biopelícula (Rittmann *et al.*, 2002), sumado a la baja transferencia de masa de los RDR (de Beer y Schramm, 1999; de Beer *et al.*, 1993; Okabe y Watanabe, 2000).

Las oscilaciones en la concentración de amoníaco en los ciclos operados a pH constante (Figura 4.4B), se debieron a los cambios de temperatura entre el día y la noche. En la operación con control supervisor de pH no se observó este efecto.

Diversos autores señalan que concentraciones iguales o superiores a 10 mg N-NH_3/L, afectan negativamente a las BAO (Abeling y Seyfried, 1992; Villaverde *et al.*, 1997). Sin embargo, el control supervisor de pH mantuvo una concentración en el rango de 3 a 4 mg N-NH_3/L, lo que permitió una menor duración de los ciclos.

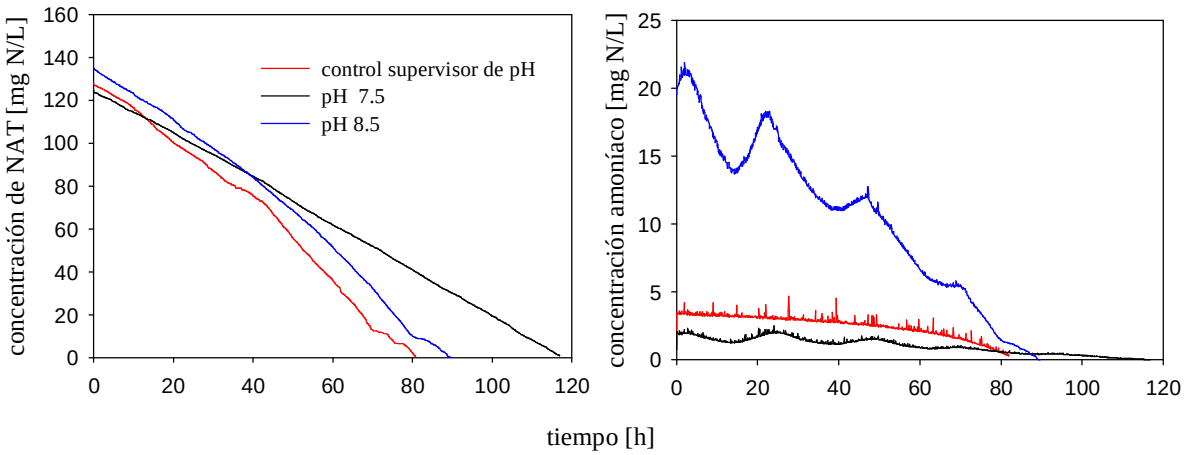

Figura 4.4. Ciclos SBR operados con control supervisor de pH y pH constante

El efecto del control supervisor de pH fue probado solamente a concentraciones limitantes de OD (concentraciones mayores de oxígeno fueron probadas en el Capítulo V). Sin embargo, se

esperaría que su efecto fuera mayor a concentraciones no limitantes de OD, debido a que la cinética estaría gobernada por la disponibilidad de sustrato (N), y no por factores difusionales de transporte.

4.4.3 Nitrificación parcial

La Figura 4.5 muestra 3 ciclos SBR operados con el control supervisor de pH, a 1,0; 0,8 y 0,6 mg O_2/L, respectivamente. Para 0,6 mg O_2/L se usó un coeficiente de rendimiento $Y^*_{CO3/NAT}$ de 2,0 mol CO_3^{2-}/ mol N-NH_4^+, y para 0,8 mg O_2/L de 2,3 mol CO_3^{2-}/ mol NH_4^+. Se observa que la concentración de amoníaco se mantuvo constante para ambos casos en el rango de 3 a 4 mg N-NH_3/L. En el ciclo operado a 1,0 mg O_2/L se usó un menor coeficiente $Y^*_{CO3/NAT}$ (1,5 mol CO_3^{2-}/ mol N-NH_4^+), lo que afectó a la predicción. Esto dio como resultado una estimación por debajo del valor real de NAT, provocando un incremento en la concentración de amoníaco cercana a 5 mg N-NH_3/L al final del ciclo. La principal fuente de variación en el valor de $Y^*_{CO3/NAT}$, fue la variación en el volumen de pulso entregado por la bomba de carbonato. Por esta razón, el volumen de pulso fue recalculado al final de cada ciclo.

Se observa además, que a medida que disminuye la concentración de NAT, el pH incrementa en el rango 7,5 - 8,6, manteniendo una concentración constante de amoníaco. La variación de la temperatura durante el día y la noche produjo oscilaciones en el valor de pH; sin embargo esto no afectó a la predicción de la concentración de NAT, por lo tanto, tampoco al control de la concentración de amoníaco.

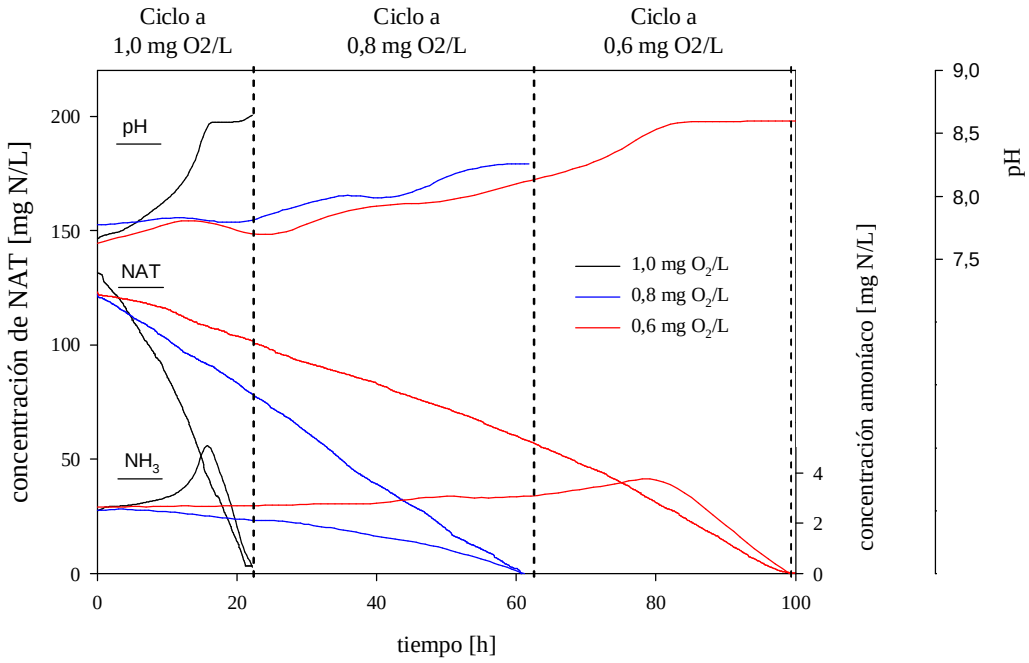

Figura 4.5. Ejemplos de ciclos SBR con control supervisor de pH a diferentes concentraciones de OD. Línea negra ciclo a 1,0 mg O_2/L. Línea azul ciclo a 0,8 mg O_2/L. Línea roja ciclo a 0,6 mg O_2/L

La Figura 4.6 muestra el efecto del control supervisor de pH en la evolución de las concentraciones de nitrito y nitrato para tres ciclos SBR, a distintas concentraciones de OD, correspondientes a los ciclos mostrados en la Figura 4.5.

Cuando el amonio fue oxidado completamente (indicado por cese del consumo de carbonato) el PLC interrumpía la aireación y terminaba el ciclo, evitando así la oxidación del nitrito acumulado. Se puede observar que para todas las concentraciones de OD se obtuvo una alta concentración de nitrito (100 a 110 mg N-NO_2^-/L) y baja concentración de nitrato (< 35 mg N-NO_3^-/L).

La predicción de NAT y el control supervisor de pH demostraron ser efectivos, manteniendo una concentración adecuada de sustrato y determinando el punto exacto de término de la nitrificación. Este método podría ser aplicado en un sistema integrado de remoción biológica de nitrógeno, para la determinación del fin de la nitrificación y el comienzo de la desnitrificación (ver Capítulo VI).

La estrategia operacional permitió una alta tasa de oxidación de amonio y una alta acumulación de nitrito, evitando un gasto mayor de oxígeno, involucrado en la formación de nitrato.

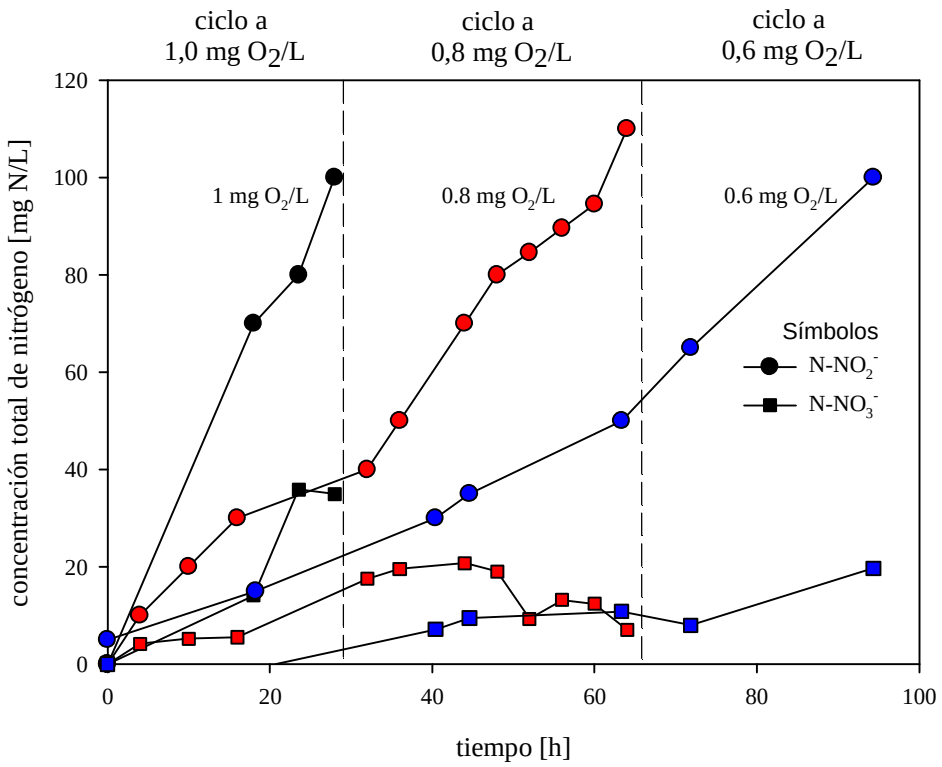

Figura 4.6. Evolución de nitrito y nitrato durante ciclos SBR operados mediante control supervisor de pH. (●) Valores experimentales de nitrito, (■) valores experimentales de nitrato. Color negro ciclo a 1,0 mg O_2/L. Color rojo ciclo a 0,8 mg O_2/L. color azul ciclo a 0,6 mg O_2/L

4.4.4 Tasa de oxidación de amonio en un RDR con nitrificación parcial

La Tabla 4.2 muestra un resumen de los resultados obtenidos para 26 ciclos, operados con el control supervisor de pH.

La actividad de las BAO mostró cambios significativos cuando se disminuyó la concentración de OD de 1,0 a 0,8 mg/L. La tasa de oxidación de amonio cayó de 0,10 a 0,04 kg/m^3/d. Estos resultados indican que esta concentración de OD fue altamente limitante para las BAO.

Por otro lado, las BNO estuvieron permanentemente sometidas a concentraciones inhibitorias de amoníaco y concentraciones limitantes de OD. Por lo tanto, se puede concluir que la causa de la baja actividad de las BNO indicado por la alta acumulación de nitrito, se debió a un efecto combinado de limitación-inhibición.

Tabla 4.2. Resumen operación SBR con la aplicación del control supervisor de pH

Nº de ciclos	OD [mg /L]	c_{NH3} [mg /L]	T (ºC)	r_{NAT} [kgN/m^3/d]	r^*_{NAT} [kgN/m^2/d]	Acumulación de nitrito. [%]	Pérdida de N [%]
10	1,03 ±0,03	2,77±1,57	19,1±1,2	0,10±0,07	4,25±3,12	84 ±5	5 ± 5
9	0,82 ±0,02	3,06±1,04	19,3±0,5	0,04±0,01	1,62±0,55	86 ±8	8 ± 6
7	0,62±0,01	2,89±0,85	22,1±0,7	0,03±0,01	1,45±0,44	88 ±7	13 ±9

r^*_{NAT}: Tasa de oxidación de NAT por área de biopelícula

Debido a que la nitrificación es fuertemente dependiente de la concentración de OD, los mejores resultados, en cuanto a tasa de oxidación de amonio (0,10 kg/m^3/d) y de acumulación de nitrito (84%), fueron obtenidos a 1,0 mg O_2/L. El efecto concentraciones mayores de OD se estudiará en el Capítulo V.

Una ventaja adicional de operar a bajas concentraciones de oxígeno, es la posibilidad de alcanzar condiciones anóxicas al interior de la biopelícula, promoviendo un medio propicio para el desarrollo de NDS. Balances a las especies nitrogenadas al final de los ciclos, mostraron pérdidas del orden de 5 a 13 %, lo que puede indicar la presencia del fenómeno NDS. Debido a la ausencia de MO, se asume que bacterias heterotróficas o algunas autotróficas, pudieron usar material celular como fuente de MO. Schmidt *et al*. (2002) mostraron que algunas BAO en condiciones limitantes de OD, pueden desnitrificar usando al amonio como donador de electrones. Estudios previos han mostrado la existencia de pérdidas de nitrógeno para RDR (Hippen *et al.*, 2001; Pynaert *et al.*, 2002). Helmer *et al.* (1999), en un reactor rotatorio biológico de contacto (RBC) alimentado con lixiviados de un vertedero, encontró pérdidas de nitrógeno del orden de 60%, al operar a bajas concentraciones de OD.

Estos resultados hacen pensar en las ventajas que este tipo de reactor podría tener para promover una remoción integral de nitrógeno, a través de la NDS o Anammox. En este último caso, el control supervisor de pH podría operar en un rango de pH para promover una relación amonio/nitro de 50, relación óptima para las bacterias que realizan el proceso Anammox (Verstraete y Philips, 1998).

La Tabla 4.3 muestra una comparación con otros trabajos reportados en literatura. Las tasas de oxidación de NAT obtenidas en este trabajo, se encuentran en el rango típico.

En comparación a otros reactores de biopelícula, el área específica de un RDR es relativamente baja (<50 m^2/m^3). Sin embargo, si se considera la tasa de remoción por área, los resultados son similares a una nitrificación continua sin acumulación de nitrito, indicando que con el control supervisor de pH se mantuvo un alta actividad de las BAO (Thorn *et al.*, 1996; Wiesmann, 1994).

Tabla 4.3. Comparación de resultados con otros trabajos

Estudio	Reactor	pH	OD [mg /L]	Acumulación de nitrito. [%]	r_{NH4} [kg $N/m^3/d$]	r_{NH4} [$kgN/m^2/d$]
Este estudio	RDR	7,5 – 8,6	0,6-1,0	>84	0,04-0,1	1,45-4,25
(Antileo *et al.*, 2003)	Cont. RDR	7,5 – 7,9	1,3	73 - 90	0,1	---
(Cecen, 1996)	Cont. UF	7,9 – 8,8	1,5 – 4,9	60	0,03	---
(Chen *et al.*, 1991)	Cont. FB	-	OL	60 - 90	0,95	---
(Han *et al.*, 2003)	Cont. UF	8,1	2,5	97	1,2	---
(Joo *et al.*, 2000)	Cont. UF	7,5	0,3 – 1,0	60	2,0	---
(Balmelle *et al.*, 1992)	Bat. Susp.	7,2 – 7,3	6.0	>85	0,03	---
(Botrous *et al.*, 2004)	Cont. FB	-	-	0	2,5	---
(Garrido *et al.*, 1997b)	Cont. BAS	7,0	0,5 – 2,0	50	1,2-4	6,6

UF: *upflow submerged reactor*; FB: *fluidized bed*; Susp: *suspended culture*; cont: *continuous*; bat: *batch*; BAS: *Biofilm Airlift Suspension*; OL: *Oxygen Limitation*.

4.4.5 Distribución y composición bacteriana de la biopelícula

Los resultados de los análisis de epifluorescencia e hibridación *dot-blot* durante los primeros 50 días después de la inoculación se muestran en la Tabla 4.4.

Las bacterias nitrificantes tienen un tiempo de duplicación aproximado de 21 h (Wiesmann, 1994). Por lo tanto, 50 días después de la inoculación del reactor, la concentración de células adheridas al material de soporte fue baja, concordando así con los resultados de epifluorescencia mostrados en la Tabla 4.4. Posterior a 390 días desde la inoculación, se

observó una biopelícula delgada (< 1 mm) y compacta. La Figura 4.7A muestra el inóculo inicial. La Figura 4.7B muestra el material de soporte en la fase de colonización.

Los análisis de hibridación mostraron que existía la presencia de *Nitrosomonas sp* (NSO190) y *Nitrobacter sp* (NIT3). En el inóculo inicial, se pudo detectar la presencia de *Nitrospira marina* y *Nitrospira moscoviensis* (NTSPA 685), ambas pertenecientes a las BNO. Esto puede indicar que la estrategia de operación favoreció al crecimiento de las BAO. Para comprobarlo, se calcularon los % de BAO y BNO presentes en la biopelícula (Ciudad *et al.*, 2006).

De acuerdo a los coeficientes de rendimiento (0,147 g SSV/g N-NH_3 para BAO y 0,042 g SSV/g N-HNO_2 para BNO) (Wiesmann, 1994), cerca del 77 % serían BAO, mientras que el 23 % de la población nitrificante serían BNO. Sin embargo, la Tabla 4.4 muestra una predominancia de las BAO de un 95%, comparado con solamente un 4% de BNO.

Tabla 4.4. Resultados de epifluorescencia e hibridación *dot-blot*

Tiempo de muestreo [d]	Concentración células en la muestra	Sondas de bacterias nitrificantes			BAO	BNO
		BAO	BNO			
		NSO190 [mg ARNr]	NIT3 [mg ARNr]	NTSPA685 [mg ARNr]	[%]	[%]
0 [a]	9,5 x10^7 cel/mL	223,2	38,05	31,84	76	24
30 [b]	2,15x10^{13} cel/m^2	18,84	0,8	ND	96	4
50 [b]	7,92 x10^{16} cel/m^2	27,49	0,8	ND	97	3

[a] biomasa en suspensión para inoculación

[b] biomasa en la biopelícula

ND: No Detectado

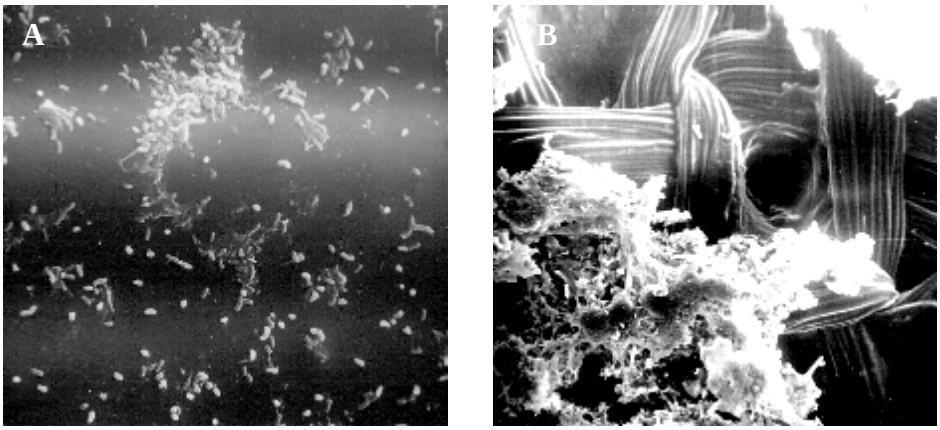

Figura 4.7. Fotografías por SEM. A) biomasa utilizada como inóculo (2500X) y B) material textil parcialmente colonizado (50X)

4.5. CONCLUSIONES

El control supervisor de pH logró mantener efectivamente una concentración constante de amoníaco, consiguiendo con esto inhibir a las BNO e incrementar la actividad de las BAO.

Los resultados muestran que fue posible alcanzar más de un 80% de acumulación de nitrito por 270 d con una alta tasa de oxidación de NAT.

Un interesante resultado anexo fue el desarrollo de un método para la medición en línea de NAT, el cual mostró gran precisión, y dadas sus características podría ser una alternativa económica comparada con los equipos de medición en línea del mercado.

Los análisis microbiológicos revelaron una biopelícula enriquecida con BAO, indicando que se logró promover el crecimiento de BAO por sobre BNO gracias al efecto combinado de limitación por OD y el control supervisor de pH.

CAPÍTULO V. COMPARACIÓN DE OPERACIÓN SBR Y CONTINUA EN UN RDR NITRIFICANTE

Capítulo basado en parte de artículo publicado

Ciudad, G., González, R., Bornhardt, C., and Antileo, C. (2007) Modes of operation and pH control as enhancement factors for partial nitrification with oxygen transport limitation. Water Research, doi:10.1016/j.watres.2007.06.036

5.1. RESUMEN

A objeto de fortalecer la nitrificación parcial en un reactor de biopelícula RDR se usaron operaciones SBR y continua, a las cuales se aplicaron diferentes estrategias de control de pH. Las estrategias de control de pH aplicadas fueron: control supervisor de pH en el rango de 7,5 a 8,6, y pH constante de 7,5 y 8,5. La concentración de OD fue variada entre 0,6 y 5,0 mg O_2/L. Adicionalmente, de los datos obtenidos de la operación continua se ajustó un modelo matemático para simular la nitrificación parcial en un reactor RDR.

El control supervisor de pH permitió mantener una concentración de amoníaco en el rango óptimo para las BAO e inhibitorio para las BNO.

Los resultados indicaron que en ambos modos de operación, la nitrificación parcial fue simultáneamente influenciada por la microcinética (influenciada por el pH y NH_3) y el transporte de oxígeno.

Comparada con la operación continua, la operación en modalidad SBR con control supervisor de pH mostró una nitrificación parcial más estable en el tiempo (249 d) con una acumulación de nitrito > 80%. Análisis moleculares mostraron que en conjunto la aplicación de un control supervisor de pH y bajas concentraciones de OD en la operación SBR, contribuyeron al enriquecimiento de BAO (>95%) sobre las BNO (< 5%). Por lo tanto, que la micro cinética si tiene un efecto significativo en la acumulación de nitrito, incluso en condiciones de limitación por oxígeno.

Por otro lado, la aplicación de un modelo para el interpretar el proceso de nitrificación parcial en un RDR operado en continuo, se ajustó a los resultados experimentales corroborando el efecto de la microcinética.

5.2. INTRODUCCIÓN

La operación SBR en un tratamiento biológico permite un mayor control del proceso, se adapta bien a las fluctuaciones de caudal, y permite llevar a cabo procesos aeróbicos y anóxicos en un mismo reactor.

Antileo *et al*., (2006), en un reactor de biopelícula operado en modalidad SBR, mostraron que la utilización de un control supervisor de pH permite mantener una concentración óptima de amoníaco, incrementando la actividad de las BAO e inhibiendo a las BNO.

Por otro lado, la operación en continuo favorece la aclimatación de las bacterias a condiciones inhibitorias, por lo que se hace difícil mantener una nitrificación parcial estable en el tiempo (Ruiz *et al.*, 2003). Sin embargo, en operaciones en continuo utilizando el proceso SHARON, se ha logrado mantener una población activa de BAO, obteniendo altos rendimiento en la nitrificación parcial (Hellinga *et al.*, 1998).

Tanto la operación SBR como la continua, tienen ventajas y desventajas, las que pueden provocar distintos cambios y respuestas en las poblaciones bacterianas.

En este trabajo se plantea que los distintos modos de operación provocarán cambios en la sensibilidad de las poblaciones BAO y BNO frente a variaciones de pH y oxígeno. Se plantea que la operación SBR permite un mejor control y estabilidad de la nitrificación parcial. Por lo tanto, las metas de este trabajo fueron comparar la eficiencia y estabilidad de la nitrificación parcial en dos modalidades de operación y comparar los datos experimentales de la operación continua con un modelo.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizo el RDR1 descrito en el Capítulo II.

5.3.1 Estrategias operacionales

Con el fin de estudiar la nitrificación parcial, durante 548 días un RDR nitrificante fue sometido a distintas modalidades de operación, SBR y continua. Adicionalmente, se estudió la influencia del transporte de oxígeno y la microcinética (cinética en la biopelícula). Ambos modos de operación fueron conducidos a distintas concentraciones de OD y estrategias de control de pH (Tabla 5.1).

El reactor se comenzó a operar en ciclos SBR con un control supervisor de pH que permitió operar con un pH variable, ajustado automáticamente según la concentración de NAT estimada en línea (Capítulo IV) (Antileo *et al.*, 2006; Ciudad *et al.*, 2007). Posteriormente, el reactor se continuó operando como SBR, pero con pH constante de 7,5 y 8,5. Terminada la

operación SBR, el reactor se operó en continuo con pH constante de 7,5 y 8,5. El control supervisor de pH no se aplicó en la operación continua debido a que la medición en línea de NAT, según la metodología planteada por Antileo *et al*. (2006), no es factible debido a que el sensor virtual se basa en el consumo de carbonato en el tiempo para oxidar una concentración conocida de NAT.

Para estudiar el efecto combinado pH-OD en la nitrificación parcial, cada una de las estrategias de control de pH planteadas se evaluaron a distintas concentraciones de OD, limitantes y no limitantes para las BAO (< 2 y >2 mg O_2/L, respectivamente).

Tabla 5.1. Estrategias de operación aplicadas al RDR

Estrategia de control de pH	OD [mg O_2/L]	Tiempo de operación [d]
Operación SBR		
Control supervisor de pH en el rango 7,5-8,6	0,6 (17), 0,8 (11), 1,0 (31) y 5,0 (10)	249
A pH constate 7,5	0,6 (3) y 5,0 (3)	14
A pH constate 8,5	0,6 (4) y 5,0 (8)	14
Operación Continua		
A pH constate 7,5	0,6; 1,0; 2,0 y 5,0	171
A pH constate 8,5	0,6; 1,0; 2,0 y 5,0	100

( ) número de ciclos realizados

Tanto para la operación SBR como para la operación continua, el reactor fue alimentado con una concentración aproximada de 150 mg N-NH_4^+/L, preparado de un efluente sintético concentrado, especificado en el Capítulo IV.

Operación SBR del RDR1

La operación SBR fue llevada a cabo de acuerdo al Capítulo IV (Antileo *et al.*, 2006; Ciudad *et al.*, 2007).

- Estrategias de control de pH para la operación SBR

i) Control supervisor de pH

Un total de 69 ciclos discontinuos con control supervisor de pH fueron operados a distintas concentraciones de OD. Para fortalecer desde un inicio a las poblaciones BAO, se aplicaron concentraciones de OD limitantes, y posteriormente concentraciones no limitantes (Tabla 5.1). El *set point* de OD fue cambiado cada vez que se alcanzó una variación ≤ 10% entre en las concentraciones de salida del reactor entre cada ciclo.

Para una descripción más detallada del control supervisor de pH, ver el Capítulo IV.

ii) pH constante

Se realizaron ciclos a pHs constantes de 7,5 y 8,5 monitoreados con el sensor virtual de NAT. Cada condición de pH fue evaluada a dos concentraciones de OD (Tabla 5.1).

Operación continua del RDR1

Posterior a la operación SBR, el reactor fue acondicionado para operar en continuo, aplicando un TRH constante de 12 h.

Debido a que fueron eliminadas las etapas de llenado y vaciado del reactor, la biopelícula tuvo un menor estrés de corte. Por lo tanto, para evitar posibles interferencias por crecimiento de biomasa fuera del disco, se realizó una continua limpieza de las paredes del reactor.

- Estrategia de control de pH para la operación continua

La operación a pH constante se dividió en dos etapas. En la primera etapa se aplicó un pH constante de 7,5 por 171 d. En la segunda etapa se aplicó un pH constante de 8,5 por 100 días. Para ambas etapas, el *set point* de OD fue cambiado cada vez que se alcanzó un estado estacionario, indicado por ≤ 10% de variación en las concentraciones de salida del reactor, para las concentraciones de OD mostradas en la Tabla 5.1.

5.3.2 Criterio de comparación entre la modalidad SBR y continua

Como criterio de comparación de la eficiencia de la nitrificación parcial entre la operación SBR y la continua, se usó: Tasa de oxidación de amonio (debido a que los ciclos SBR terminaban cuando el amonio era oxidado completamente, el grado de eficiencia se estudió en valores de tasa de oxidación de amonio para ambas operaciones) (Ecuación (2.10)) y grado de acumulación de nitrito (Ecuación (2.8)).

5.3.3 Biomasa y toma de muestras

Para el caso de la operación SBR, se siguió el protocolo descrito en el Capítulo IV. Para la operación continua se tomaron muestras diariamente desde el seno del líquido.

Para un seguimiento de la evolución de las poblaciones de BAO y BNO se realizaron análisis microbiológicos descritos en el Capítulo II.

5.3.4 Modelación de un RDR nitrificante continuo

De la operación continua a pH 7,5 y 8,5 se obtuvo suficiente información para ajustar un modelo matemático (Anexo A1) para simular la nitrificación parcial, descrito previamente por Antileo *et al.* (2007). El modelo posee 32 parámetros, de los cuales se escogieron los que afectaron significativamente a las concentraciones de salida de NAT, nitrito y nitrato, 10 en total (principalmente a constantes cinética de Haldane para BAO y BNO) (Tabla 5.2) (Romero, 2006). Para cuantificar la influencia de estos parámetros en el modelo, se simularon las concentraciones de los compuestos nitrogenados, al variar los parámetros en el rango mostrado en la Tabla 5.2 (rangos obtenidos de literatura). El modelo fue simulado a las mismas condiciones que el reactor real. Los parámetros que mostraron variación significativa en los compuestos nitrogenados fueron: $k_{L,}$ $\mu_{máx,\ BAO}$, $\mu_{máx,\ BNO}$ y $K_{i,\ BNO}$. Por lo tanto, el ajuste se hizo en base a estos parámetros.

Para ajustar el modelo se seleccionaron datos experimentales de los estados estacionarios de cada condición de la operación continua (pHs y ODs).

A través del programa Mathlab, se obtuvo el error cuadrático medio (ECM) el cual entrega el error entre la simulación y los datos empíricos. El ECM fue normalizado por las diferencias entre los valores máximos y mínimos de cada una de las especies nitrogenadas (obtenida de la evaluación a 0,6 y 5,0 mg O_2/L)

$$ECM = \left[\left\{ \frac{[NAT]_{\exp} - [NAT]_s}{\Delta[NAT]} \right\} + \left\{ \frac{\left[N-NO_2^-\right]_{\exp} - \left[N-NO_2^-\right]_s}{\Delta\left[N-NO_2^-\right]} \right\} + \left\{ \frac{\left[N-NO_3^-\right]_{\exp} - \left[N-NO_3^-\right]_s}{\Delta\left[N-NO_3^-\right]} \right\} \right]^2 \quad (5.1)$$

Posteriormente, el ECM fue minimizado a través de la función de optimización *fmincon* de Mathlab (Romero, 2006). Esto significa determinar qué los valores de los parámetros entregan el menor ECM entre los datos experimentales y los resultados arrojados por el simulador del modelo.

Tabla 5.2. Rango de trabajo para cada parámetro

Parámetro	Rangos de trabajo
k_L	(0,1 – 0,5) m/h.
λ	(0,1 – 1,0) 1/mh$^-$.
$\mu_{máx, BAO}$	(0,01-0,10)1/h.
$\mu_{máx, BNO}$	(0,01-0,10) 1/h.
$K_{i,BAO}$	(0,001-0,010) mg N-HNO_2/L.
$K_{i,BNO}$	(0,05-0,90) mg N-NH_3/L.
$Ks_{,BAO}$	($1x10^{-5}$–$1x10^{-1}$) mg N-HNO_2/L.
$Ks_{,BNO}$	($1x10^{-5}$–$1x10^{-1}$) mg NH_3-N/L.
K'_{BAO}	(0,1-0,7) mg O_2/L.
K'_{BNO}	(1,0-2,0) mg O_2/L.

Con el modelo se construyó un simulador del proceso biológico, desarrollado en el ambiente Mathlab/Simulink 6.5.

Para que el modelo simulara la eficiencia del proceso se definieron dos índices de eficiencia α (% de degradación de NAT) y β (% de acumulación de nitrito), expresados en las Ecuaciones (5.1) y (5.2), respectivamente. Con la suma de α y β se definió una función objetivo denominada "Z", que entregó la eficiencia total.

$$a = \frac{[TAN_0] - [TAN]}{[TAN_0]} \cdot 100 \qquad (5.2)$$

$$b = \frac{\left[N - NO_2^-\right]}{\left[N - NO_2^-\right] + \left[N - NO_3^-\right]} \cdot 100 \qquad (5.3)$$

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados obtenidos de la operación SBR y continua de un RDR con nitrificación parcial.

5.4.1 Operación SBR

La Figura 5.1 resume 249 días de la operación con control supervisor de pH, mostrando la influencia de la concentración de OD en la tasa de oxidación de NAT y porcentaje de acumulación de nitrito. En la Figura 5.1A la tasa de oxidación de NAT muestra un comportamiento típico de la cinética de Monod frente a la concentración de OD, siendo lineal a concentraciones ≤ 2,0 mg O_2/L (línea recta en la Figura 5.1A). Esto indica que la nitrificación fue llevada a cabo en todo momento bajo condiciones limitantes de oxígeno, donde probablemente las BAO consumieron el OD en los primeros µm de biopelícula (de Beer y Schramm, 1999; Okabe y Watanabe, 2000). El cambio de pendiente en la tasa de oxidación de NAT a 5,0 mg O_2/L indica que la concentración de OD es menos limitante para las BAO. La Figura 5.1B muestra una alta estabilidad en la nitrificación parcial, con > 80% de acumulación de nitrito, no mostrando diferencias significativas a distintas concentraciones de OD, indicando que la microcinética (pH y NH_3) tiene un rol esencial en el mantenimiento de una nitrificación parcial estable. Estos resultados se contraponen con los de Garrido *et al.*

(1997b) en un reactor air-lift, que señalaron que la acumulación de nitrito solo se observa en el rango 0,5-1,5 mg O_2/L. Una posible explicación a este fenómeno es que, además del deficiente transporte de oxígeno característico de estos reactores, el control supervisor de pH inhibió por NH_3 a las BNO (Abeling y Seyfried, 1992; Anthonisen *et al.*, 1976).

Para comprobar que el control de la concentración del amoníaco puede incrementar la nitrificación parcial incluso en condiciones limitantes de OD durante una operación SBR, tres estrategias de control de pH fueron evaluadas a concentraciones limitantes (0,6 mg O_2/L) y no limitantes de OD (5,0 mg O_2/L) (Tabla 5.3). A 0,6 mg O_2/L la tasa de oxidación de NAT no fue afectada por el pH. Sin embargo, a 5,0 mg O_2/L el control supervisor de pH incrementó significativamente la tasa de oxidación de amonio. Por lo tanto, la nitrificación fue controlada simultáneamente por el transporte de OD hacia la biopelícula y la microcinética.

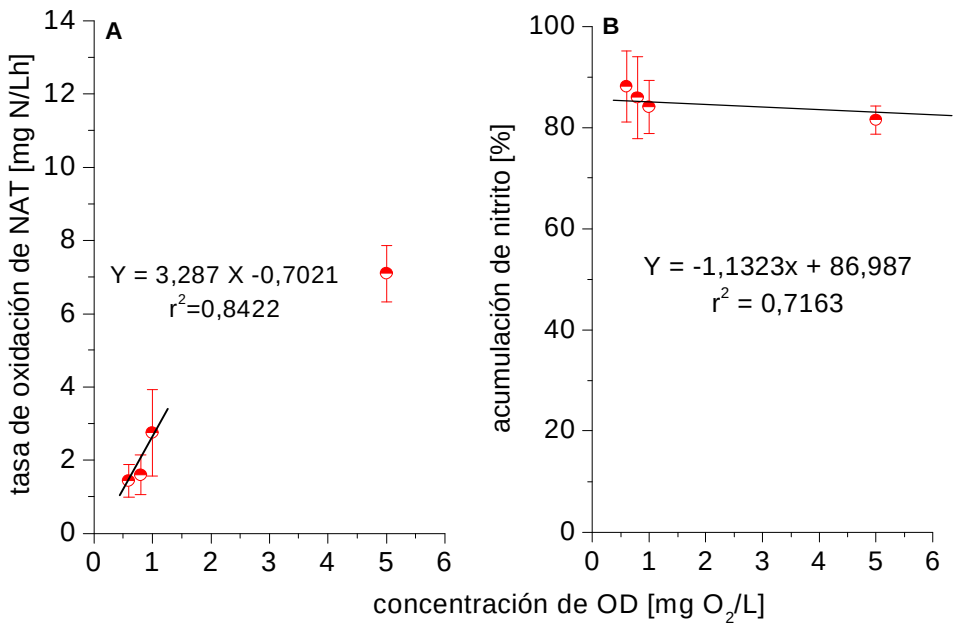

Figura 5.1. Operación SBR con control supervisor de pH a distintas concentraciones de OD. A) tasa de oxidación de NAT y B) porcentaje de acumulación de nitrito

Tabla 5.3. Resumen de resultados para diferentes estrategias de control de pH en la operación SBR a concentraciones limitantes y no limitantes de oxígeno

OD [mg O_2/L]	Estrategia control de pH	Amoníaco [mg N/L]	T [ºC]	r'_{NAT} [mg N/m^2/d]	r_{NAT} [mg N/L/h]	Acumulación de nitrito [%]
0.62 ± 0.02	**Control supervisor de pH**	2,89 ± 0,85	22 ± 1	1396 ± 441	1,43 ± 0,43	88 ± 4
	pH 7,5	1 a 2	23 ± 2	1222 ± 234	1,21 ± 0,23	89 ± 2
	pH 8,5	6 a 21	20 ± 2	1246 ± 157	1,23 ± 0,10	91 ± 1
5.00 ± 0.02	**Control supervisor de pH**	3 ± 0,26	19 ± 2	7335 ± 300[a]	7,25 ± 0,30[a]	80 ± 3[a]
	pH 7,5	0 a 1,5	18 ± 2	4289 ± 277[c]	4,25 ± 0,10[c]	68 ± 2[c]
	pH 8,5	0 a 15	20 ± 2	5679 ± 392[b]	5,61 ± 0,20[b]	74 ± 1[b]

a, b, c diferencias significativas entre las tres estrategias de control pH (P= 0.05)

A una concentración limitante de OD no hubo diferencias significativas en la acumulación de nitrito. Sin embargo, a diferencia de las estrategias a pH constante, a 5,0 mg O_2/L el control supervisor de pH mantuvo sobre un 80 % de acumulación de nitrito, indicando que la operación SBR con control supervisor de pH permitió una nitrificación parcial estable gracias al control de la microcinética (pH y concentración de amoníaco).

La Figura 5.2 ilustra la operación SBR bajo distintas estrategias de control de pH a 5,0 mg O_2/L. La concentración de NAT fue estimada en línea de acuerdo a Antileo *et al.* (2006), encontrándose una alta correlación con los datos experimentales (Figura 4.3A). La Figura 5.2A muestra un ciclo SBR con control supervisor de pH, en el cual el *set point* de pH cambió paulatinamente entre 7,8 y 8,6 para mantener la concentración de amoníaco en el rango de 3 a 4 mg N-NH_3/L. La Figura 5.2B y 5.2C muestran un ejemplo para pH constante de 7,5 y 8,5. A pH 7,5 la concentración de amoníaco se mantuvo bajo 2 mg N-NH_3/L, y decreció gradualmente en el tiempo (Figura 5.2B). A pH 8,.5 el ciclo comenzó con una concentración de amoníaco de 15 mg N/L (Figura 5.2C), la cual es inhibitoria para las BAO (Anthonisen *et al.*, 1976; Kim *et al.*, 2005; Villaverde *et al.*, 1997). A diferencia de los ciclos con control supervisor, tanto para pH 7,5 y 8,5, la concentración de amoníaco disminuyó drásticamente en el

tiempo, alcanzando valores limitantes para la oxidación de NAT, alargando la duración de los ciclos. En general el control supervisor de pH permitió operar ciclos más cortos, como se observa en las abscisas de la Figura 5.2.

Al considerar que la eficiencia de la nitrificación parcial está relacionada con mantener en el tiempo altas tasas de oxidación de NAT (menor duración de los ciclos) y altos porcentajes de acumulación de nitrito (menor requerimiento de OD), en la operación con el control supervisor de pH se obtuvieron mejores resultados que con la operación a pH constante, debido a que permitió racionalizar el sustrato (NH_3) de manera eficiente, alcanzando así una mayor tasa de oxidación de NAT. Además, se alcanzó una alta estabilidad en la acumulación de nitrito, la cual se hizo independiente de la concentración de oxígeno aplicada. Otra ventaja de la operación con el control supervisor de pH fue en evitar un shock inicial por una alta concentración de amoníaco a las BAO, como en el caso de la operación a pH constante 8,5.

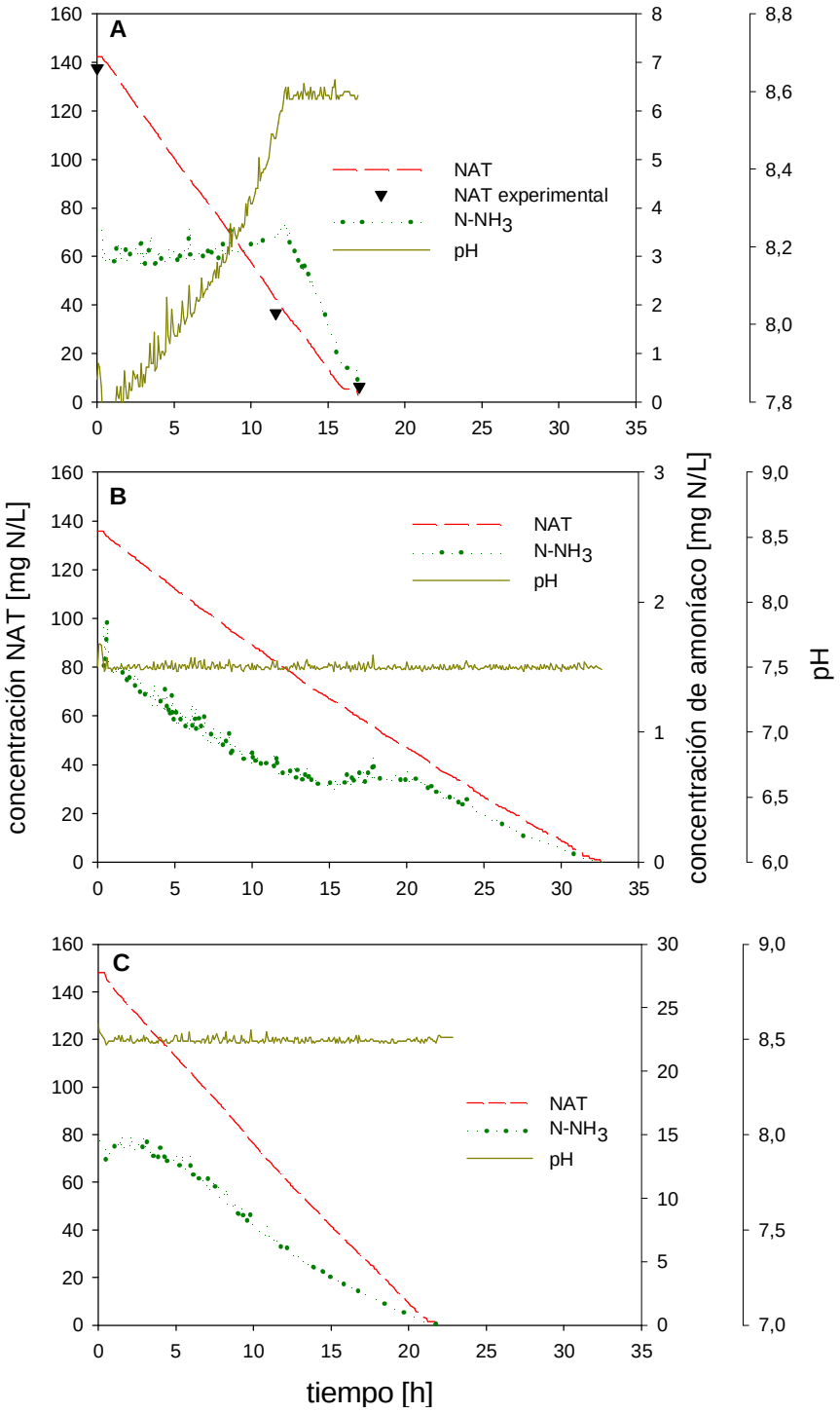

Figura 5.2 Estrategias de control de pH en la operación SBR a 5,0 mg O_2/L A) control supervisor de pH, B) pH constante de 7,5 y C) pH constante de 8,5

5.4.2 Operación continua

La Figura 5.3 muestra un resumen de 271 días de la operación continua, mostrando la influencia de la concentración de OD en la tasa de oxidación de NAT y en el porcentaje de acumulación de nitrito, para una operación a pH constante de7,5 y 8,5.

Al igual que para el caso de la operación SBR, la tasa de oxidación de NAT muestra un comportamiento tipo Monod con la concentración de OD, siendo lineal a concentraciones de OD ≤ 2,0 mg O_2/L para los dos pH estudiados (Figura 5.3A). Por lo tanto, el transporte de OD al interior de la biopelícula fue el paso limitante.

La Figura 5.3B muestra que la acumulación de nitrito fue inestable y dependió fuertemente de la concentración de OD. Adicionalmente, la Figura 5.3 muestra que el pH tuvo un claro efecto, tanto en la tasa de oxidación de NAT como en el porcentaje de acumulación de nitrito, indicando que la microcinética influye significativamente, incluso a concentraciones de OD tan bajas como 0,6 mg O_2/L.

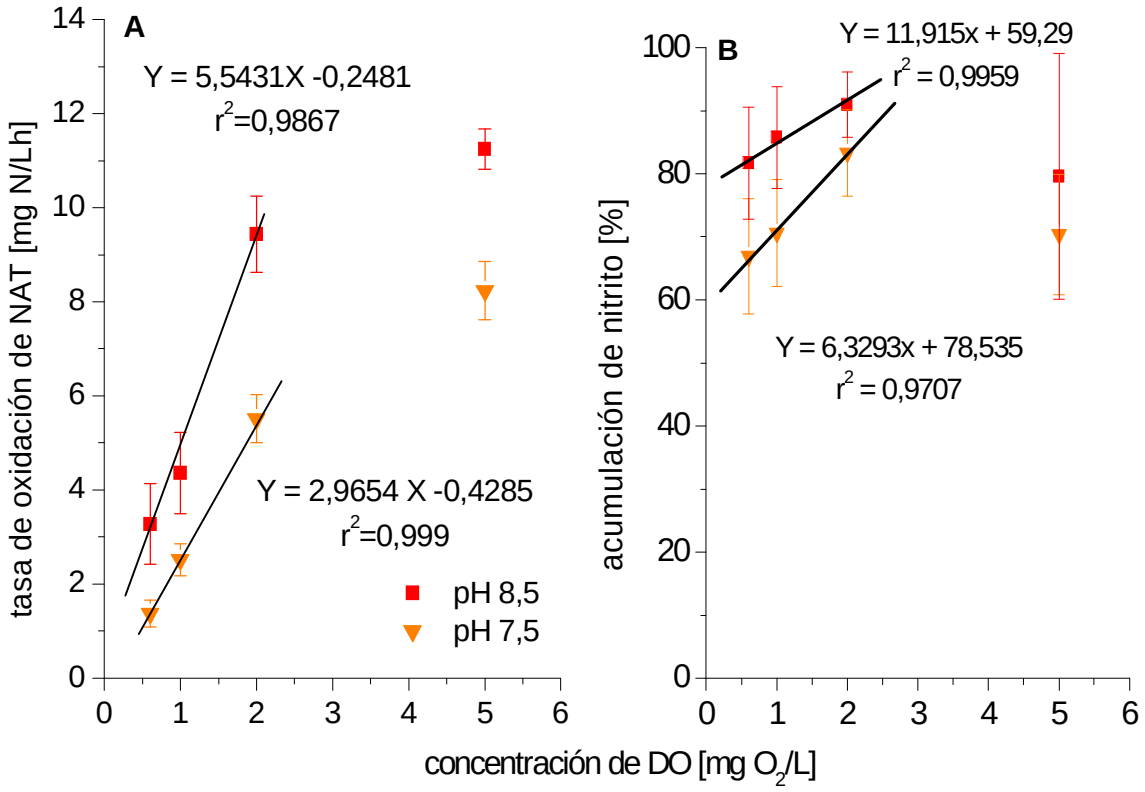

Figura 5.3. Operación continua con pH constante a distintas concentraciones de OD. A) Tasa de oxidación de amonio y B) porcentaje de acumulación de nitrito

Resultados similares fueron obtenidos por Wang y Yang (2004), utilizando reactores *batch* con biomasa suspendida, mostrando que al aumentar de 0,5 a 1,5 mg O_2/L, la tasa máxima de oxidación de amonio aumentó un 50 % a pH 7,5 y 15% a pH 8,5. Por lo tanto, a bajas concentraciones de OD, parámetros como el pH pueden limitar el proceso de oxidación de amonio.

La Figuras 5.4 y 5.5 muestran la operación continua a dos pH. A pH 7,5 se alcanzó una baja degradación de NAT para concentraciones de OD ≤ 2,0 mg O_2/L. A 5,0 mg O_2/L la concentración de nitrato comenzó a aumentar en el reactor, lo que indica la activación de las BNO (Figura 4.5). Además, se observó una concentración de amoníaco ≤ 2,0 mg N/L, disminuyendo con cada aumento en la concentración de OD.

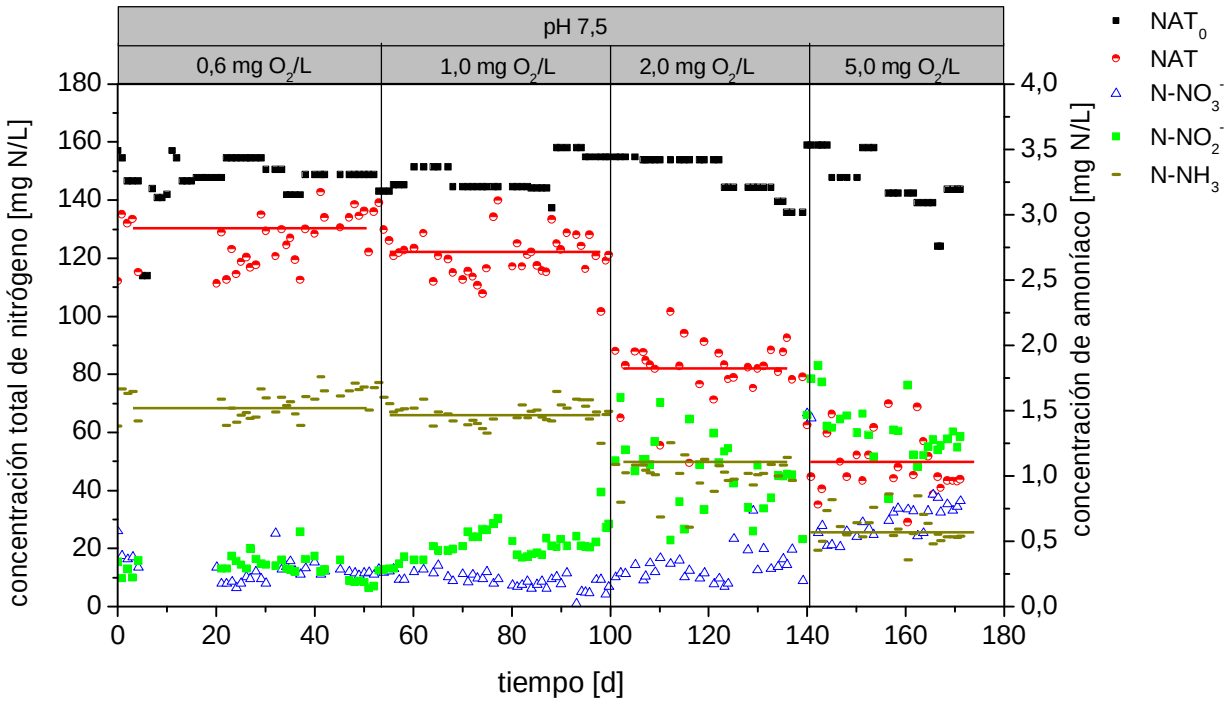

Figura 5.4. Operación continua a pH 7,5 para diferentes concentraciones de OD. Las líneas – y – corresponden a los promedios del periodo en estado estacionario para NAT y N-NH_3, respectivamente

A pH 8,5 se observó la misma tendencia que a pH 7,5. Sin embargo, una alta concentración de amoníaco fue observada (2-15 mg N/L) la cual es inhibitoria para las BNO (Abeling y Seyfried, 1992; Anthonisen *et al.*, 1976), lo que explica la alta acumulación de nitrito observada.

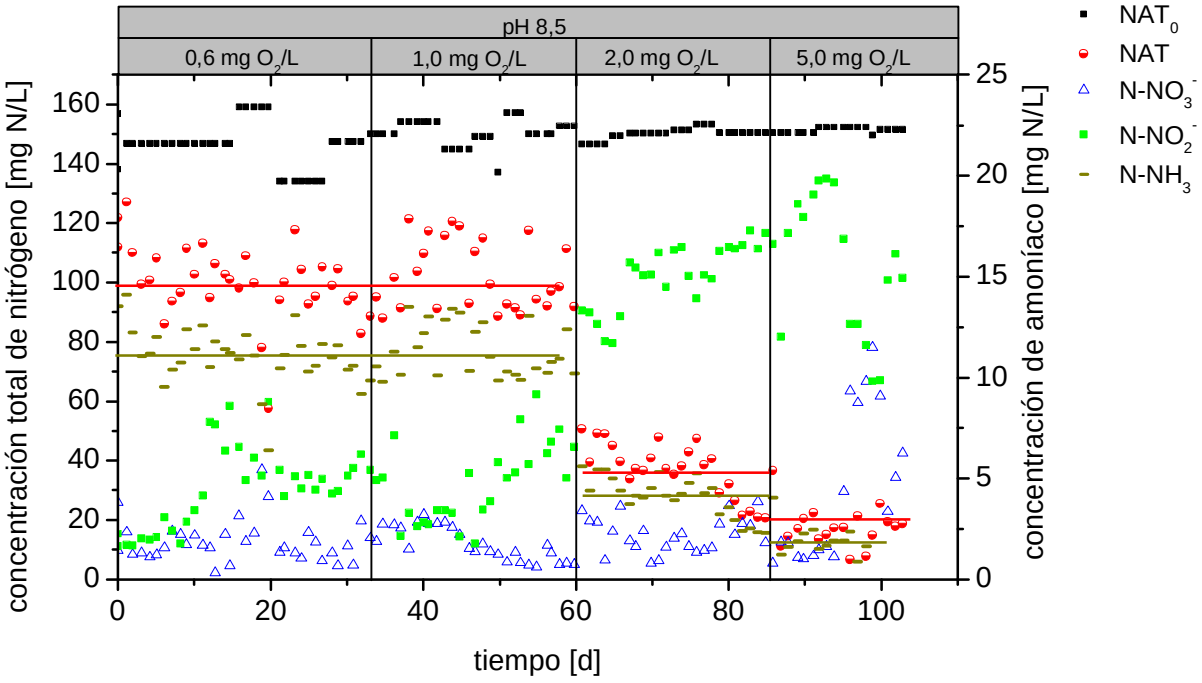

Figura 5.5. Operación continua a pH 8,5, a diferentes concentraciones de OD. Las líneas – y – corresponden a los promedios del periodo en estado estacionario para NAT y N-NH3, respectivamente

Las Figuras 5.6 y 5.7 muestran un resumen de las Figuras 5.4 y 5.5, respectivamente. La Figura 5.6 muestra el promedio de los estados estacionarios de los compuestos nitrogenados a pH 7,5. La Figura 5.7 muestra el promedio de los estados estacionarios de los compuestos nitrogenados a pH 8,5.

Con estos resultados se ajustó el modelo matemático.

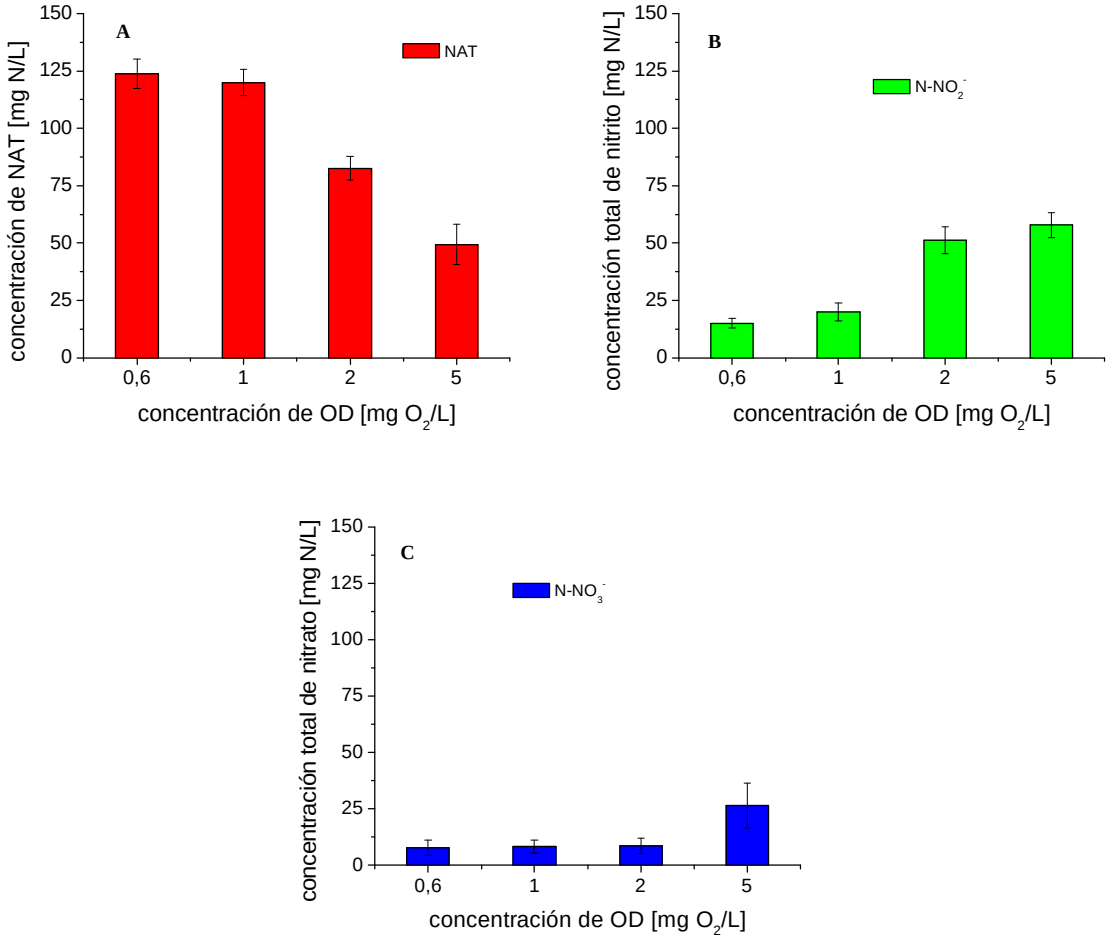

Figura 5.6. Promedios de los estados estacionarios de la operación continua a pH 7,5 a diferentes concentraciones de OD. A) Evolución de la concentración de NAT; B) evolución de la concentración de nitrito y C) evolución de la concentración de nitrato

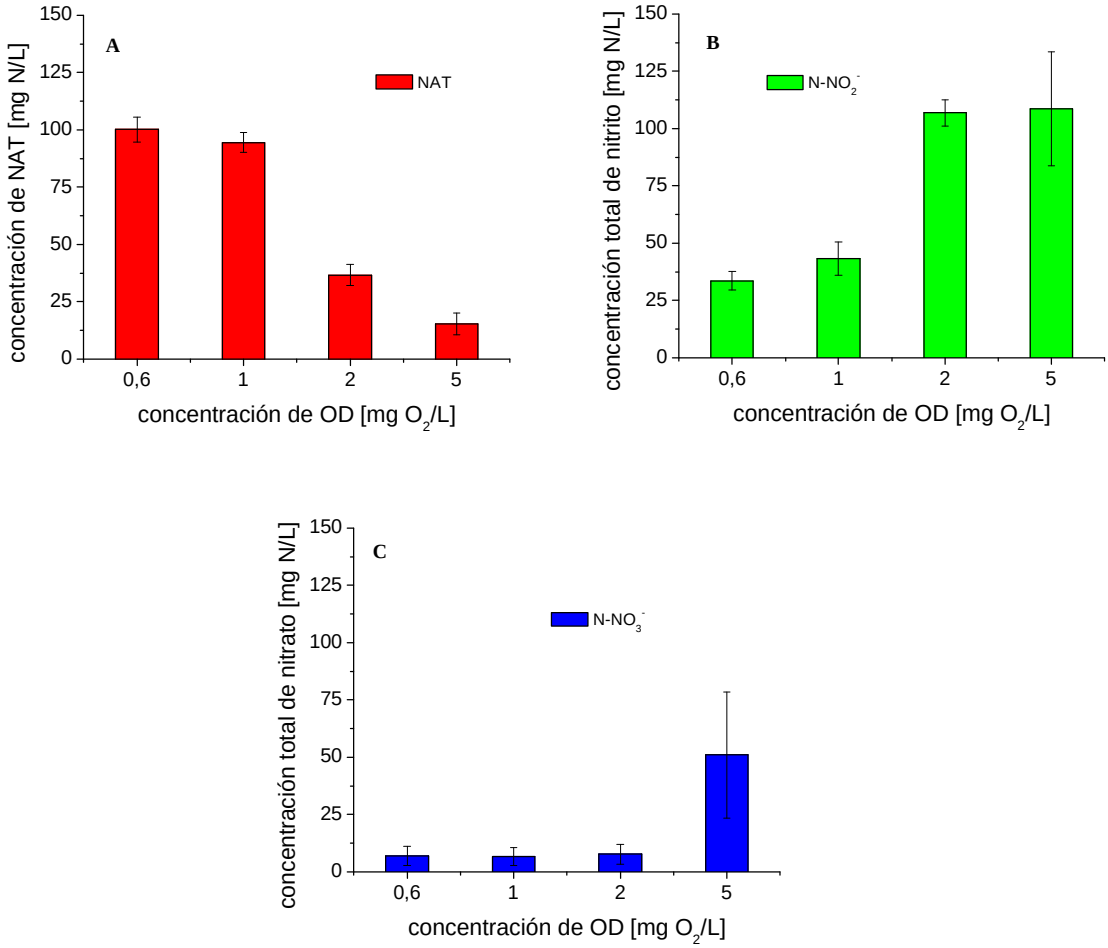

Figura 5.7. Promedios de los estados estacionarios de la operación continua a pH 8,5 a diferentes concentraciones de OD. A) Evolución de la concentración de NAT; B) evolución de la concentración de nitrito y C) evolución de la concentración de nitrato

Del estudio en continuo se puede concluir que fue difícil mantener una nitrificación parcial estable en el tiempo, atribuido principalmente a que no existió un control de la concentración de amoníaco, a pesar de esto se obtuvieron altas tasas de oxidación de NAT. Además, posiblemente las poblaciones de BNO se aclimataron a las altas concentraciones de amoníaco (Villaverde *et al.*, 2000).

5.4.3 Análisis microbiológicos para la operación SBR y continua

La Tabla 5.4 muestra la evolución de la distribución bacteriana en el tiempo. El porcentaje de distribución bacteriana se calculó de acuerdo al Capítulo II (Antileo *et al.*, 2006; Ciudad *et al.*, 2006). La operación con el control supervisor de pH contribuyó al enriquecimiento de las BAO, con más de 95% en 249 d de operación. Este resultado se explica porque desde la formación de la biopelícula, el reactor fue sometido constantemente a concentraciones de amoníaco óptimas para el crecimiento de BAO e inhibitorias para las BNO. Esto sumado a una constante limitación por oxígeno, incidió en el bajo porcentaje de distribución de BNO en la biopelícula ($\leq$ 5%).

Trabajos como los de Wang y Yang (2004) y Ruiz *et al.* (2003), señalan que no es posible mantener una alta acumulación de nitrito en el largo plazo utilizando inhibición por amoníaco en reactores de biopelícula, debido a que existe una aclimatación bacteriana. Sin embargo en este trabajo, mediante la aplicación de una operación SBR sumado a un control supervisor de pH, se mantuvo una acumulación de nitrito mayor a 80% por 249 días.

Se puede concluir que los mejores resultados para la operación SBR, en cuanto a la tasa de oxidación de NAT y el índice de acumulación de nitrito, fueron con el control supervisor de pH a 5,0 mg O_2/L.

Los porcentajes de las BAO y BNO encontrados en la biopelícula del RDR1 operado en continuo fueron 63±4 y 37±4 %, respectivamente (Tabla 5.4). Trabajos realizados por Villaverde *et al.* (2000), señalan que operaciones continuas promueven un mayor tiempo de adaptación a las bacterias a condiciones desfavorables, como la inhibición por amoníaco. Por lo tanto, este fenómeno podría explicar el aumento en el porcentaje de poblaciones de BNO.

En la operación continua, a diferencia de la operación SBR, no existió un vaciado del reactor, favoreciendo la formación de un biopelícula esponjosa y menos compacta, debido a un bajo estrés de corte. La Figura 5.8 muestra fotografías tomadas en diferentes periodos de operación, en la cual se observa el crecimiento y colonización del material textil (Figura 5.8A, 5.8B y 5.6C). La Figura 5.8D muestra una biopelícula compacta a consecuencia de la operación SBR. La Figura 5.8E muestra una fotografía tomada en la operación continua (700 d de operación), observándose una biopelícula esponjosa y débilmente adherida al material textil. Liu y Tay (2002) mostraron la importancia de las condiciones hidrodinámicas en la formación de gránulos y biopelícula más compactos.

Tabla 5.4. Hibridación ARNr 16s *dot-blot* de la biopelícula, para determinar la distribución bacteriana de BAO y BNO durante la aplicación de dos modalidades de operación

Días desde la inoculación	Estrategia de control de pH	OD [mg O_2/L]	BAO [%]	BNO [%]	Sondas de bacterias nitrificantes			
					BAO		BNO	
					NSO190 [mg ARN]	NS01225 [mg ARN]	NIT3 [mg ARN]	NTSPA685 [mg ARN]
150 (*SBR)	**Control supervisor de pH**	0,6	96,0	4,0	18,84	10,04	0,80	ND
220 (*SBR)		1,0	97,0	3,0	27,49	16,12	0,80	ND
430 (RC)	**pH 7,5**	5,0	61,5	38,5	2,80	4,93	1,38	1,7
520 (RC)	**pH 8,5**	1,0	67,0	33,0	2,38	5,40	1,26	1,4

*SBR con control supervisor de pH. RC: reactor continuo. ND: no detectado

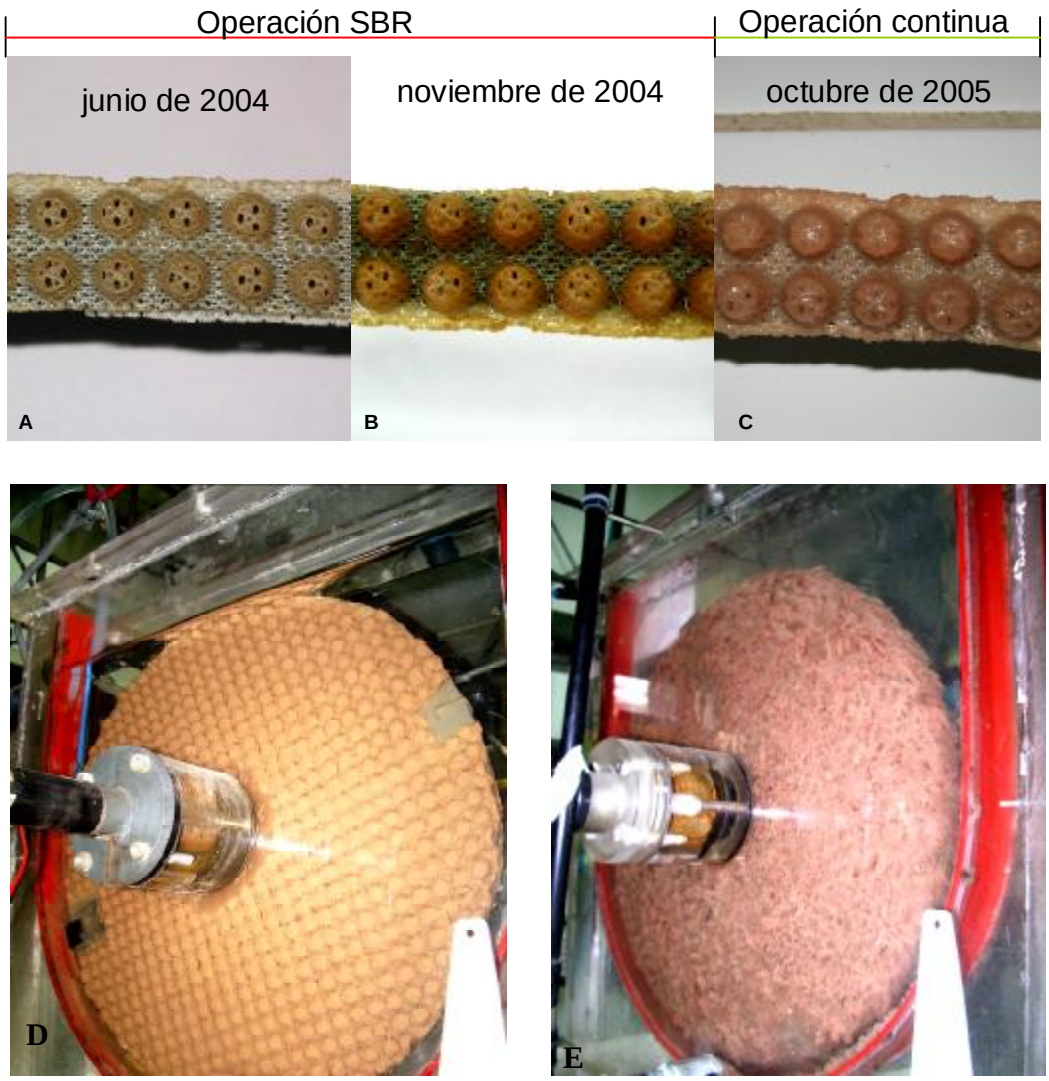

Figura 5.8. Fotografías tomadas de la operación SBR y continua. A), B) y C) corresponden a muestras de biopelícula tomadas para análisis microbiológicos, D) reactor operado en modalidad SBR y E) reactor operado en continuo

5.4.4 Modelación de un RDR operado en continuo

La Tabla 5.5 muestra el resultado de la rutina de optimización para ajuste de los parámetros del modelo, donde se observa que el k_L fue el que presento un mayor cambio.

Tabla 5.5. Parámetros iniciales (Valor inicial), rango de trabajo de cada uno de los parámetros (mínimo y máximo) y parámetros entregados por la rutina de ajuste.

Parámetro	Valor inicial	mínimo	máximo	Valor final
$\mu_{máx, BAO}$	0,032	0,010	0,100	0,03622
$\mu_{máx, BNO}$	0,045	0,010	0,150	0,04486
k_L	0,220	0,010	0,600	0,28971
$K_{i,BNO}$	0,100	0,050	0,150	0,10951

Las Figuras 5.9; 5.10 y 5.11 muestran una comparación de simulaciones y datos experimentales a distintas concentraciones de OD, para lo cual se utilizaron los promedios de los estados estacionarios de la operación continua (Figuras 5.6 y 5.7). Para el caso de la concentración de NAT el modelo ajustó sin mayores diferencias a pH 7,5 (Figura 5.9A). Sin embargo, a pH 8,5 se presentaron diferencias a 0,6 y 2,0 mg O_2/L (Figura 5.9B). Del mismo modo para el caso de la concentración de nitrito el modelo ajustó sin mayores diferencias a pH 7,5 (Figura 5.10A). A pH 8,5 se encontraron diferencias provocadas principalmente por la inestabilidad del sistema real a 5 mg O_2/L (Figura 5.10B). La concentración de nitrato fue la que presentó mayores diferencias con los datos simulados (Figura 5.11), principalmente a pH 8,5 (Figura 5.11B).

Estos resultados prueban que el modelo predice con gran precisión las tendencias de los compuestos nitrogenados al ser variadas las condiciones de operación.

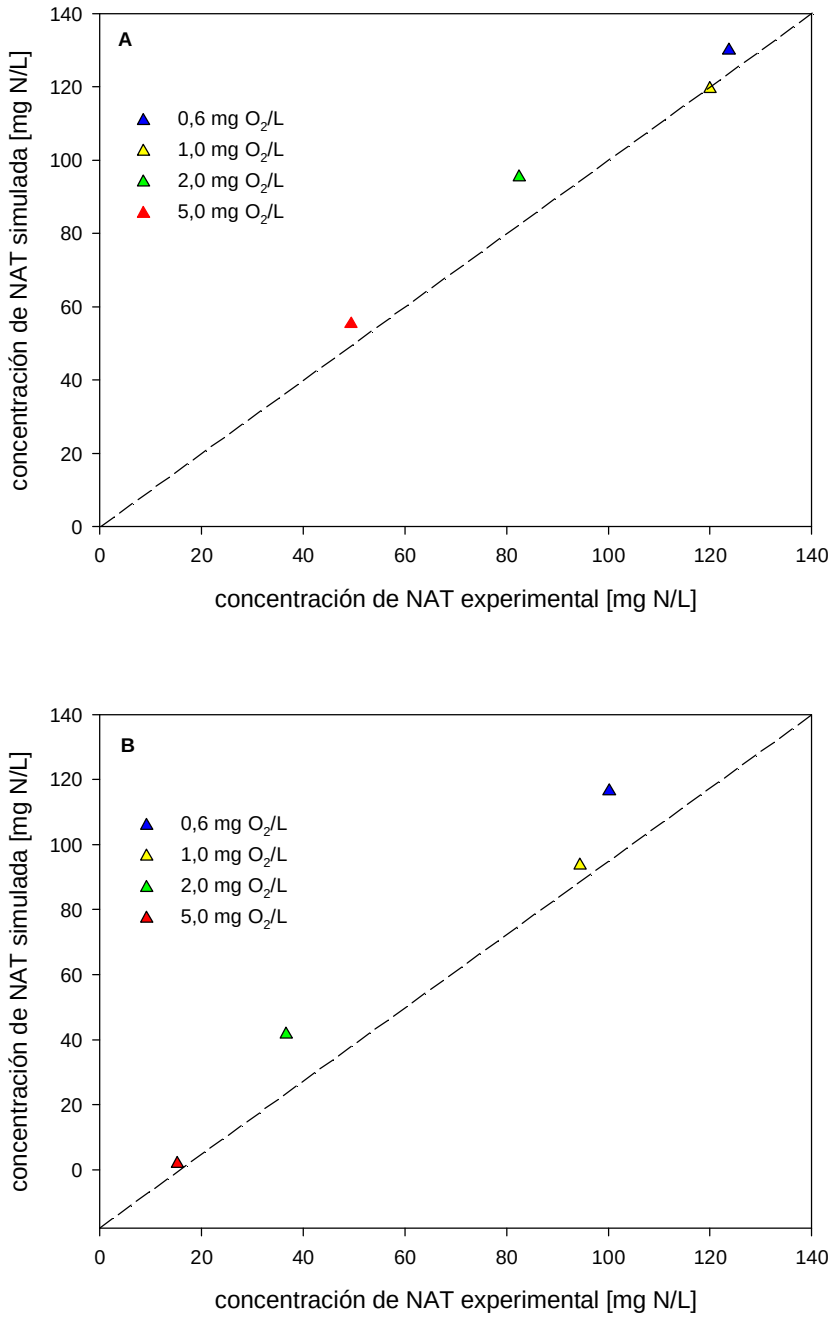

Figura 5.9. Comparación de NAT experimental versus NAT simulado a distintas concentraciones de OD. A) operación continua a pH 7,5 y B) operación continua a pH 8,5. La línea punteada indica la zona de máximo ajuste

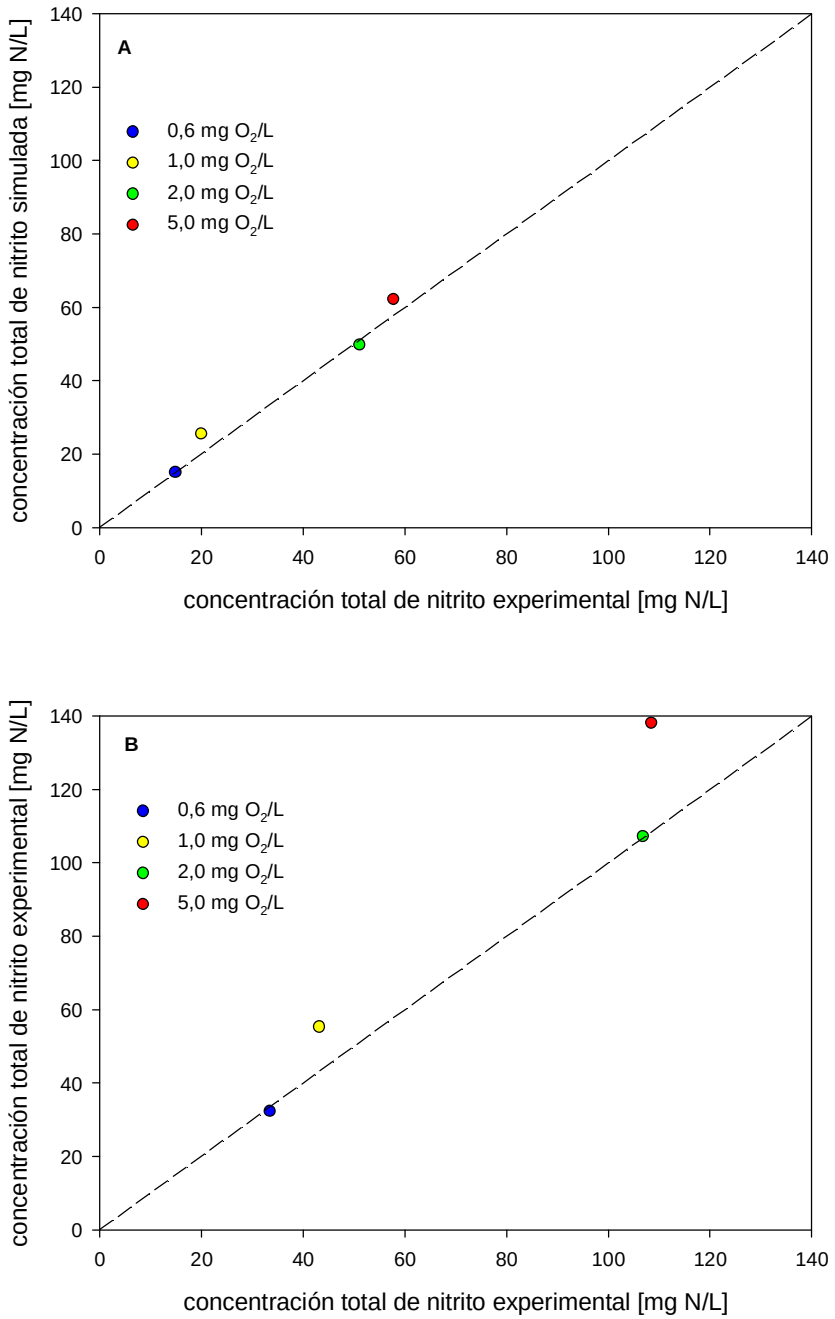

Figura 5.10. Comparación de la concentración de nitrito experimental versus la simulada, a distintas concentraciones de OD. A) operación continua a pH 7,5 y B) operación continua a pH 8,5. La línea punteada indica la zona de máximo ajuste

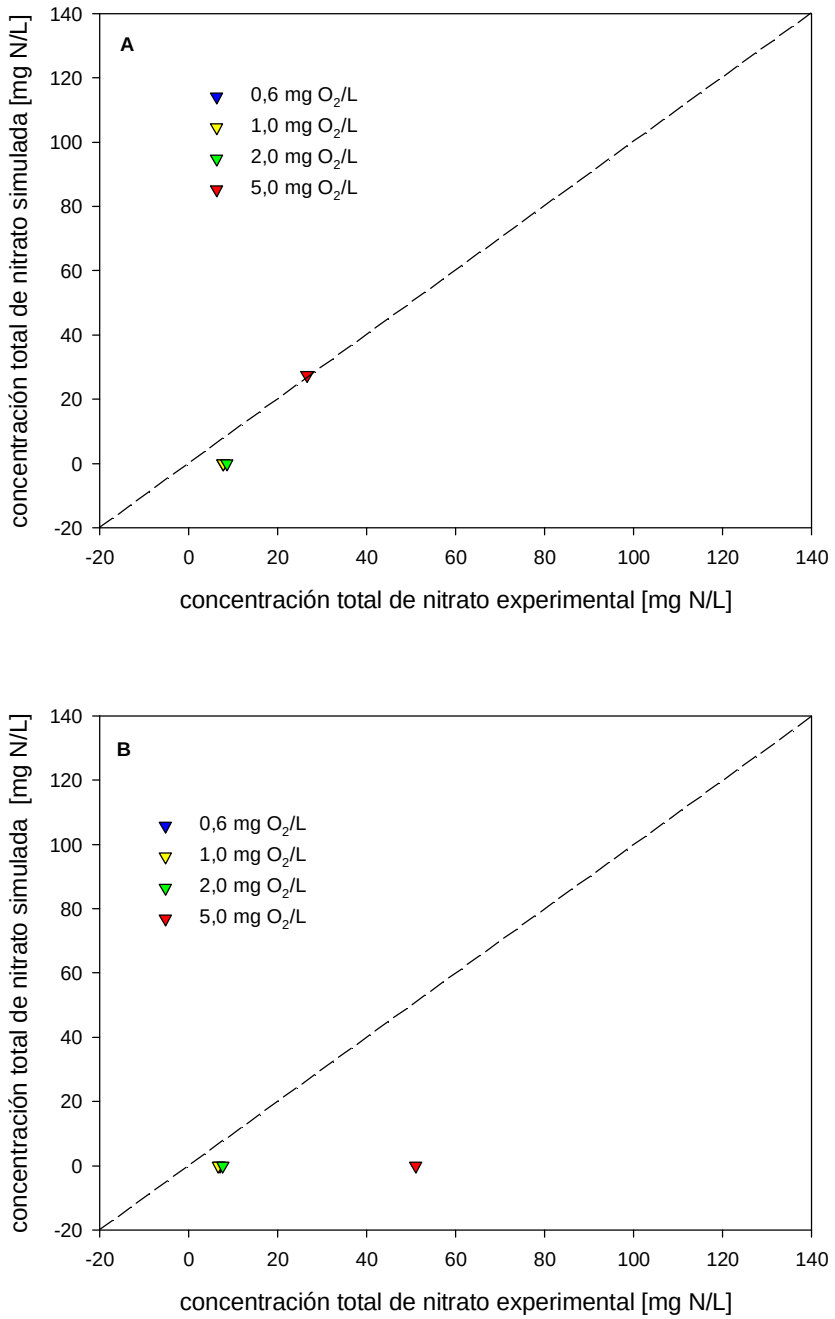

Figura 5.11. Comparación de la concentración de nitrato experimental versus la simulada, a distintas concentraciones de OD. A) operación continua a pH 7,5 y B) operación continua a pH 8,5. La línea punteada indica la zona de máximo ajuste

Las Figuras 5.12; 5.13 y 5.14 muestran simulaciones superficie respuesta del efecto conjunto del pH y la concentración de OD en la eficiencia de la nitrificación parcial. Todas las simulaciones mostradas fueron realizadas en el rango de 7,5 a 8,5 de pH, y de 0,5 a 5,0 mg O_2/L de OD. La Figura 5.12 muestra una simulación generada por el modelo, la cual entrega combinaciones de pH y OD para aumentar la acumulación de nitrito (beta, Ecuación (5.3). El modelo predice que la mayor acumulación de nitrito (óptimo) se obtendrá al operar en la zona comprendida entre 7,9 y 8,5 de pH, y entre 1,5 y 5,0 mg O_2/L. Se observa que la acumulación de nitrito aumenta con la concentración de OD, debido a que incrementa la oxidación de amonio a nitrito, pero no la oxidación de nitrito a nitrato. Esto indica que el sistema esta sometido a limitación por oxígeno provocado por la baja transferencia de masa.

Por otro lado, el pH también tiene una alta influencia en la acumulación de nitrito, tanto a altas como a bajas concentraciones de OD. A pH < 8,0 la acumulación de nitrito disminuye, notándose mayormente a concentraciones de OD < 2,5. Esto concuerda con los resultados experimentales, indicando que en conjunto con la OD, la microcinética es un factor a considerar a la hora de optimizar la nitrificación parcial.

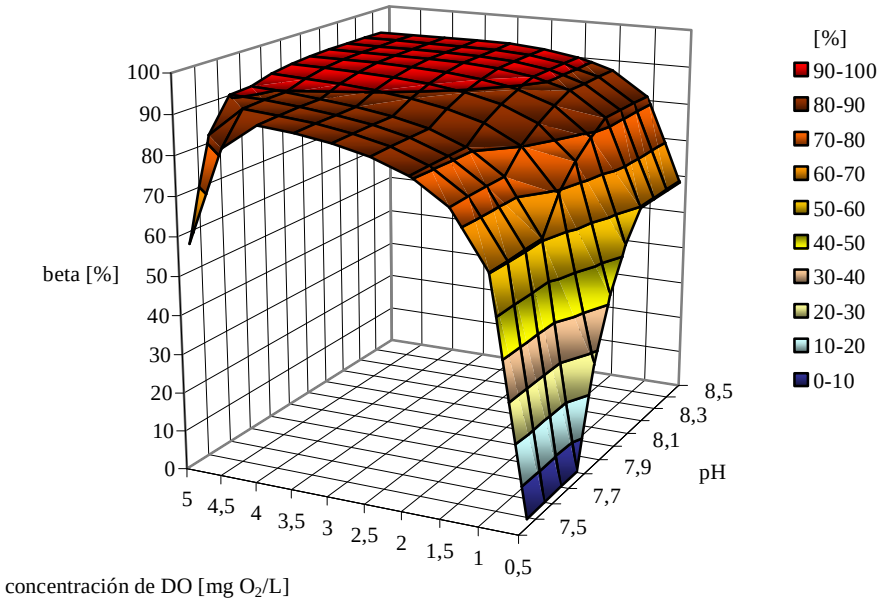

Figura 5.12. Simulación del efecto de la concentración de OD y pH en la acumulación de nitrito, en un RDR operado en continuo con un TRH de 12 h, a 20 ºC

La Figura 5.13 muestra una simulación generada por el modelo, la cual entrega valores de pH y OD para aumentar la degradación de NAT (alfa, Ecuación (5.2)). Se observa un comportamiento directamente proporcional de la degradación de NAT con el aumento de la concentración de OD, lo que se confirma con resultados experimentales mostrados anteriormente. Además, se observa que el pH influye significativamente en la oxidación de NAT a todas las concentraciones de OD. El modelo predice que la mayor oxidación de NAT se obtendrá al operar en la zona comprendida entre 7,9 y 8,5 de pH, y entre 3,5 y 5,0 mg O_2/L. El modelo predice un brusco cambio de pendiente entre pH 7,5 y pH 8,5; esto implica que alguno de los parámetros cinéticos de las BAO agregados al modelo puede estar sobredimensionado. Para mejorar la respuesta del modelo, deberán realizarse en futuras experiencias, experimentos entre pH 7,5 y 8,5.

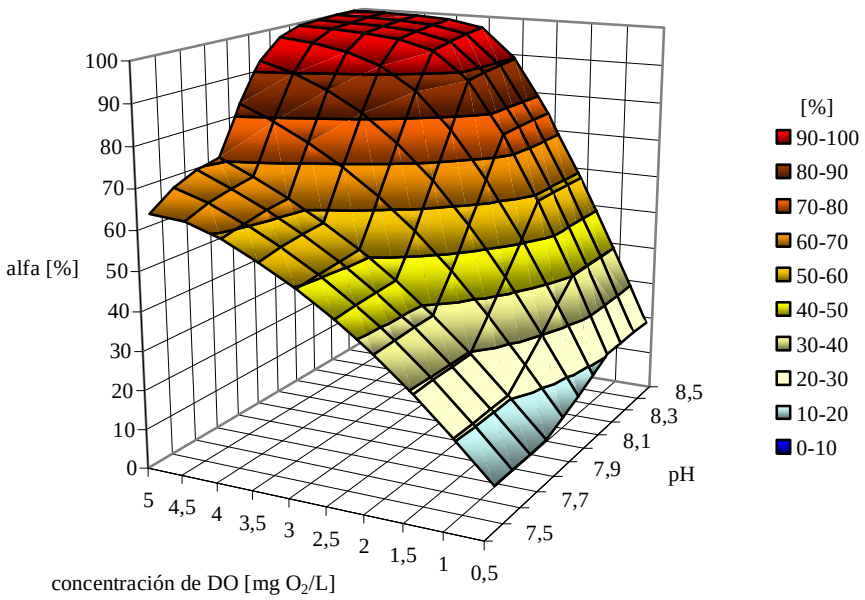

Figura 5.13. Simulación del efecto de la concentración de OD y pH en la oxidación de amonio, en un RDR operado en continuo con un TRH de 12 h, a 20 ºC

La Figura 5.14 muestra el efecto del pH y OD en la función objetivo Z. A mayor Z, mayor degradación de NAT y mayor acumulación de nitrito. El modelo predice que para este tipo de reactores la nitrificación parcial tendrá una mayor eficiencia al operar en la zona comprendida entre 8,0 y 8,5 de pH, y entre 3,5 y 5,0 mg O_2/L.

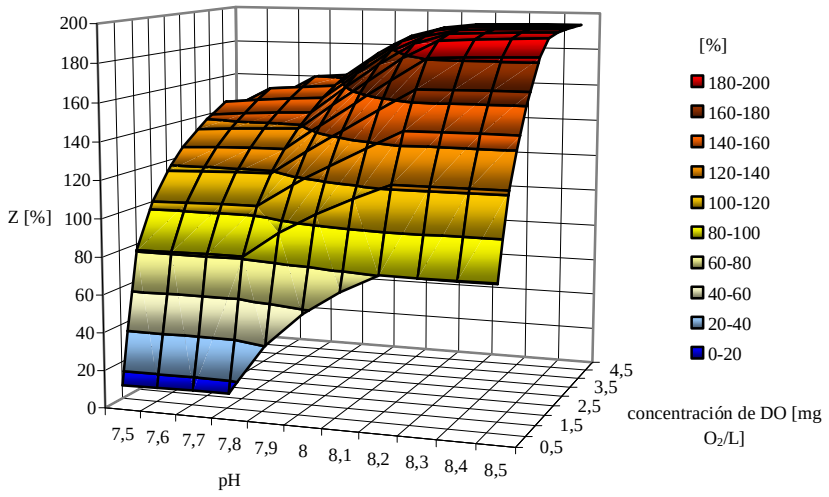

Figura 5.14. Simulación del efecto de la concentración de OD y pH en la función objetivo Z, en un RDR operado en continuo con un TRH de 12 h, a 20 ºC

El modelo fue capaz de mostrar los cambios producidos en los compuestos nitrogenados al variar las condiciones ambientales. Con esta herramienta, es posible construir supervisores virtuales, que combinados con la información experimental, predigan zonas óptimas de trabajo. Esta herramienta ha sido probada con éxito en un CSTR (*continuous stirrer tank reactor*) nitrificante (Azócar *et al.*, 2007). La Figura 5.15 muestra el diagrama del supervisor virtual desarrollado por Romero (2006) con los datos experimentales producidos en esta investigación, que está actualmente operando.

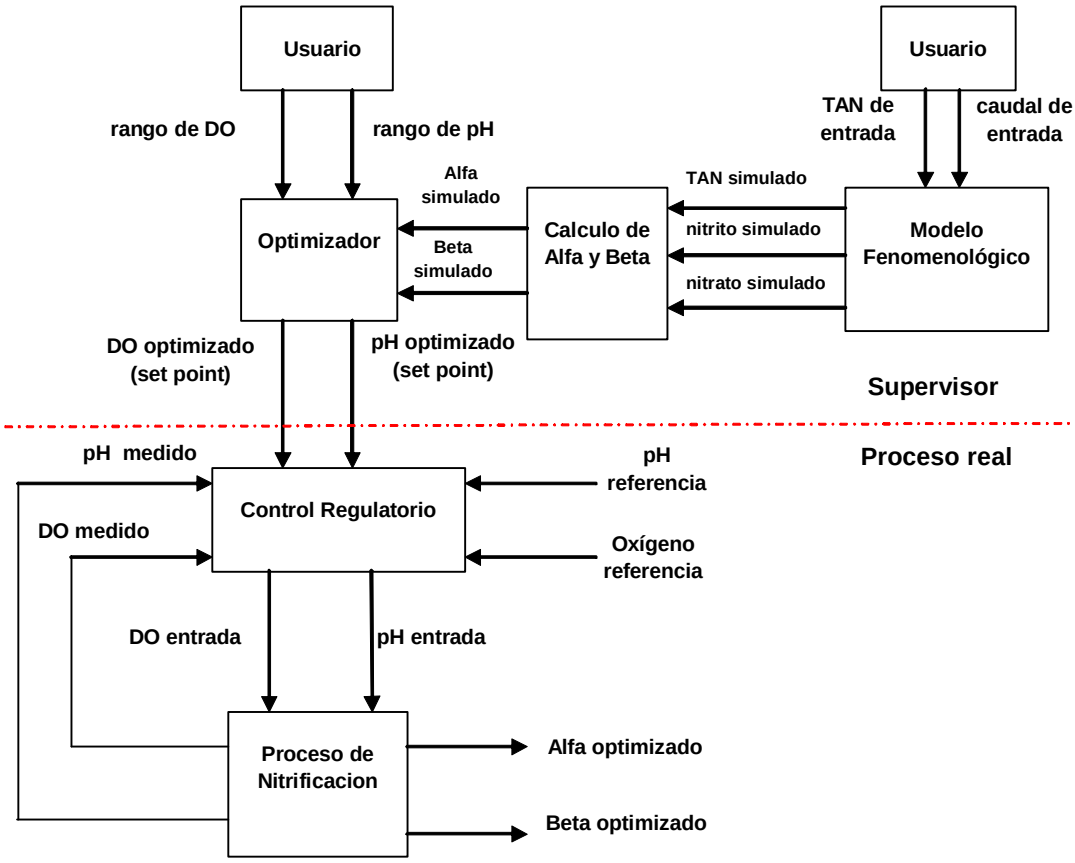

Figura 5.15. Diagrama de bloques del supervisor virtual. Alfa: % degradación de amonio, Beta: % acumulación de nitrito

5.5. CONCLUSIONES

Se pudo observar que en ambos modos de operación, la nitrificación fue controlada simultáneamente por el transporte de oxígeno y la microcinética. Por lo tanto, una adecuada estrategia de control de pH puede incrementar la eficiencia de la nitrificación parcial, incluso a concentraciones limitantes de OD.

La operación SBR con el control supervisor de pH indujo una fuerte inhibición en las BNO por amoníaco. Esto produjo una alta estabilidad en el % de acumulación de nitrito (> 80% por 249 días). El control supervisor de pH incrementó la tasa de oxidación de amonio. Sin embargo, el OD fue el factor más influyente.

Para el caso de la oxidación de NAT, el OD juega rol un protagónico en ambas modalidades de operación. Sin embargo, al analizar la eficiencia global de la nitrificación parcial, la aplicación del control supervisor de pH entrega más estabilidad al sistema. Además, permite un seguimiento en línea del proceso, lo que tiene ventajas con respecto a una operación continua.

Los resultados microbiológicos mostraron que la operación SBR, sumada a las estrategias de control de pH y OD, favorecieron el enriquecimiento de las BAO por sobre las poblaciones de las BNO, indicando que las condiciones ambientales pueden seleccionar poblaciones bacterianas en un reactor de biopelícula.

La operación continua produjo un cambio en la distribución de la microflora nitrificante, alcanzando los porcentajes estequiométricos de BAO y BNO en el biopelícula (63±4 y 37±4 %, respectivamente). Estos resultados muestran que existió crecimiento de las poblaciones de BNO en condiciones inhibitorias de amoníaco.

El modelo para la operación continua se ajustó bien a los resultados experimentales, prediciendo con exactitud las tendencias de los compuestos nitrogenados. Concordando con los resultados experimentales, se observó que la microcinética tuvo un claro efecto al aumentar el pH a bajas concentraciones de OD, aumentando el porcentaje de acumulación de nitrito y degradación de NAT.

CAPÍTULO VI. REMOCIÓN GLOBAL DE NITRÓGENO EN UN REACTOR DE BIOPELÍCULA RDR OPERADO EN MODO SBR

6.1. RESUMEN

Con la finalidad de operar un reactor RDR con remoción conjunta de MO y nitrógeno, fueron aplicadas herramientas de monitoreo y control en tiempo real. Éstas permitieron determinar la duración de la etapa aeróbica (nitrificación) y anóxica (desnitrificación), en una operación SBR. El reactor fue operado a dos concentraciones de OD en la etapa aeróbica (1,5 y 2,0 mg O_2/L) y a 3 relaciones DQO/N (2; 3; y 4 mg DQO/mg N) en la etapa anóxica, lo que dio un total de 6 combinaciones. La etapa limitante fue la aeróbica, tomando aproximadamente de un 70 a 80 % del tiempo total del ciclo para ser realizada.

La relación DQO/N afectó el desempeño de la etapa aeróbica y anóxica, incrementando la tasa de oxidación de NAT de 3 a 7 mg N/L/h y remoción global de nitrógeno de un 58 a un 90 %, al incrementar ésta de 2 a 4 mg DQO/mg N.

La remoción global de nitrógeno fue la suma de los aportes de NDS en la etapa aeróbica y desnitrificación en la etapa anóxica; sin embargo, esta última gobernó la remoción global de nitrógeno (entre un 60 y 80 % de remoción de nitrógeno).

6.2. INTRODUCCIÓN

Estrategias de monitoreo y control en tiempo real de las etapas aeróbicas y anóxicas de un reactor SBR, pueden conducir a realizar la nitrificación y desnitrificación en un solo reactor.

Antileo *et al.* (2006), en un RDR nitrificante operado en modalidad SBR, propusieron una nueva metodología para: a) mejorar la eficiencia de la nitrificación parcial y b) controlar y monitorear en tiempo real la duración de la oxidación de NAT.

Por otro lado, debido a que en la reacción biológica de desnitrificación existe una producción de OH^-, trabajos como los de Gee y Kim (2004), han utilizado esta propiedad para determinar en línea la duración de la etapa anóxica, midiendo cambios en el perfil de pH.

Por lo tanto, en una operación SBR con un monitoreo en tiempo real del pH, puede ser posible alcanzar y mantener una remoción integral de nitrógeno vía nitrito. La meta de este estudio fue implementar la nitrificación-desnitrificación vía nitrito en un reactor de biopelícula, usando herramientas de control en tiempo real.

6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para estos experimentos se utilizó el RDR2 descrito en el capítulo II

6.3.1 Estrategias de operación

En orden de promover la nitrificación–desnitrificación, un RDR fue operado en ciclos SBR, consistente de una etapa aeróbica y una etapa anóxica.

Para la etapa aeróbica, el reactor fue alimentado con 150 mg N-NH_4^+/L, preparado según lo descrito en el capítulo VI. La composición del sustrato de la etapa anóxica se muestra en la Tabla 6.1 (Ruiz *et al.*, 2006). En esta experiencia se utilizó un pH constante de 7.5.

Etapa aeróbica

La etapa aeróbica de la operación SBR fue llevada a cabo de acuerdo al Capítulo IV (Antileo *et al.*, 2006; Ciudad *et al.*, 2007).

Etapa anóxica

La etapa anóxica comenzó automáticamente cuando terminó la etapa aeróbica y consistió de: a) Interrupción del control de pH y OD (solo registro), b) apagado de bomba de carbonato, c) adición de un volumen de pulso, con una concentración conocida de sustrato anóxico (Tabla 6.1), d) monitoreo en tiempo real de la evolución del pH, e) término del ciclo y adquisición de datos, indicado por un cese del incremento del pH y f) vaciado completo del reactor para el comienzo de un nuevo ciclo.

Tabla 6.1. Composición del sustrato usado en la etapa anóxica

Compuesto	Fórmula	Concentración	Unidad
Acetato de sodio	$NaCH_3COO$	50	g/L
Peptona	C_5H_{12}	4,8	g/L
Extracto de levadura	-	2	g/L
Carbonato de sodio	Na_2CO_3	10	g/L
Fosfato dibásico	K_2HPO_4	70	g/L
Fosfato monobásico	KH_2PO_4	54	g/L
Micronutrientes		13,5	mL/L

Efecto de la relación DQO/N y concentración de OD

A objeto de analizar el efecto de la relación DQO/N y la concentración de OD en el proceso global de remoción de nitrógeno, fueron aplicadas 6 combinaciones de estos parámetros (2,0 OD x 3 DQO/N), como sigue:

-En la etapa aeróbica se evaluaron dos concentraciones de OD a pH constante 7,5: 2,0 y 1,5 mg O_2/L

-En la etapa anóxica se evaluaron 3 relaciones DQO/N: 4, 3 y 2 mg DQO/mg N. Las relaciones DQO/N se calcularon en base a la concentración de N-NO_x^- al término de la etapa aeróbica, esto indicó la concentración de DQO agregada en la etapa anóxica.

6.3.2. Biomasa y toma de muestras

Para la inoculación del RDR se creó una mezcla de cultivos suspendidos de bacterias quimiautolitotróficas y heterotróficas, compuesta por 70% de bacterias nitrificantes, provenientes de un reactor con nitrificación pura, y 30% (referida en relación a la concentración total de biomasa) proveniente de una planta de tratamiento de residuos urbanos, operada en modalidad SBR (Planta de Tratamiento de Pucón, Chile). Esta mezcla se realizó para favorecer a las bacterias nitrificantes, que crecen más lento que las heterotróficas (Wiesmann, 1994).

Para aclimatar a las bacterias, antes de la inoculación fueron cultivadas en modalidad SBR con 50 mg N-NH_4^+, 2,0 mg O_2/L, pH 7,5 y una relación DQO/N de 4. Al mismo tiempo, el inóculo fue sometido a alternancias de periodos aeróbicos (3h) y anóxicos (1h), por medio de un timer conectado a un aireador.

Cuando el cultivo mixto mostró actividad desnitrificante (remoción de nitritos y nitratos, incremento del pH y producción de burbujas de nitrógeno), se procedió a la inoculación del RDR con una concentración inicial de 2 g SSV/L.

Durante la operación SBR, muestras para el análisis de NAT, nitrito, nitrato y DQO, fueron tomadas al inicio y al término de las etapas aeróbica y anóxica.

El detalle de esta metodología se puede encontrar en el capítulo II.

6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1 Puesta en marcha y aplicación de herramientas para medición en tiempo real

Posterior a la inoculación, el reactor fue operado por 2 meses a 50 mg N-NH_4^+/L, DQO/N de 4, pH 7,5 y 1,5 mg O_2/L. La actividad de las BAO fue incrementando en el tiempo, hasta alcanzar un estado estacionario. Después del ciclo Nº 37, la actividad de las BAO no mostró cambios significativos, manteniéndose en 6,4 mg N/L/h (Figura 6.1). La acumulación de nitrito aumentó en el tiempo desde 0 %, hasta alcanzar entre 30 y 40 %. Este bajo porcentaje se puede explicar por la incorporación de nueva biomasa nitrificante, debido a que el inóculo usado como fuente de bacterias heterotróficas, provenía de un reactor que además realiza nitrificación (reactor SBR de Pucón), compensando así la baja actividad de las BNO obtenidas en experimentos anteriores.

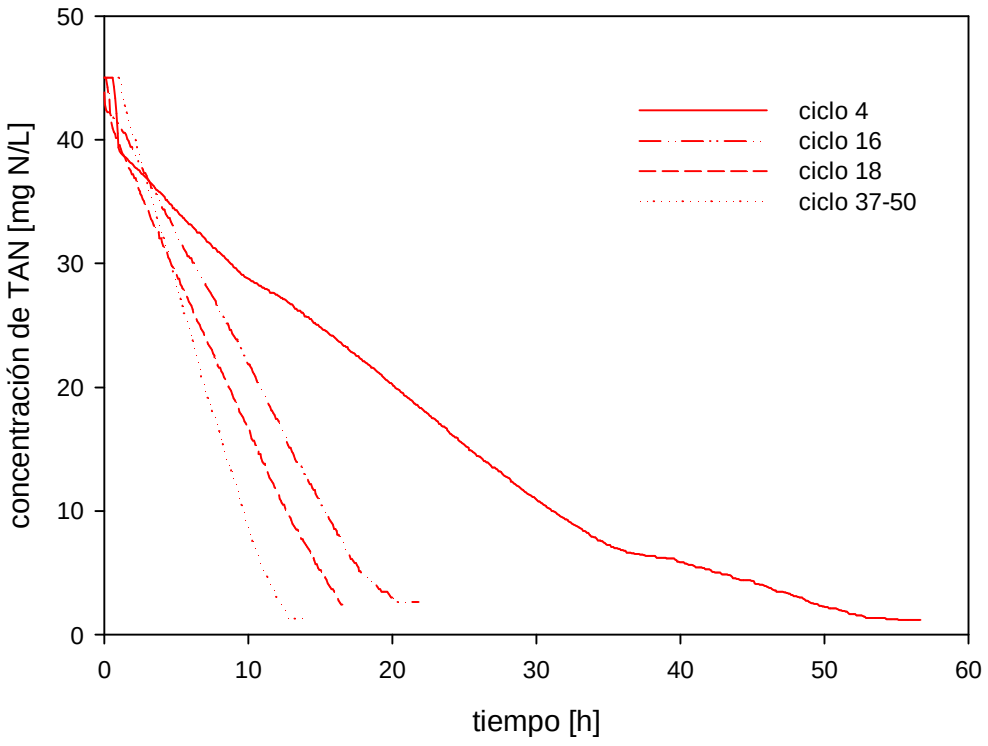

Figura 6.1. Ciclos del periodo de puesta en marcha del RDR2

El objetivo de estos experimentos fue aplicar y probar dos herramientas para la determinación en tiempo real de la duración de las etapas aeróbicas y anóxicas. La Figura 6.2A muestra un ciclo típico de eliminación conjunta de MO y nitrógeno, con oxidación de amonio a nitrito y nitrato durante la etapa aeróbica, y consumo de nitrito, nitrato y MO, durante la etapa anóxica. El término de la etapa aeróbica se determinó con el fin del consumo de la solución carbonato (Antileo *et al.*, 2006; Ciudad *et al.*, 2007) (Figura 6.2B). Este método mostró una alta precisión. Además permitió un seguimiento en línea de la concentración de NAT.

En la etapa anóxica se realizó un monitoreo del pH. Debido a la reducción de nitrito y nitrato, el pH incrementó inmediatamente cuando fue agregada la MO. Cuando el pH dejó de incrementar se provocó un cambio brusco en la pendiente, lo que indicó el fin de la reacción y el fin de la etapa anóxica (Figura 6.2C). Una desventaja de este método es que solo determina el término de la reacción (provocado principalmente por limitación por sustrato), no el consumo total de NO_3^-, como en el caso de la medición del POR (*nitrate Knee*) (Gernaey *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004b).

La limitante del proceso global de remoción de nitrógeno fue la etapa aeróbica, que requirió alrededor de un 70 a 80 % del tiempo del ciclo total, para ser realizada.

Al hacer una balance a los compuestos nitrogenados ($N\text{-}NH_4^+$ + $N\text{-}NO_2^-$ + $N\text{-}NO_3^-$), se encontró remoción de nitrógeno en la etapa aeróbica, del orden de 15 a 30 % (Figura 6.2A). Debido a que la MO se agregó solamente en la etapa anóxica, y posterior a esto el reactor fue completamente vaciado, las perdidas de nitrógeno se podrían explicar por la NDS. La NDS es típica de los reactores de biopelícula, debido a los gradientes de oxígeno formados al interior de ésta. Además, los reactores de biopelícula operados en modalidad SBR, promueven la formación de productos de almacenaje como el PHB (Pochana y Keller, 1999). La MO no consumida durante la desnitrificación en la etapa anóxica, podría ser almacenada como PHB, y usada más tarde en la etapa aeróbica para reducir el nitrito y nitrato (Beun, 2000).

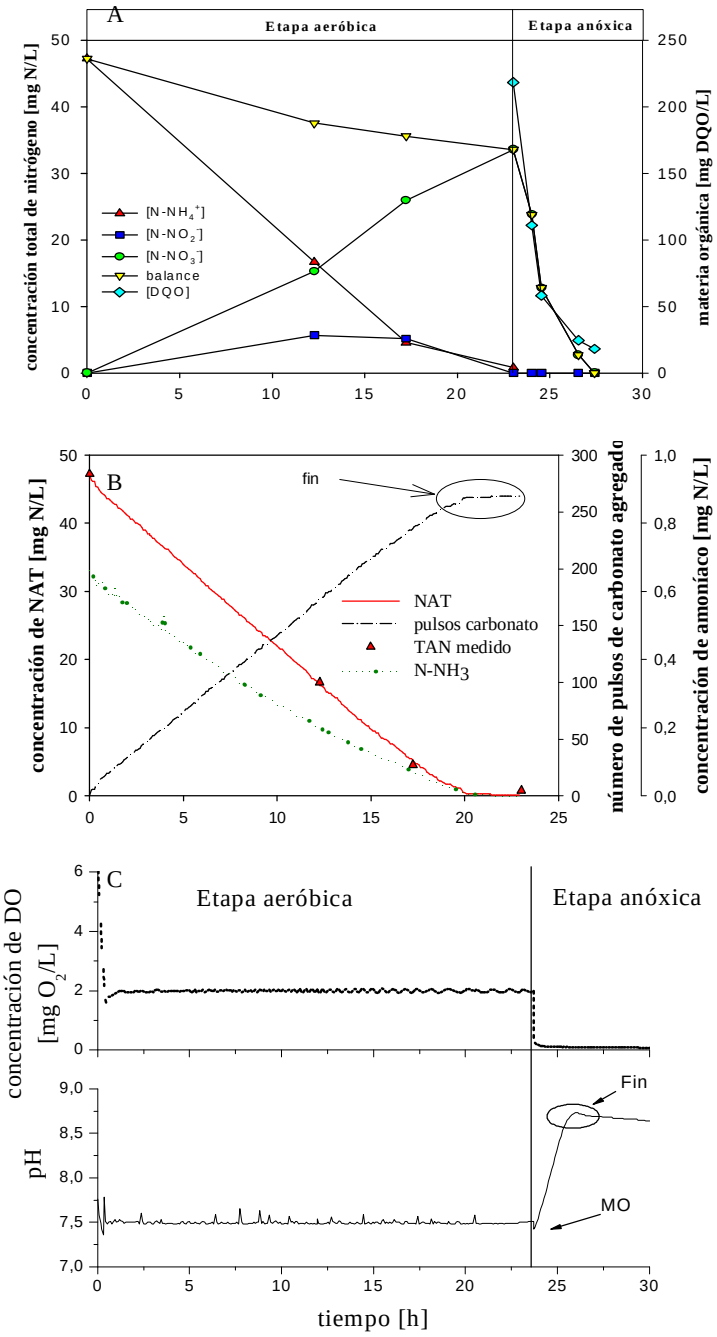

Figura 6.2. Ciclo típico de eliminación conjunta de MO y nitrógeno A) mediciones experimentales de compuestos nitrogenados, B) monitoreo y control en tiempo real para la etapa aeróbica y C) monitoreo y control en tiempo real para la etapa anóxica (ciclo 37 a 20°C, a pH = 7,5 y OD =2,0 mg O_2/L)

6.4.2 Efecto de la relación DQO/N y la concentración de OD

Una vez comprobadas las herramientas de control en tiempo real, estas fueron utilizadas en el estudio del efecto global producido por la relación DQO/N y concentración de OD, en la nitrificación-desnitrificación. En estos experimentos se utilizó una concentración aproximada de NAT de 150 mg N /L. Para este análisis se consideró un total de 45 ciclos. Para todos los experimentos, la acumulación de nitrito varió entre un 30 a 45%.

La relación DQO/N tuvo una alta influencia en el proceso global de remoción de nitrógeno. Cuando se incrementó la DQO/N de 2 a 4, incrementó la oxidación de 2 a 4 mg N/L/h a 1,5 mg O_2/L y de 3 a 7 mg N/L/h a 2,0 mg O_2/L (Figura 6.3). Resultados similares fueron obtenidos por Chiu *et al*. (2007) en un SBR con biomasa suspendida. Estos resultados se pueden explicar probablemente por nitrificación heterotrófica, debido a que el incremento de la relación DQO/N, incrementa el crecimiento heterotrófico. Diversos estudios han demostrado que algunas bacterias heterotróficas como *Thiosphaera pantotropha*, *Alcaligenes faecalis*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri*, pueden realizar la nitrificación y desnitrificación. Gupta *et al*. (2001), en un RBC (*rotating biological contactor*) enriquecido con *T. pantotropha*, obtuvieron de un 44 a 63% de NDS.

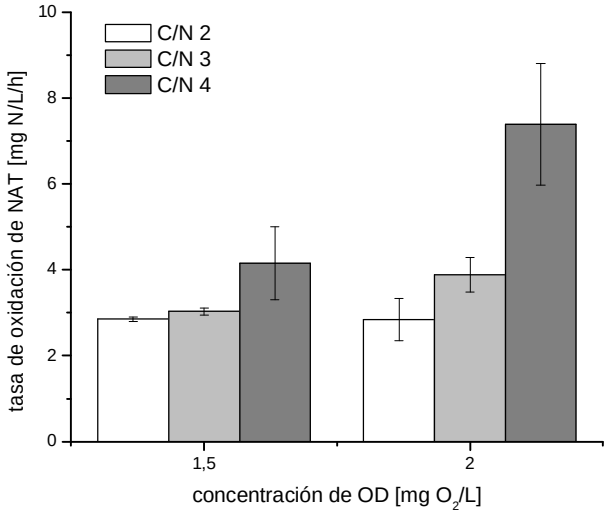

Figura 6.3. Efecto de la relación DQO/N y la concentración de oxígeno en la tasa de oxidación de NAT

La relación DQO/N afectó tanto a la NDS como a la desnitrificación (Figura 6.4). El proceso global de remoción de nitrógeno incrementó de 58 a 90%, al incrementarse la DQO/N de 2 a 4 (Figura 6.4A). La NDS producida en la etapa aeróbica, se vio afectada al incrementar la relación DQO/N, disminuyendo su contribución en la remoción total de nitrógeno de un 40 a un 20% (Figura 6.4B). Sin embargo, la desnitrificación en la etapa anóxica fue favorecida con el incremento de la relación DQO/N (Figura 6.4C). Por lo tanto la desnitrificación en la etapa anóxica fue el proceso más importante de remoción de nitrógeno.

De acuerdo a Beun *et al*. (Beun *et al.*, 2000a; Beun *et al.*, 2000b) en la operación de este reactor existiría un periodo de saciedad, determinado por la presencia de MO exógena (etapa anóxica) y un periodo de hambruna, determinado por la falta de MO exógena (etapa aeróbica). En el periodo de saciedad, el nitrito y nitrato formado difundirían al interior, estimulando la formación de PHB. Al mismo tiempo ocurriría la desnitrificación, lo que indicaría que la formación de PHB y desnitrificación estarían compitiendo por la MO. Entonces la MO no consumida en la desnitrificación se utilizaría para la formación de PHB. A mayor PHB acumulado, se produce una mayor NDS en la etapa aeróbica, debido a que sería la única fuente de MO para poder realizarla.

A bajas relaciones DQO/N (< 4), la desnitrificación se ve limitada por MO. Por lo tanto, la tasa de consumo de MO sería menor. Esta situación explicaría por qué a bajas relaciones DQO/N hay mayor SDN. Para comprobar esta hipótesis, se utilizó los coeficientes de rendimiento $Y_{NO3/DQO}$ 0,33 mg N/mg DQO y $Y_{NO2/DQO}$ 0,53 mg N/mg DQO (Wiesmann, 1994), para calcular la relación DQO adicionada/DQO requerida (Figura 5.6A). A una relación DQO/N de 2, hay un déficit de MO, lo que se manifiesta en una menor tasa de consumo de DQO en la etapa anóxica (Figura 6.5A y 6.5B). Por lo tanto, esto favorecería a la formación de PHB y a la NDS.

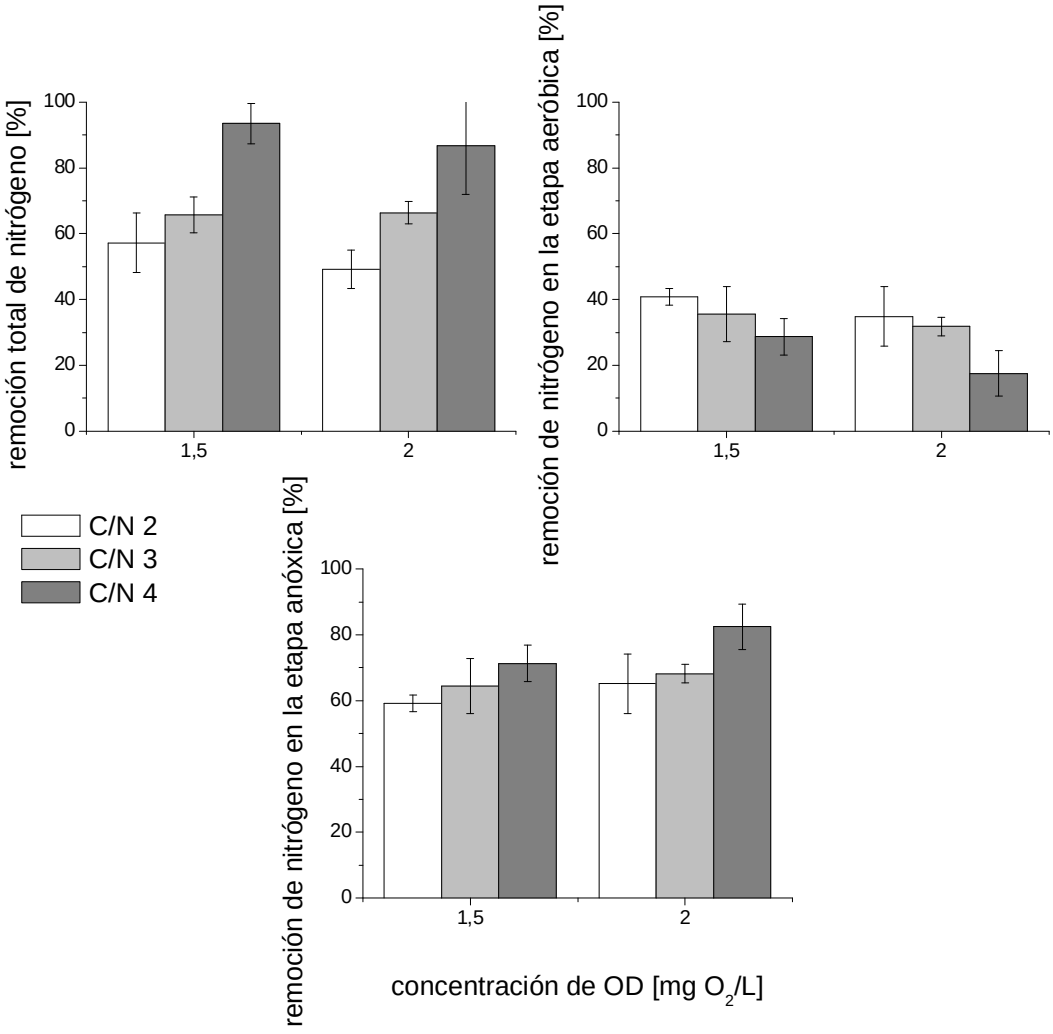

Figura 6.4. Remoción de nitrógeno. A) remoción total de nitrógeno, B) remoción de nitrógeno en la etapa aeróbica y C) remoción de nitrógeno en la etapa anóxica

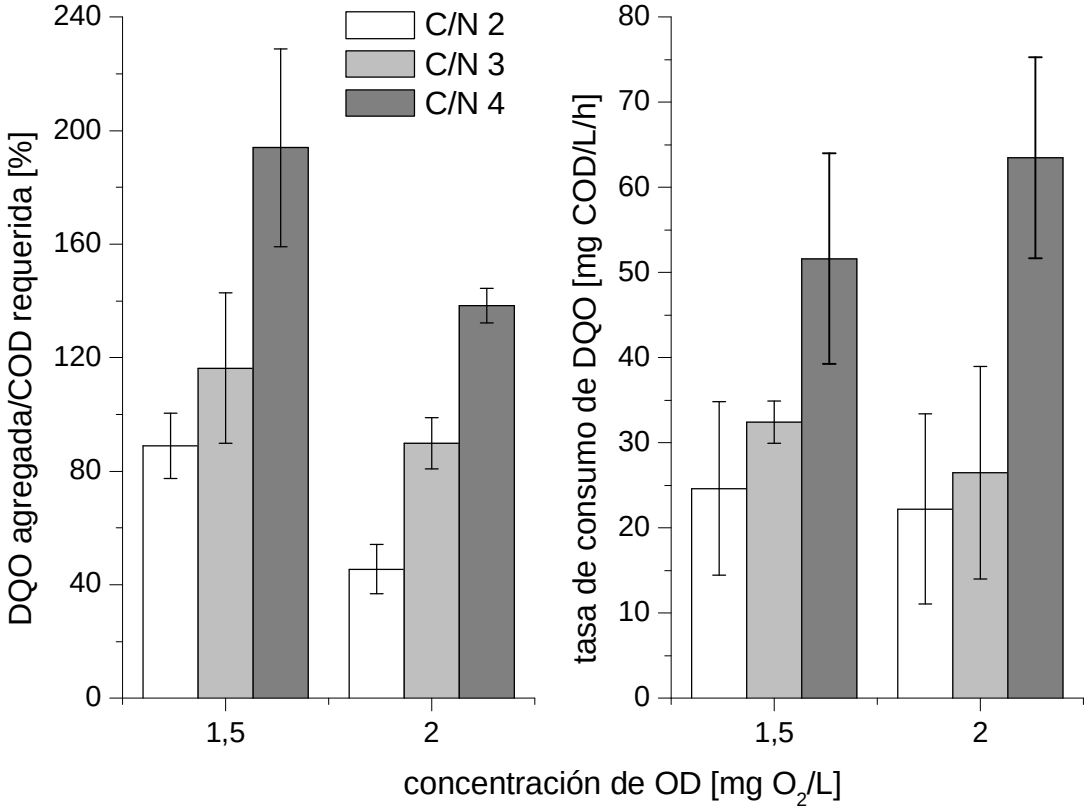

Figura 6.5. Efecto de la cantidad de DQO agregada, sobre la velocidad de consumo de DQO

La Figura 6.6 muestra el efecto en conjunto de la relación DQO/N y concentración de OD en la remoción de nitrógeno calculado a partir de un análisis de superficie respuesta. Se puede observar que existe un comportamiento no lineal a DQO/N < 4. Sin embargo, el rango estudiado de OD presentó una baja influencia en el proceso global de remoción de nitrógeno, afectando principalmente a la tasa de oxidación de NAT. Según la Figura 5.7B, la remoción de nitrógeno puede ser incrementada a relaciones DQO/N > 4 mg DQO/mg N.

Se puede observar que para este estudio en particular, los procesos de NDS (Figura 5.7A) y desnitrificación (Figura 6.6B), son favorecidos a condiciones opuestas. Siendo el primero favorecido a bajas relaciones DQO/N y el segundo a altas DQO/N.

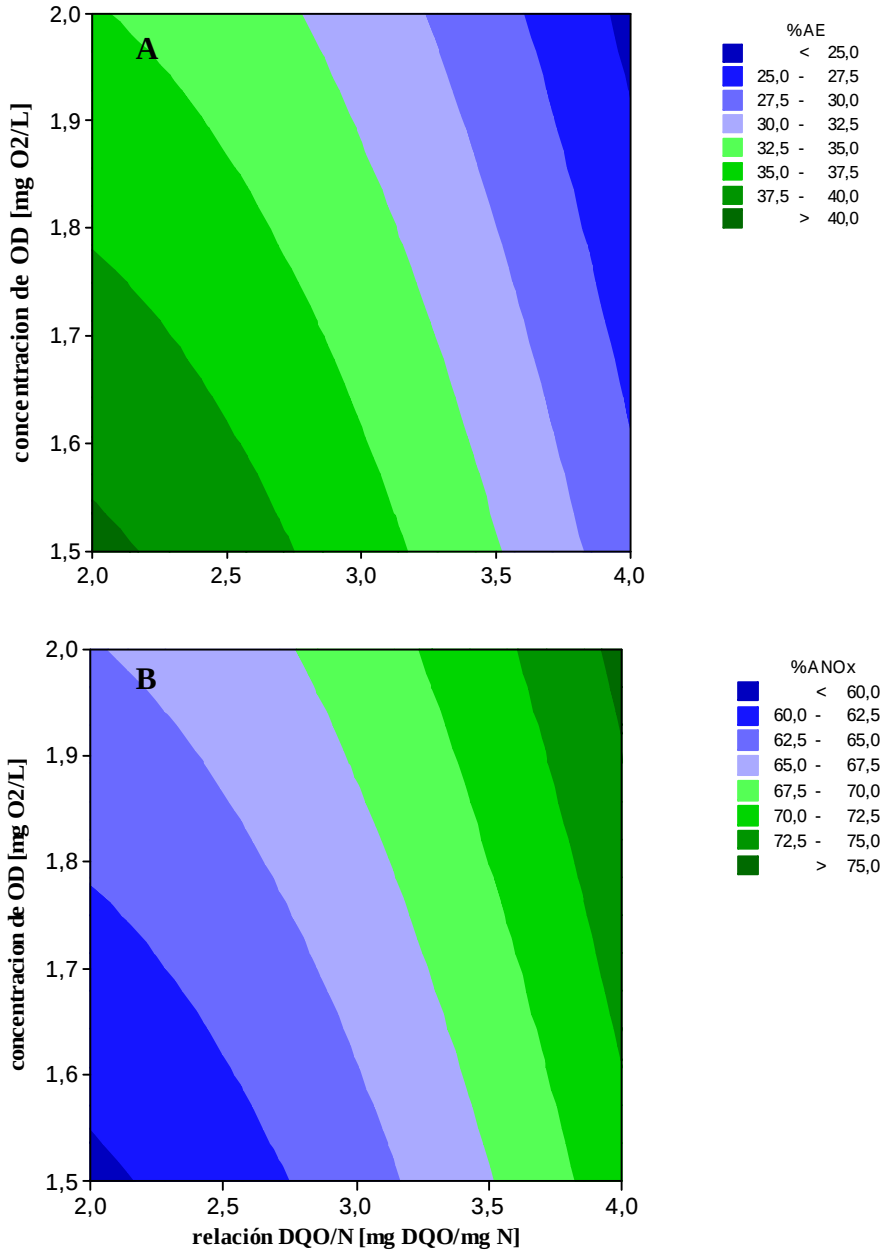

Figura 6.6. Efecto conjunto de la relación DQO/N y concentración de OD, en la remoción de nitrógeno. A) porcentaje de nitrógeno eliminado en la etapa aeróbica (NDS) y B) porcentaje de nitrógeno eliminado en la etapa anóxica (desnitrificación).

6.5. CONCLUSIONES

Las herramientas de control en tiempo real mostraron una alta precisión en determinar la duración de las etapas aeróbicas y anóxicas de un RDR operado en modalidad SBR, con remoción integral de nitrógeno.

La relación DQO/N, fue el parámetro que gobernó la remoción global de nitrógeno, afectando a la NDS de la etapa aeróbica y desnitrificación de la etapa anóxica. Los efectos de la relación DQO/N se manifestaron incluso en la tasa de oxidación de NAT, aumentando esta con el aumento de la relación DQO/N. Esto dio indicios de nitrificación heterotrófica. Sin embargo, esto deberá ser comprobado en próximas investigaciones.

Se puede concluir que la mayor parte de la MO fue consumida en la etapa anóxica para reducir el nitrito y nitrato formado en la etapa aeróbica, y que posiblemente solo una pequeña fracción pudo ser almacenada como PHB, para ser usado en la NDS; sin embargo, debieran hacerse otros experimentos para comprobar esta hipótesis.

La desnitrificación fue el proceso que gobernó la remoción global de nitrógeno.

Para este estudio en particular, los procesos de NDS y desnitrificación fueron favorecidos a condiciones opuestas.

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis doctoral se utilizó un monitoreo avanzado, modelación y control en tiempo real, para estudiar la remoción de nitrógeno vía nitrito, desde la cinética bacteriana hasta el desempeño de reactores de biopelícula RDR.

Se probaron estrategias para el estudio segregado de las poblaciones bacterianas que participan en la nitrificación. Este estudio se basó en que las BNO son más sensibles a bajas concentraciones de oxígeno que las BAO y que sólo ocurre producción de protones en la reacción de oxidación del amonio a nitrito por parte de las BAO, de este modo se pudo diferenciar la cinética de ambas bacterias por medio de ensayos de respirometría y titulación. Para descartar el efecto de la baja transferencia de los reactores de biopelículas, este estudio se realizó en un reactor batch de biomasa suspendida (RBBS)

La constante K' calculada para las BAO, mostró ser mayor que los valores clásicos de literatura. Esto indicó que a pesar de utilizar bajas concentraciones de OD, existió actividad de las BNO, demostrándose esto mediante mediciones experimentales de los compuestos nitrogenados. Al final del experimento un 27% del nitrito formado fue oxidado a nitrato. Sin embargo, a través de los coeficientes de rendimiento calculados se determinó que sólo un 7,4 % del oxígeno total consumido fue utilizado por las BNO.

Por otro lado, el error inherente asociado a esta determinación puede ser considerable, debido a que se utiliza un linearización logarítmica (Schreiner *et al.*, 1999). Sin embargo, se realizaron múltiples repeticiones a través del método de aireación intermitente, en el cual se descartaron las muestras que presentaban mayor variación, minimizando el error.

A pesar de las desventajas del método, este no requiere toma de muestras, lo que facilita y acelera el análisis de los datos. Además, con esta metodología se pudo monitorear en línea el desempeño de las bacterias nitrificantes, la concentración de NAT y la concentración de nitrito. Los resultados obtenidos de este estudio fueron utilizados para el ajuste de un modelo matemático.

Una vez caracterizado el inóculo de bacterias nitrificantes mediante los estudios cinéticos, se inoculó el RDR1. En este reactor se incorporó un sensor virtual de NAT y un control supervisor, que permitieron monitorear en línea el consumo de NAT y mantener una concentración constante de amoníaco, respectivamente. Estas herramientas fueron aplicadas a

una operación SBR. De este estudio se comprobó que la microcinética juega un rol esencial para mantener una nitrificación parcial estable en el tiempo. Estos resultados se contraponen a lo encontrado por otros autores, que señalan que las NOB se aclimatan a la presencia del amoníaco en concentraciones inhibitorias, estableciendo que sólo el control de oxígeno permite asegurar una nitrificación parcial estable (Garrido *et al.*, 1997b; Ruiz *et al.*, 2003; Wang y Yang, 2004). Sin embargo en este estudio se mantuvo una acumulación de nitrito > 80 % por más de 240 días.

La estabilidad de la nitrificación parcial terminó al operar el RDR1 en continuo, debido a que permitió la adaptación de las NOB, lo que disminuyó la acumulación de nitrito de 80 a 60%. Al igual que en la operación SBR, la microcinética influyó tanto en la oxidación de NAT como en la acumulación de nitrito; este efecto fue importante incluso a bajas concentraciones de oxígeno. Los resultados anteriores fueron corroborados por el modelo, que indicó que la máxima eficiencia de la nitrificación se obtendrá al operar en la zona comprendida entre 8,0 y 8,5 de pH, y entre 3,5 y 5,0 mg O_2/L. El alto valor de OD que predice el modelo es razonable, debido a que se trata de un reactor de baja transferencia de masa (Lindemann y Wiesmann, 2000).

Ciudad *et al.* (2005) en un reactor de lodos activos piloto, mostraron que al disminuir la concentración de OD desde la puesta en marcha de un reactor, se manifiesta en una pérdida gradual de la actividad de las BNO (medida a través de respirometría). Sin embargo, no se pudo demostrar si esto era producto de la disminución de la actividad propiamente tal, o por el lavado de las bacterias del reactor. En este trabajo, mediante análisis de hibridación *dot-blot* se mostró que el efecto en conjunto de la limitación por oxígeno sumado a la implementación del control supervisor de pH desde la inoculación del RDR1, permitieron el enriquecimiento de la biopelícula con BAO (> 95 %), manteniéndose en un bajo porcentaje de BNO (< 5 %). Sin embargo, al operar el RDR1 en continuo, el porcentaje de BNO aumentó, coincidiendo con la inestabilidad de la nitrificación parcial mostrada en la operación continua. Estos resultados demostraron que la operación continua dificulta la mantención de la nitrificación parcial.

Con estos resultados se confirmaron las Hipótesis 1 y 2; y se cumplieron los objetivos asociados (Objetivos 1, 2 y 3 para un reactor nitrificante).

En forma paralela se operó el reactor de biopelícula RDR2, el cual fue inoculado con una biomasa mixta, compuesta de bacterias nitrificantes y bacterias heterotróficas. En este reactor

se llevó a cabo la remoción conjunta de MO y nitrógeno. El reactor RDR2, de similares características que el RDR1, se operó en modalidad SBR con el sensor virtual de NAT, el que sirvió como un indicador del fin de la etapa aeróbica (nitrificación). La duración de la etapa anóxica (desnitrificación) se determinó por el monitoreo del cambio del pH. Ambos indicadores demostraron ser eficientes, lo que permitió un control automático del reactor. La incorporación de este tipo de herramienta permite que el reactor pueda actuar en forma autónoma según las concentraciones de entrada, lo cual tiene ventajas cuando se trata afluentes que cambian constantemente a lo largo del día, generando así una alta eficiencia de remoción post tratamiento, independiente de las fluctuaciones. Autores como Wang *et al.* (2004a), Peng *et al.* (2003) y Galluzzo *et al.* (2001) entre otros, también han incorporado controles avanzados como el *Fuzzy* para optimizar y automatizar la nitrificación-desnitrificación. Sin embargo, no han implementado un monitoreo en línea de la concentración de NAT.

A diferencia del RDR1, el RDR2 presentó una baja acumulación de nitrito en la etapa aeróbica, explicándose básicamente por la incorporación de inóculo de bacterias heterotróficas, con posible presencia de bacterias nitrificantes. Estas bacterias pudieron suplir la baja actividad de las NOB del inóculo nitrificante.

La concentración de OD sólo tuvo efecto en la tasa de oxidación de NAT. Como era de esperar a mayor relación C/N mayor remoción de nitrógeno, obteniéndose 90% de eficiencia de remoción de nitrógeno para una C/N de 4. Sin embargo, la relación C/N mostró ser un parámetro clave, dado que su variación afectó tanto a la nitrificación como a la desnitrificación, a pesar de ser solamente agregada en la etapa anóxica. Se encontró que un incremento de la relación C/N aumentó la tasa de oxidación de NAT de 3 a 7 mg N/L/h, indicando la presencia probable de nitrificación heterotrófica, fenómeno que ha sido reportado en reactores RDR (Gupta y Gupta, 2001).

También se observó un efecto interesante por la presencia probable de NDS, provocada por la operación SBR, que mantiene en forma alternada periodos de saciedad y hambruna (Beun, 2000). La NDS disminuyó al aumentar la relación C/N, debido a que la mayor parte de la MO se utilizó en la desnitrificación.

Este trabajo fue de gran importancia dado a que permitió evaluar el sensor virtual de NAT en un sistema global de eliminación de nitrógeno, y también mostró la importancia de mantener un monitoreo en línea del proceso, lo que asegura una mayor eficiencia de los tratamientos.

Con estos resultados se confirmó la Hipótesis 3 y cumplieron los objetivos asociados (Objetivos 1, 2 y 3 para reactor nitrificante-desnitrificante).

PROYECCIONES Y APLICACIONES

- Las test respirométricos y titulométricos desarrollados en esta investigación, podrían ser utilizados para monitorear la actividad de bacterias en presencia de compuestos tóxicos como los antibióticos, debido a que estos compuestos son usados en la industria ganadera y avícola, donde se generan altas concentraciones de nitrógeno.

- El estudio de la utilización del sensor virtual de NAT y control supervisor de pH como tratamiento previo a un reactor Anammox, surge como área de interés, debido a que se podría determinar exactamente cuando se cumple la relación $N\text{-}NH_4^+/N\text{-}NO_2^-$ de 50%/50% y evitar así la inhibición del proceso.

- Por otro lado, la utilización de reactores de biopelícula RDR con el sensor virtual de NAT y control supervisor de pH como post tratamiento de un digestor anaeróbico, permitiría controlar y dismunuir la inhibición por amoníaco a las BAO, debido a que se alcansan concentraciones del orden de 1000 mg $N\text{-}NH_4^+/L$.

- Debido a que el remoción en conjunto de MO y nitrógeno se probó con éxito con una carga nitrogenada media alta, el monitoreo y control en línea desarrollado en esta tesis, podría ser aplicado sin mayores inconvenientes en el tratamiento del nitrógeno de aguas residuales urbanas, que se caracterizan por concentraciones de NAT del orden de 50 mg $N\text{-}NH_4^+/L$.

- Sería de gran interés poder comprobar la hipótesis de acumulación de PHB en la biopelícula, así se podría determinar fehacientemente si las estrategias desarrolladas promueven o no la nitrificación desnitrificación simultánea

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

La aplicación de distintas condiciones de DO en ensayos respirométricos y titulométricos, permitió un estudio cinético segregado de las poblaciones AOB y NOB.

La aplicación de herramientas matemáticas incrementó la estabilidad de la nitrificación parcial y permitió un seguimiento en-línea del proceso de remoción de nitrógeno

La operación SBR y la continua, causaron distintos efectos en las poblaciones bacterianas nitrificantes, tanto en la distribución, la morfología y sensibilidad a la variación de factores ambientales como el pH y el DO. La operación SBR con el control supervisor de pH permitió una biopelícula enriquecida con BAO. Sin embargo, en la operación continua las BNO se adaptaron y aumentaron su distribución en la biopelícula. Esto indica que una operación continua no es adecuada para mantener una nitrificación parcial estable.

Se comprobó que el control de la microcinética junto con la concentración de OD, juegan un rol esencial para mantener una nitrificación parcial estable en el tiempo. El efecto de la microcinética fue observado incluso a concentraciones < 2 mg O_2/L y fue corroborado por las simulaciones realizadas por un modelo.

A través del monitoreo en tiempo real del gasto de carbonato en la etapa de nitrificación y el seguimiento del pH en la etapa de desnitrificación, se pudo determinar en línea la duración de estas etapas en un proceso global de remoción de nitrógeno.

A pesar que la MO se agregó sólo en la etapa anóxica, la relación C/N afectó al proceso global de remoción de nitrógeno. Un incremento de la relación C/N aumentó la tasa de oxidación de NAT de 3 a 7 mg N/L/h, indicando la presencia probable de nitrificación heterotrófica. Por otro lado, la NDS disminuyó al aumentar la relación C/N, debido a que la mayor parte de la MO se utilizó en la desnitrificación. La desnitrificación en la etapa anóxica fue el proceso más importante de remoción de nitrógeno

NOMENCLATURA

α = Alfa, índice de eficiencia de oxidación de NAT, %

BAO = Bacterias amonio oxidantes

BNO = Bacterias nitrito oxidantes

β = Beta, índice de eficiencia de acumulación de nitrito, %

$Y_{CO_3^{2-}/TAN}$ = Coeficiente de rendimiento de carbonato consumido por NAT oxidado, mmol, CO_3^{2-}/mmol N-NH_4^+

$Y^*_{CO3/NAT}$ = Coeficiente de rendimiento experimental de consumo de carbonato, por oxidación de amonio, mol CO_3^{2-}/mol N

Y_{B/O_2} = Coeficiente de rendimiento de formación de bacterias por oxígeno consumido, g SSV/g O_2

$Y_{B/S}$ = Coeficiente de rendimiento de formación de bacterias por nitrógeno consumido, g SSV/g N

$Y_{O_2/S}$ = Coeficiente de rendimiento de formación consumo de OD por sustrato consumido, g O_2/g S

$Y_{O_2/N}$ = Coeficiente de rendimiento global de oxígeno consumido por sustrato oxidado, g O_2/(g N-NH_3 + N-HNO_2)

$Y_{O_2/TAN}$ = Coeficiente de rendimiento de oxígeno consumido por NAT oxidado, g O_2/g N-NH_3

$Y_{O_2/N-NO_2^-}$ = Coeficiente de rendimiento de oxígeno consumido por nitrito oxidado, g O_2/g N-NO_2

c = Concentración, mg/L

c_c = Concentración carbonato de sodio, mol/L

c' = Concentración de OD, mg/L

c_B = Concentración de biomasa, g SSV/L

c_N = Concentración de nitrógeno, mg N/L

Ks = Constante de saturación por sustrato, mg/L

K' = Constante de saturación por oxígeno, mg O_2/L

$K_{i,}$ = Constante de inhibición, mg N/L

Ki,s = Constante de inhibición por sustrato, mg N/L

k_L	= Coeficiente de transferencia de oxígeno, 1/h
k_L	= Coeficiente de transferencia de masa en la interfase biopelícula líquido, 1/h
DQO	= Demanda química de OD
OD	= Oxígeno disuelto, mg O_2/L
PI	= Control proporcional integral
NS	= Número de pulsos de carbonato
NSD	= Nitrificación – desnitrificación simultánea
RDR	= Reactor de Discos Rotatorios
s	= Sustrato, mg N/L
r	= Tasa de consumo, mg/L/h
r’	= Tasa de consumo de OD o tasa de respiración, mg O_2/L/h
r'_E	= Tasa de consumo de OD por respiración endógena, mg O_2/L/h
r_N	= Tasa de consumo de nitrógeno, mg N/L/h
$r_{máx}$	= Tasa máxima de consumo, mg/L/h
$r'_{máx}$	= Tasa máxima de consumo de OD, mg O_2 /L/h
$r_{Nmáx}$	= Tasa máxima de consumo de nitrógeno, mg N/L/h
T	= Temperatura, °C
t	= Tiempo, min, h
NAT	= Nitrógeno amoniacal total, N-NH_3 + N-NH_4^+, mg N/L
μ	= Velocidad específica de crecimiento de las bacterias, 1/h
$\mu_{máx}$	= Velocidad específica máxima de crecimiento de las bacterias, 1/h
Vp	= Volumen de pulso de bomba de carbonato, mL
Vr	= Volumen útil del reactor, L
Z	= Zeta, eficiencia de la nitrificación parcial, %

Sub índice

BAO	= Bacterias amonio oxidantes
BNO	= Bacterias nitrito oxidantes
0	= Inicial
M	= Medido
E	= Respiración endógena

REFERENCIAS

Abeling, U., and Seyfried, C. F. (1992) Anaerobic-Aerobic Treatment of High-Strength Ammonium Waste-Water - Nitrogen Removal Via Nitrite. Water Science and Technology, **26**(5-6), 1007-1015.

Amann, R. I., Krumholz, L., and Stahl, D. A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol, **172**, 762-770.

Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., and Srinath, E. G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitric acid. J. WPCF, **48**, 835–852.

Antileo, C., Roeckel, M., Lindemann, J., and Wiesmann, U. (2007) Operating Parameters for High Nitrite Accumulation during Nitrification in a Rotating Biological Nitrifying Contactor. Water Environ. Res. doi:10.2175/106143007X182755.

Antileo, C., Roeckel, M., and Wiesmann, U. (2003) High nitrite buildup during nitrification in a rotating disk reactor. Water Environment Research, **75**(2), 151-162.

Antileo, C., Werner, A., Ciudad, G., Munoz, C., Bornhardt, C., Jeison, D., and Urrutia, H. (2006) Novel operational strategy for partial nitrification to nitrite in a sequencing batch rotating disk reactor. Biochemical Engineering Journal, **32**(2), 69-78.

APHA. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA-AWWA-WPCF, Washington D.C.

Ausbel, M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. (1998). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. Current protocols in molecular biology, J. W. Sons, ed., USA.

Azócar, L., Candia, O., Ciudad, G., and Antileo, C. (2007) Strategy of operation for partial nitrification in long-term and its aplication to a supervisory control system empiric and phenomenology. Artículo en preparación.

Balmelle, B., Nguyen, K. M., Capdeville, B., Cornier, J. C., and Deguin, A. (1992) Study of Factors Controlling Nitrite Buildup in Biological Processes for Water Nitrification. Water Science and Technology, **26**(5-6), 1017-1025.

Bergeron, P. (1978) Untersuchungen zur Kinetik der Nitrifikation. Karlsruher Berichte zur Ingenieurbiologie, **12**.

Bernet, N., Dangcong, P., Delgenes, J. P., and Moletta, R. (2001) Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor. Journal of Environmental Engineering-Asce, **127**(3), 266-271.

Beun, J. J. (2000). PHB metabolism and N-removal in sequencing batch granular sludge reactors. ter verkrijging van de graad van doctor, Technische Universiteit Delft, Nederland.

Beun, J. J., Paletta, F., Van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J. (2000a) Stoichiometry and kinetics of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures. Biotechnology and Bioengineering, **67**(4), 379-389.

Beun, J. J., Verhoef, E. V., Van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J. (2000b) Stoichiometry and kinetics of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism under denitrifying conditions in activated sludge cultures. Biotechnology and Bioengineering, **68**(5), 496-507.

Bock, E., Schmidt, I., Stuven, R., and Zart, D. (1995) Nitrogen Loss Caused by Denitrifying Nitrosomonas Cells Using Ammonium or Hydrogen as Electron-Donors and Nitrite as Electron-Acceptor. Archives of Microbiology, **163**(1), 16-20.

Boller, M., Gujer, W., and Tschui, M. (1994) Parameters Affecting Nitrifying Biofilm Reactors. Water Science and Technology, **29**(10-11), 1-11.

Botrous, A. E. F., Dahab, M. F., and Mihaltz, P. (2004) Nitrification of high-strength ammonium wastewater by a fluidized-bed reactor. Water Science and Technology, **49**(5-6), 65-71.

Carrera, J., Jubany, I., Carvallo, L., Chamy, R., and Lafuente, J. (2004) Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems. Process Biochemistry, **39**(9), 1159-1165.

Cecen, F. (1996) Investigation of partial and full nitrification characteristics of fertilizer wastewaters in a submerged biofilm reactor. Water Science and Technology, **34**(11), 77-85.

Cecen, F., Orak, E., and Gokcin, P. (1995) Nitrification studies on fertilizer wastewaters in activated sludge and biofilm reactors. Water Science and Technology, **32**(12), 141-148.

Cervantes, F., Pérez, J., and Gómez, J. (2000) Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. Revista Latinoamericana de Microbiología, **42**, 73-82.

Ciudad, G., González, R., Bornhardt, C., and Antileo, C. (2007) Modes of operation and pH control as enhancement factors for partial nitrification with oxygen transport limitation. Water Research, **doi:10.1016/j.watres.2007.06.036**.

Ciudad, G., Rubilar, O., Munoz, P., Ruiz, G., Chamy, R., Vergara, C., and Jeison, D. (2005) Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. Process Biochemistry, **40**(5), 1715-1719.

Ciudad, G., Werner, A., Bornhardt, C., Munoz, C., and Antileo, C. (2006) Differential kinetics of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification. Process Biochemistry, **41**(8), 1764-1772.

Contreras, E., Bertola, N., and Zaritzky, N. (2001) The application of different techniques to determine activated sludge kinetic parameters in a food industry wastewater. Water Sa, **27**(2), 169-176.

Chen, M., Kim, J. H., Kishida, N., Nishimura, O., and Sudo, R. (2004) Enhanced nitrogen removal using C/N load adjustment and real-time control strategy in sequencing batch reactors for swine wastewater treatment. Water Science and Technology, **49**(5-6), 309-314.

Chen, S. K., Juaw, C. K., and Cheng, S. S. (1991) Nitritification and Denitritification of High-Strength Ammonium and Nitrite Waste-Water with Biofilm Reactors. Water Science and Technology, **23**(7-9), 1417-1425.

Chiu, Y. C., Lee, L. L., Chang, C. N., and Chao, A. C. (2007) Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. International Biodeterioration & Biodegradation, **59**(1), 1-7.

Chung, J. W., and Bae, W. (2002) Nitrite reduction by a mixed culture under conditions relevant to shortcut biological nitrogen removal. Biodegradation, **13**(3), 163-170.

de Beer, D., and Schramm, A. (1999) Micro-environments and mass transfer phenomena in biofilms studied with microsensors. Water Science and Technology, **39**(7), 173-178.

de Beer, D., Vandenheuvel, J. C., and Ottengraf, S. P. P. (1993) Microelectrode Measurements of the Activity Distribution in Nitrifying Bacterial Aggregates. Applied and Environmental Microbiology, **59**(2), 573-579.

Fdzpolanco, F., Villaverde, S., and Garcia, P. A. (1994) Temperature Effect on Nitrifying Bacteria Activity in Biofilters - Activation and Free Ammonia Inhibition. Water Science and Technology, **30**(11), 121-130.

Ficara, E., Musumeci, A., and Rozzi, A. (2000) Comparison and combination of titrimetric and respirometric techniques to estimate nitrification kinetics parameters. Water Sa, **26**(2), 217-224.

Fux, C., Huang, D., Monti, A., and Siegrist, H. (2004) Difficulties in maintaining long-term partial nitritation of ammonium-rich sludge digester liquids in a moving-bed biofilm reactor (MBBR). Water Science and Technology, **49**(11-12), 53-60.

Fux, C., and Siegrist, H. (2004) Nitrogen removal from sludge digester liquids by nitrification/denitrification or partial nitritation/anammox: environmental and economical considerations. Water Science and Technology, **50**(10), 19-26.

Galluzzo, M., Ducato, R., Bartolozzi, V., and Picciotto, A. (2001) Expert control of DO in the aerobic reactor of an activated sludge process. Computers & Chemical Engineering, **25**(4-6), 619-625.

Garrido, J. M., Campos, J. L., Mendez, R., and Lema, J. M. (1997a) Nitrous oxide production by nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. Water Science and Technology, **36**(1), 157-163.

Garrido, J. M., van Benthum, W. A. J., van Loosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J. (1997b) Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. Biotechnology and Bioengineering, **53**(2), 168-178.

Gee, C. S., and Kim, J. S. (2004) Nitrite accumulation followed by denitrification using sequencing batch reactor. Water Science and Technology, **49**(5-6), 47-55.

Gernaey, A. K., Petersen, B., Ottoy, J. P., and Vanrolleghem, P. (2001) Activated sludge monitoring with combined respirometric-titrimetric measurements. Water Research, **35**(5), 1280-1294.

Gernaey, K., Bogaert, H., Massone, A., Vanrolleghem, P., and Verstraete, W. (1997) On-line nitrification monitoring in activated sludge with a titrimetric sensor. Environmental Science & Technology, **31**(8), 2350-2355.

Gernaey, K., Bogaert, H., Vanrolleghem, P., Massone, A., Rozzi, A., and Verstraete, W. (1998) A titration technique for on-line nitrification monitoring in activated sludge. Water Science and Technology, **37**(12), 103-110.

Gibbs, B. M., Shephard, L. R., Third, K. A., and Cord-Ruwisch, R. (2004) The presence of ammonium facilitates nitrite reduction under PHB driven simultaneous nitrification and denitrification. Water Science and Technology, **50**(10), 181-188.

Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., and Schramm, A. (2001) Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. Applied and Environmental Microbiology, **67**(3), 1351-1362.

Gupta, A. B., and Gupta, S. K. (2001) Simultaneous carbon and nitrogen removal from high strength domestic wastewater in an aerobic RBC biofilm. Water Research, **35**(7), 1714-1722.

Halling-Sorensen, B., and Jorensen, S. E. (1993). Process chemistry and biochemistry of nitrification. Studies in Environmental Science 54 / The removal of nitrogen compounds from waste-water, Elsevier, ed., Amsterdam, The Netherlands.

Han, D. W., Chang, J. S., and Kim, D. J. (2003) Nitrifying microbial community analysis of nitrite accumulating biofilm reactor by fluorescence in situ hybridization. Water Science and Technology, **47**(1), 97-104.

Helmer-Madhok, C., Schmid, M., Filipov, E., Gaul, T., Hippen, A., Rosenwinkel, K. H., Seyfried, C. F., Wagner, M., and Kunst, S. (2002) Deammonification in biofilm systems: population structure and function. Water Science and Technology, **46**(1-2), 223-231.

Helmer, C., and Kunst, S. (1998) Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. Water Science and Technology, **37**(4-5), 183-187.

Helmer, C., Kunst, S., Juretschko, S., Schmid, M. C., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (1999) Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. Water Science and Technology, **39**(7), 13-21.

Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M., and 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.

Hidaka, T., Yamada, H., Kawamura, M., and Tsuno, H. (2002) Effect of dissolved oxygen conditions on nitrogen removal in continuously fed intermittent-aeration process with two tanks. Water Science and Technology, **45**(12), 181-188.

Hippen, A., Helmer, C., Kunst, S., Rosenwinkel, K. H., and Seyfried, C. F. (2001) Six years' practical experience with aerobic/anoxic deammonification in biofilm systems. Water Science and Technology, **44**(2-3), 39-48.

Hobbie, J. E., R.J., D., and Jasper, S. (1977) Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. Appl.Environ.Microbiol, **33**, 1225-1228.

Horn, H., and Hempel, D. C. (1995) Mass transfer coefficients for an autotrophic and a heterotrophic biofilm system. Water Science and Technology, **32**(8), 199-204.

Jenicek, P., Svehla, P., Zabranska, J., and Dohanyos, M. (2004) Factors affecting nitrogen removal by nitritation/denitritation. Water Science and Technology, **49**(5-6), 73-79.

Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G. J. M., van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C. M., and Kuenen, J. G. (1998) The anaerobic oxidation of ammonium. Fems Microbiology Reviews, **22**(5), 421-437.

Joo, S. H., Kim, D. J., Yoo, I. K., Park, K., and Cha, G. C. (2000) Partial nitrification in an upflow biological aerated filter by O-2 limitation. Biotechnology Letters, **22**(11), 937-940.

Keller, J., Subramaniam, K., Gosswein, J., and Greenfield, P. F. (1997) Nutrient removal from industrial wastewater using single tank sequencing batch reactors. Water Science and Technology, **35**(6), 137-144.

Kim, D. J., Ahn, D. H., and Lee, D. I. (2005) Effects of free ammonia and dissolved oxygen on nitrification and nitrite accumulation in a biofilm airlift reactor. Korean Journal of Chemical Engineering, **22**(1), 85-90.

Laanbroek, H. J., and Gerards, S. (1993) Competition for Limiting Amounts of Oxygen between Nitrosomonas-Europaea and Nitrobacter-Winogradskyi Grown in Mixed Continuous Cultures. Archives of Microbiology, **159**(5), 453-459.

Ladd, T. I., and Costerton, J. W. (1990) Methods for Studying Biofilm Bacteria. Methods in Microbiology, **22**, 285-307.

Langergraber, G., Wuchty, M., Fleischmann, N., and Lechner, M. (2003) Rapid automated detection of nitrification kinetics using respirometry. Water Science and Technology, **47**(2), 149-155.

Larsen, W. (1992) Simulation der Nitrifikation und anderer bakterieller Stoffwandlungen im Biofilm. Diss. TU Berlin, Reihe 15: Umwelttechnik 104, VDI-Verlag Düsseldorf.

Lindemann, J. (2002). Stickstoffeliminierung in Rotationsscheiben-Biofilmreaktoren. PhD thesis, TU Berlin, Berlin, Germany.

Lindemann, J., and Wiesmann, U. (2000) Single-disc investigations on nitrogen removal of higher loads in sequencing batch and continuously operated RDR systems. Water Science and Technology, **41**(4-5), 77-84.

Liu, Y., and Tay, J. H. (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. Water Research, **36**(7), 1653-1665.

Marazioti, C., Kornaros, M., and Lyberatos, G. (2003) Kinetic modeling of a mixed culture of Pseudomonas denitrificans and Bacillus subtilis under aerobic and anoxic operating conditions. Water Research, **37**(6), 1239-1251.

Maurer, M., Fux, C., Lange, D., and Siegrist, H. (1999) Modelling denitrification in a moving bed of porous carriers from a low-loaded wastewater treatment plant. Water Science and Technology, **39**(7), 251-259.

Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A. (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology, **62**(6), 2156-2162.

Mosquera-Corral, A., Gonzalez, F., Campos, J. L., and Mendez, R. (2005) Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. Process Biochemistry, **40**(9), 3109-3118.

Mulder, A., Vandegraaf, A. A., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G. (1995) Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized-Bed Reactor. Fems Microbiology Ecology, **16**(3), 177-183.

Munch, E. V., Lant, P., and Keller, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. Water Research, **30**(2), 277-284.

Okabe, S., Hirata, K., and Watanabe, Y. (1995) Dynamic changes in spatial microbial distribution in mixed-population biofilms: Experimental results and model simulation. Water Science and Technology, **32**(8), 67-74.

Okabe, S., Satoh, H., and Watanabe, Y. (1999a) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. Applied and Environmental Microbiology, **65**(7), 3182-3191.

Okabe, S., Satoh, H., and Y, a. W. (1999b) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol, **65**, 3182-3191.

Okabe, S., and Watanabe, Y. (2000) Structure and function of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. Water Science and Technology, **42**(12), 21-32.

Peng, Y., Song, X., Peng, C., Li, J., and Chen, Y. (2004a) Biological nitrogen removal in SBR bypassing nitrate generation accomplished by chlorination and aeration time control. Water Science and Technology, **49**(5-6), 295-300.

Peng, Y. Z., Chen, Y., Peng, C. Y., Liu, M., Wang, S. Y., Song, X. Q., and Cui, Y. W. (2004b) Nitrite accumulation by aeration controlled in sequencing batch reactors treating domestic wastewater. Water Science and Technology, **50**(10), 35-43.

Peng, Y. Z., Gao, J. F., Wang, S. Y., and Sui, M. H. (2003) Use of pH as fuzzy control parameter for nitrification under different alkalinity in SBR process. Water Science and Technology, **47**(11), 77-84.

Philips, S., Wyffels, S., Sprengers, R., and Verstraete, W. (2002) Oxygen-limited autotrophic nitrification/denitrification by ammonia oxidisers enables upward motion towards

more favourable conditions. Applied Microbiology and Biotechnology, **59**(4-5), 557-566.

Picioreanu, C., vanLoosdrecht, M. C. M., and Heijnen, J. J. (1997) Modelling the effect of oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. Water Science and Technology, **36**(1), 147-156.

Pirsing, A., Wiesmann, U., Kelterbach, G., Schaffranietz, U., Rock, H., Eichner, B., Szukal, S., and Schulze, G. (1996) On-line monitoring and modelling based process control of high rate nitrification - Lab scale experimental results. Bioprocess Engineering, **15**(4), 181-188.

Pochana, K., and Keller, J. (1999) Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). Water Science and Technology, **39**(6), 61-68.

Pochana, K., Keller, J., and Lant, P. (1999) Model development for simultaneous nitrification and denitrification. Water Science and Technology, **39**(1), 235-243.

Pynaert, K., Smets, B. F., Beheydt, D., and Verstraete, W. (2004) Start-up of autotrophic nitrogen removal reactors via sequential biocatalyst addition. Environmental Science & Technology, **38**(4), 1228-1235.

Pynaert, K., Smets, B. F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S. D., and Verstraete, W. (2003) Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. Applied and Environmental Microbiology, **69**(6), 3626-3635.

Pynaert, K., Wyffels, S., Sprengers, R., Boeckx, P., Van Cleemput, O., and Verstraete, W. (2002) Oxygen-limited nitrogen removal in a lab-scale rotating biological contactor treating an ammonium-rich wastewater. Water Science and Technology, **45**(10), 357-363.

Raskin, L., Poulsen, L. K., Noguera, D. R., Rittmann, B. E., and Stahl, D. A. (1994) Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization. Applied and Environmental Microbiology, **60**(4), 1241-1248.

Rittmann, B. E., Stilwell, D., and Ohashi, A. (2002) The transient-state, multiple-species biofilm model for biofiltration processes. Water Research, **36**(9), 2342-2356.

Robertson, L. A., Dalsgaard, T., Revsbech, N. P., and Kuenen, J. G. (1995) Confirmation of Aerobic Denitrification in Batch Cultures, Using Gas-Chromatography and N-15 Mass-Spectrometry. Fems Microbiology Ecology, **18**(2), 113-119.

Romero, R. (2006). Implementación de un Control Supervisor en el reactor Nitrificante de Disco Rotatorio del laboratorio de RILes de la Universidad de la Frontera. Universidad de La Frontera, Temuco.

Ruiz, G., Jeison, D., and Chamy, R. (2003) Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. Water Research, **37**(6), 1371-1377.

Ruiz, G., Jeison, D., Rubilar, O., Ciudad, G., and Chamy, R. (2006) Nitrification-denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. Bioresource Technology, **97**(2), 330-335.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press, USA.

Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J. W., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (2000) Molecular evidence for genus level

diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. Systematic and Applied Microbiology, **23**(1), 93-106.

Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Cirpus, I., Strous, M., Bock, E., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M. (2002) Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria competitors or natural partners? Fems Microbiology Ecology, **39**(3), 175-181.

Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., and Amann, R. I. (1997) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by microelectrodes and fluorescent oligonucleotide probes. Water Science and Technology, **36**(1), 263-270.

Schreiner, A., Asmussen, C., Wiesmann, U., and Stan, H. J. (1999) Investigation of aerobic degradation kinetics of surfactants using respirometric batch experiments. Acta Biotechnologica, **19**(4), 293-304.

Sen, P., and Dentel, S. K. (1998) Simultaneous nitrification-denitrification in a fluidized bed reactor. Water Science and Technology, **38**(1), 247-254.

Siegrist, H., Reithaar, S., Koch, G., and Lais, P. (1998) Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. Water Science and Technology, **38**(8-9), 241-248.

Sievers, M., Vorlop, K. D., Hahne, J., Schlieker, M., and Schafer, S. (2003) Advanced nitrogen elimination by encapsulated nitrifiers. Water Science and Technology, **48**(8), 19-26.

Summers, W. C. (1970) Simple method for extraction of RNA from E. coli utilizing diethylpyrocarbonate. Anal. Biochem, **33**, 459-463.

Third, K. A., Burnett, N., and Cord-Ruwisch, R. (2003) Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (PHB) as the electron donor in an SBR. Biotechnology and Bioengineering, **83**(6), 706-720.

Third, K. A., Gibbs, B., Newland, M., and Cord-Ruwisch, R. (2005) Long-term aeration management for improved N-removal via SND in a sequencing batch reactor. Water Research, **39**(15), 3523-3530.

Thorn, M., Mattsson, A., and Sorensson, F. (1996) Biofilm development in a nitrifying trickling filter. Water Science and Technology, **34**(1-2), 83-89.

Turk, O., and Mavinic, D. S. (1989) Stability of Nitrite Buildup in an Activated-Sludge System. Journal Water Pollution Control Federation, **61**(8), 1440-1448.

Udert, K. M., Fux, C., Munster, M., Larsen, T. A., Siegrist, H., and Gujer, W. (2003) Nitrification and autotrophic denitrification of source-separated urine. Water Science and Technology, **48**(1), 119-130.

Vanrolleghem, P. A., Sin, G., and Gernaey, K. V. (2004) Transient response of aerobic and anoxic activated sludge activities to sudden substrate concentration changes. Biotechnology and Bioengineering, **86**(3), 277-290.

Verstraete, W., and Philips, S. (1998) Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. Environmental Pollution, **102**, 717-726.

Villaverde, S., Fdz-Polanco, F., and Garcia, P. A. (2000) Nitrifying biofilm acclimation to free ammonia in submerged biofilters. Start-up influence. Water Research, **34**(2), 602-610.

Villaverde, S., GarciaEncina, P. A., and FdzPolanco, F. (1997) Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilters. Water Research, **31**(5), 1180-1186.

Wang, C., Chen, Z., Liu, X., and Peng, Y. (2007) Nitrification–denitrification via nitrite in SBR using real-time control strategy when treating domestic wastewater. Biochemical Engineering Journal, **36**, 87–92.

Wang, J. L., and Yang, N. (2004) Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions. Process Biochemistry, **39**(10), 1223-1229.

Wang, S. Y., Gao, D. W., Peng, Y. Z., Wang, P., and Yang, Q. (2004a) Nitrification-denitrification via nitrite for nitrogen removal from high nitrogen soybean wastewater with on-line fuzzy control. Water Science and Technology, **49**(5-6), 121-127.

Wang, Y. Y., Peng, Y. Z., Peng, C. Y., Wang, S. Y., and Zeng, W. (2004b) Influence of ORP variation, carbon source and nitrate concentration on denitrifying phosphorus removal by DPB sludge from dephanox process. Water Science and Technology, **50**(10), 153-161.

Wiesmann, U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. Advances in biochemical engineering/biotechnology, A. Fiechter, ed., Berlin-Heidelberg.

Yang, S. F., Liu, Q. S., Tay, J. H., and Liu, Y. (2004) Growth kinetics of aerobic granules developed in sequencing batch reactors. Letters in Applied Microbiology, **38**(2), 106-112.

Yoo, K., Ahn, K. H., Lee, H. J., Lee, K. H., Kwak, Y. J., and Song, K. G. (1999) Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. Water Research, **33**(1), 145-154.

Yuan, Z. G., and Bogaert, H. (2001) A titrimetric respirometer measuring the nitrifiable nitrogen in wastewater using in-sensor-experiment. Water Research, **35**(1), 180-188.

Yun, Z., Jung, Y. H., Lim, B. R., Choi, E., and Min, K. S. (2004) The stability of nitrite nitrification with strong nitrogenous wastewater: effects of organic concentration and microbial diversity. Water Science and Technology, **49**(5-6), 89-96.

PUBLICACIONES

Publicaciones

Directamente relacionadas con la tesis doctoral

Ciudad, G., Werner, A., Bornhardt, C., Muñoz, C. and Antileo. C. (2006). Differential kinetics of ammonia and nitrite-oxidizing bacteria: a simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification. Process Biochemistry **41**: 1764-1762.

Antileo, C., Werner, A., **Ciudad, G.,** Muñoz, C., Bornhardt, C., Jeison, D. and Urrutia, H. (2006). Novel operational strategy for partial nitrification to nitrite in a sequencing batch rotating disk reactor. Biochemical Engineering Journal, **32**(2), 69-78

Ciudad, **G.**, González, R., Bornhardt, C. and Antileo, C. (2007). Modes of operation and pH control as enhancement factors for partial nitrification with oxygen transport limitation. Article *In Press*. Water Research DOI: 10.1016/j.watres.2007.06.036

Ciudad, G., Kreuter, S. Jaramillo, F. Antileo, C. Real time control of nitrification-denitrification in asequencing batch reactor. Artículo en preparación

Investigaciones anexas

Ruiz, G., Jeison, D., Rubilar, O., **Ciudad, G.** and Chamy, G. 2006. Nitrification-denitrification via nitrite accumulation for nitrogen removal from wastewaters. Bioresource Technology 97:330-335.

Ciudad, G., Rubilar, O., Muñoz, P., Ruiz, G., Chamy, R., Vergara, C. and Jeison, D. 2005. Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process. Process Biochemistry 40:1715-1719.

Azócar, L., Candia, O., **Ciudad, G**., and Antileo, C. (2007) Strategy of operation for partial nitrification in long-term and its aplication to a supervisory control system empiric and phenomenology. Artículo en preparación.

ANEXOS

Anexos

A1. MODELO

A continuación se muestran algunas ecuaciones que conforman el modelo para un reactor RDR nitrificante (Antileo *et al.*, 2007).

Velocidad de crecimiento especifica de las BAO

$$m_{BAO} = m_{\max,BAO} \cdot \frac{c_{NH3}}{Ks_{BAO} \cdot \left[1 + \frac{c_{HNO2}}{Ki_{BAO}}\right] + c_{NH3} + \frac{c_{NH3}^{2}}{Ki,s_{BAO}}} \cdot \frac{c'}{K'_{BAO} + c'} \tag{A.1}$$

Velocidad de crecimiento específica de las BNO

$$m_{BNO} = m_{\max,BNO} \cdot \frac{c_{HNO2}}{Ks_{BNO} \cdot \left[1 + \frac{c_{NH3}}{Ki_{BNO}}\right] + c_{HNO2} + \frac{c_{HNO2}^{2}}{Ki,s_{BNO}}} \cdot \frac{c'}{K'_{BNO} + c'} \tag{A.2}$$

Concentración de NAT en la pared de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{NAT,0}}{\partial t} = \frac{D_{NAT}}{L^2} \cdot \left(\frac{2 \cdot S_{NAT,(1/N)} - 2 \cdot S_{NAT,0}}{\Delta e^2} \right) - \frac{m_{BAO,0} \cdot c_{BAO,0}}{Y_{BAO/N-NO_2^-}} \tag{A.3}$$

para $e = 0$

Concentración de NAT dentro de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{NAT,e}}{\partial t} = \frac{D_{NAT}}{L^2} \cdot \left(\frac{S_{NAT,e-(1/N)} - 2 \cdot S_{NAT,e} + S_{NAT,e+(1/N)}}{\Delta e^2} \right) - \left(\frac{v_L \cdot e}{L} \right) \cdot \left(\frac{S_{NAT,e+(1/N)} - S_{NAT,e-(1/N)}}{2 \cdot \Delta e} \right) - \frac{m_{BAO,e} \cdot c_{BAO,e}}{Y_{AOB/NAT}} \tag{A.4}$$

para $1/N \leq e \leq 1-(1/N)$

Concentración de NAT en el borde de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{NAT,1}}{\partial t} = \frac{D_{NAT}}{L^2 \cdot \Delta e^2} \cdot \left[\left(a \cdot \left(c_{NAT,b} - c_{NAT,1} \right) + S_{NAT,1\text{-}(1/N)} \right) - 2 \cdot S_{NAT,1} + S_{NAT,1\text{-}(1/N)} \right] -$$
$$- \left(\frac{v_L \cdot e}{L} \right) \cdot \left[\frac{\left(a \cdot \left(c_{NAT,b} - c_{NAT,1} \right) + S_{NAT,1\text{-}(1/N)} \right) - S_{NAT,1\text{-}(1/N)}}{2 \cdot \Delta e} \right] - \frac{m_{BAO,1} \cdot c_{BAO,1}}{Y_{BAO/NAT}} \qquad \text{(A.5)}$$

para $e = 1$

Concentración de NAT en el borde de la biopelícula

$$\frac{\partial c_{NAT,1+(1/N)}}{\partial t} = \frac{Q_0 \cdot c_{NAT,e}}{V} - \frac{Q_R \cdot c_{NAT,1+(1/N)}}{V} - a_p \cdot D_{NAT} \cdot \left[\frac{\left(a \cdot \left(c_{NAT,1+(1/N)} - c_{NAT,1} \right) + S_{NAT,1\text{-}(1/N)} \right) - S_{NAT,1\text{-}(1/N)}}{2\Delta e} \right] \qquad \text{(A.6)}$$

Concentración de nitrito en la pared de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{N-NO_2^-,0}}{\partial t} = \frac{D_{N-NO_2^-}}{L^2} \cdot \left(\frac{2 \cdot S_{N-NO_2^-,(1/N)} - 2 \cdot S_{N-NO_2^-,0}}{\Delta e^2} \right) + \frac{m_{BAO,(1/N)} \cdot c_{BAO,(1/N)}}{Y_{BAO/N-NO_2^-}} - \frac{m_{BNO,(1/N)} \cdot c_{BNO,(1/N)}}{Y_{BNO/N-NO_2^-}}$$

$$para \quad e = 0$$

(A.7)

Anexos

Concentración de nitrito dentro de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{N-NO_2^-,e}}{\partial t}=\frac{D_{N-NO_2^-}}{L^2}\cdot\left(\frac{S_{N-NO_2^-,e-(1/N)}-2\cdot S_{N-NO_2^-,e}+S_{N-NO_2^-,e+(1/N)}}{\Delta e^2}\right)-\left(\frac{v_L\cdot e}{L}\right)\cdot\left(\frac{S_{N-NO_2^-,e+(1/N)}-S_{N-NO_2^-,e-(1/N)}}{2\cdot\Delta e}\right)+$$
$$\frac{m_{BAO,e}\cdot c_{BAO,e}}{Y_{BAO/N-NO_2^-}}-\frac{m_{BNO,e}\cdot c_{BNO,e}}{Y_{BNO/N-NO_2^-}}$$

$$para\ \ 1/N\le e\le 1-(1/N)$$

(A.8)

Concentración de nitrito en el borde de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{N-NO_2^-,1}}{\partial t}=\frac{D_{N-NO_2^-}}{L^2\cdot\Delta e^2}\cdot\left[\left(a\cdot\left(c_{N-NO_2^-,b}-c_{N-NO_2^-,1}\right)+S_{N-NO_2^-,1-(1/N)}\right)-2\cdot S_{N-NO_2^-,1}+S_{N-NO_2^-,1-(1/N)}\right]-$$
$$-\left(\frac{v_L\cdot e}{L}\right)\cdot\left[\frac{\left(a\cdot\left(c_{N-NO_2^-,b}-c_{N-NO_2^-,1}\right)+S_{N-NO_2^-,1-(1/N)}\right)-S_{N-NO_2^-,1-(1/N)}}{2\cdot\Delta e}\right]+\frac{m_{BAO,1}\cdot c_{BAO,1}}{Y_{BAO/N-NO_2^-}}-\frac{m_{BNO,1}\cdot c_{BNO,1}}{Y_{BNO/N-NO_2^-}}$$

$$para\ \ e=1$$

(A.9)

Concentración de nitrito en el seno del fluido

$$\frac{\partial c_{N-NO_2^-,1+(1/N)}}{\partial t}=\frac{Q_0\cdot c_{N-NO_2^-,e}}{V}-\frac{Q_R\cdot c_{N-NO_2^-,1+(1/N)}}{V}-a_p\cdot D_6\cdot\left[\frac{\left(a\cdot\left(c_{N-NO_2^-,1+(1/N)}-c_{N-NO_2^-,1}\right)+S_{N-NO_2^-,1-(1/N)}\right)-S_{N-NO_2^-,1-(1/N)}}{2\Delta e}\right]$$

(A.10)

Concentración de nitrato en la pared de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{N-NO_3^-,0}}{\partial t} = \frac{D_{N-NO_3^-}}{L^2} \cdot \left(\frac{2 \cdot S_{N-NO_3^-,(1/N)} - 2 \cdot S_{N-NO_3^-,0}}{\Delta e^2} \right) + \frac{m_{BNO,(1/N)} \cdot c_{BNO,(1/N)}}{Y_{BNO/N-NO_2^-}}$$

$$para \quad e = 0 \tag{A.11}$$

Concentración de nitrato dentro de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{N-NO_3^-,e}}{\partial t} = \frac{D_{N-NO_3^-}}{L^2} \cdot \left(\frac{S_{N-NO_3^-,e-(1/N)} - 2 \cdot S_{N-NO_3^-,e} + S_{N-NO_3^-,e+(1/N)}}{\Delta e^2} \right) - \left(\frac{v_L \cdot e}{L} \right) \cdot \left(\frac{S_{N-NO_3^-,e+(1/N)} - S_{N-NO_3^-,e-(1/N)}}{2 \cdot \Delta e} \right) + \frac{m_{BNO,e} \cdot c_{BNO,e}}{Y_{BNO/N-NO_2^-}}$$

$$para \quad 1/N \le e \le 1-(1/N) \tag{A.12}$$

Concentración de nitrato en el borde de la biopelícula

$$\frac{\partial S_{N-NO_3^-,1}}{\partial t} = \frac{D_{N-NO_3^-}}{L^2 \cdot \Delta e^2} \cdot \left[\left(a \cdot \left(c_{N-NO_3^-,b} - c_{N+5,1} \right) + S_{N-NO_3^-,1-(1/N)} \right) - 2 \cdot S_{N-NO_3^-,1} + S_{N-NO_3^-,1-(1/N)} \right] - \left(\frac{v_L \cdot e}{L} \right) \cdot \left[\frac{\left(a \cdot \left(c_{N-NO_3^-,b} - c_{N-NO_3^-,1} \right) + S_{N-NO_3^-,1-(1/N)} \right) - S_{N-NO_3^-,1-(1/N)}}{2 \cdot \Delta e} \right] + \frac{m_{BNO,1} \cdot c_{BNO,1}}{Y_{BNO/N-NO_2^-}}$$

$$para \quad e = 1 \tag{A.13}$$

Anexos

Concentración de nitrito en el seno del fluido

$$\frac{\partial c_{N-NO_3^-,1+(1/N)}}{\partial t} = \frac{Q_0 \cdot c_{N-NO_3^-,e}}{V} - \frac{Q_R \cdot c_{N-NO_3^-,1+(1/N)}}{V} - a_p \cdot D_{N-NO_3^-} \cdot \left[\frac{\left(a \cdot \left(c_{N-NO_3^-,1+(1/N)} - c_{N-NO_3^-,1} \right) + S_{N-NO_3^-,1-(1/N)} \right) - S_{N-NO_3^-,1-(1/N)}}{2\Delta e} \right]$$

$$para \;\; e = 1 + (1/N)$$

(A.14)

Parámetros del modelo

a_p = Área específica del reactor RDR, m^2/m^3.

c_i = Concentración de i en el seno del fluido, mg/L

D_i = Coeficiente de difusión de i: N-3, N+3, N+5, O_2, CO_2 en la biopelícula, m^2/h.

$e_{(i)}$ = Porcentaje de error relativo, %

L = Espesor de la biopelícula, m

Q_0 = Caudal de entrada, L/h

Q_p = Caudal de carbonato, L/h

Q_R = Caudal de salida, L/h

S_i = Concentración de i en la biopelícula, mg/L

v_L = Velocidad de la especie i al interior de la biopelícula, m/h

z = Coordenada espacial perpendicular al soporte, m

e = Coordenada espacial auxiliar, m

Sub índices

b = Seno del fluido

0 = Concentración de entrada

l = Líquido

BAO = Bacterias amonio oxidantes

BNO = Bacterias nitrito oxidantes

A2. PROGRAMA RESPIROMETRÍA

Programa desarrollado en ambiente Mathlab

```
function varargout = Respirometria(varargin)
% RESPIROMETRIA M-file for Respirometria.fig
%      RESPIROMETRIA, by itself, creates a new RESPIROMETRIA or raises the existing
%      singleton*.
%
%      H = RESPIROMETRIA returns the handle to a new RESPIROMETRIA or the handle to
%      the existing singleton*.
%
%      RESPIROMETRIA('CALLBACK',hObject,eventData,handles,...) calls the local
%      function named CALLBACK in RESPIROMETRIA.M with the given input arguments.
%
%      RESPIROMETRIA('Property','Value',...) creates a new RESPIROMETRIA or raises the
%      existing singleton*.  Starting from the left, property value pairs are
%      applied to the GUI before Respirometria_OpeningFunction gets called.  An
%      unrecognized property name or invalid value makes property application
%      stop.  All inputs are passed to Respirometria_OpeningFcn via varargin.
%
%      *See GUI Options on GUIDE's Tools menu.  Choose "GUI allows only one
%      instance to run (singleton)".
%
% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES

% Edit the above text to modify the response to help Respirometria

% Last Modified by GUIDE v2.5 12-Aug-2004 23:11:37

% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',       mfilename, ...
```

```
                'gui_Singleton',  gui_Singleton, ...
                'gui_OpeningFcn', @Respirometria_OpeningFcn, ...
                'gui_OutputFcn',  @Respirometria_OutputFcn, ...
                'gui_LayoutFcn',  [] , ...
                'gui_Callback',   []);
if nargin & isstr(varargin{1})
   gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end

if nargout
   [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
   gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% End initialization code - DO NOT EDIT


% --- Executes just before Respirometria is made visible.
function Respirometria_OpeningFcn(hObject, eventdata, handles, varargin)
% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
% varargin   command line arguments to Respirometria (see VARARGIN)

% Choose default command line output for Respirometria
handles.output = hObject;

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);
```

Anexos

```
% UIWAIT makes Respirometria wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);

csvwrite('f:\inicio_respirometria.m',0);
questdlg('Para comenzar respirometria asegurese de cerrar adquisicion del Menu principal','!!!
Warning','OK','OK');
ch=ddeinit('kepdde','plc_cstr');
valvula=ddereq(ch,'valvula');
sp_ph=ddereq(ch,'setpoint_ph');
bomba_ph=ddereq(ch,'salida');
set(handles.edit3,'string',valvula);
if valvula==0
   set(handles.text31,'string','Valvula Cerrada');
else
  set(handles.text31,'string','Valvula Abierta');
end
set(handles.edit3,'string',valvula/10);
set(handles.edit6,'string',sp_ph/1000);
set(handles.edit7,'string',bomba_ph);
ddeterm(ch);

csvwrite('f:\setpointactual_ph_cstr.m',sp_ph);

% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = Respirometria_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
% varargout  cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
```

```
varargout{1} = handles.output;
% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit1_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to edit1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc
   set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
   set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end



function edit1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to edit1 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of edit1 as text
%        str2double(get(hObject,'String')) returns contents of edit1 as a double


% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function edit2_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to edit2 (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called
```

```
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc
   set(hObject,'BackgroundColor','white');
else
   set(hObject,'BackgroundColor',get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'));
end
```

A3. PROGRAMA SENSOR VIRTUAL DE NAT Y CONTROL SUPERVISOR DE pH

Programa desarrollado en ambiente Mathlab.

```
% Ingreso de datos iniciales y del proceso
intervalo = input('Numero del intervalo para el RDR2: ','s');
N30 = input('Concentracion inicial de nitrogeno amoniacal total N-3 [mg NH3-N/L]: ');
NH3 = input('Concentracion deseada de amoniaco NH3 [mg NH3-N/L]: ');
CO3 = input('Concentracion de solucion de carbonato CO3 [mol/L]: ');
CO3N3 = input('Relacion: consumo de CO3 / consumo de N-3 [mol/mol]: ');
Vpulso = input('Volumen de un pulso de la bomba para el control de pH [mL]: ');
Vreactor = input('Volumen del reactor [L]: ');
nothing = input('Asegura que el pH actual es de 7.5 y presiona ENTER para empezar!');
% Inicializacion de la conexion al PLC
ch = ddeinit('Kepdde','PLC_RDR2');
% Inicializar contador
i = 0;
% Adquerir valor inicial del contador de pulsos de la bomba para el control
% de pH
% pulsosini = ddereq(ch,'pulsos');
ddepoke(ch,'reset_pulsos',1);
ddepoke(ch,'reset_pulsos',0);
% Inicializar setpoint actual
setpointact = 7500;
% Preparando archivo de datos
filename = ['c:\arne\Initial-Phase\RDR2-Intervall-' intervalo '-' datestr(clock,30) '.txt'];
file=fopen(filename,'w');
fprintf(file,'Datos ingresados:\n');
fprintf(file,'Numero del intervalo de batch para fase inicial: %s\n',intervalo);
fprintf(file,'Concentracion inicial de nitrogeno amoniacal N-3: %5.1f mg N/L\n',N30);
fprintf(file,'Concentracion deseada de amoniaco NH3: %5.2f mg NH3-N/L\n',NH3);
fprintf(file,'Concentracion de solucion de carbonato CO3: %4.2f mol/L\n',CO3);
fprintf(file,'Relacion: consumo de CO3 / consumo de N-3: %4.2f mol/mol\n',CO3N3);
```

```
fprintf(file,'Volumen de un pulso de la bomba para el control de pH: %5.2f mL\n',Vpulso);
fprintf(file,'\nDate\t\tTime\t\t[N-3]\tPulses\tSetpoint\tpH\t\tTemperature\n');
fprintf('\nDate\t\tTime\t\t[N-3]\tPulses\tSetpoint\tpH\t\tTemperature\n');
% Control del pH para tener siempre 'NH3' como concentracion de amoniaco
while setpointact < 8500
   i= i+1;
   % Adquerir datos actuales del reactor
   A(i).fecha = datestr(clock,1);
   B(i).hora = datestr(clock,13);
   pH(i) = ddereq(ch,'pH');
   T(i) = ddereq(ch,'Temperatura');
   pulsos(i) = ddereq(ch,'pulsos');
   % pulsos(i) = pulsosact - pulsosini;
   % Calculo del valor actual de [N-3]
   N3(i) = ((N30 * Vreactor) - (pulsos(i) * Vpulso * CO3 * 14 / CO3N3)) / Vreactor;
   % Calculo de la constante de equilibrio
   ka = exp(6344 / (T(i) + 273));
   % Calculo de setpoint mediante la ecuacion de equilibrio
   setpoint(i) = log10(NH3 * ka / (N3(i) - NH3));
   if setpoint(i) <= 7.5
      setpointact = 7500;
   elseif setpoint(i) >= 8.5
      setpointact = 8500;
   else
      setpointact = setpoint(i) * 1000;
   end
   %
fprintf(file,'%s\t%s\t%5.1f\t%i\t\t%4.2f\t%4.2f\t%4.1f\n',A(i).fecha,B(i).hora,N3(i),pulsos(i),s
etpoint(i),pH(i),T(i));
fprintf(file,'\n%s',A(i).fecha);
fprintf(file,'\t%s',B(i).hora);
```

```
fprintf(file,'\t%5.1f',N3(i));
fprintf(file,'\t%i',pulsos(i));
fprintf(file,'\t\t%4.2f',setpoint(i));
fprintf(file,'\t%4.2f',pH(i),T(i));
fprintf(file,'\t%4.1f',T(i));
   %
fprintf('%s\t%s\t%5.1f\t%i\t\t%4.2f\t\t%4.2f\t%4.1f\n',A(i).fecha,B(i).hora,N3(i),pulsos(i),setp
oint(i),pH(i),T(i));
fprintf('\n%s',A(i).fecha);
fprintf('\t%s',B(i).hora);
fprintf('\t%5.1f',N3(i));
fprintf('\t%i',pulsos(i));
fprintf('\t\t%4.2f',setpoint(i));
fprintf('\t\t%4.2f',pH(i));
fprintf('\t%4.1f',T(i));
   % Enviar nuevo setpoint al PLC
   ddepoke(ch,'SetPoint_ph',setpointact);
   % Plot de la curva de [N-3]
   plot(N3);
   pause(5*60);
end
fclose(file);
% Cerrar valvula de aireacion ( kd_anaerobico < kd_aerobico )
ddepoke(ch,'setpoint_o2',0);
% Termino del programa: Valor actual de [N-3] para calcular valor inicial
% de [N-3] para proxima fase Batch.
nothing = input(' El setpoint en el RDR2 ha llegado al valor maximo de pH 8.5.\n La aireacion
ha sido cortado para prevenir un decaimiento elevado.\n Presiona ENTER!');
pulsosend = ddereq(ch,'pulsos');
% pulsosend = pulsosact - pulsosini;
N3end = ((N30 * Vreactor) - (pulsosend * Vpulso * CO3 * 14 / CO3N3)) / Vreactor;
```

```
fprintf('\nEl valor actual de N-3 es %1.2f mg/L.',N3end);
% Cerrar conexion al PLC
ddeterm(ch);
```