

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

**“Nitrificación y Desnitrificación Autótrofa Simultánea en un
Reactor Secuencial *Batch* usando Azufre Elemental como Dador
de Electrones.”**

MARIO ANDRÉS CORBALÁN GUTIÉRREZ

MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA

PROFESOR GUÍA: LORNA GUERERO

PROFESOR CORREFERENTE: CRISTOPHER DA SILVA

PROFESOR CORREFERENTE EXTERNO: CÉSAR HUILIÑIR

Octubre 2019, Valparaíso

Agradecimientos.

Resumen.

La tecnología de nitrificación-desnitrificación autótrofa simultánea en un reactor secuencial *batch* (SND-SBR) resulta ser una tecnología emergente (en fase de estudio) y versátil para la eliminación de compuestos nitrogenados presentes en efluentes de la industria. Sin embargo, requiere una atención especial en las estrategias operativas debido a la baja tasa de crecimiento de los microorganismos autótrofos, la sensibilidad a los cambios de pH, temperatura y oxígeno disuelto, además de los costos energéticos en los que se incurren al tratar de controlar estas variables.

El objetivo de la investigación consiste la puesta en marcha y posterior operación de un reactor SBR de nitrificación/desnitrificación autótrofa con azufre elemental como dador de electrones, con el fin de evaluar el comportamiento operacional y estudiar la cinética del sistema propuesto, en el marco del proyecto Fondecyt 1170103: “*Simultaneous Removal of Carbon-Nitrogen-Sulfide in a New Sequential Batch Biofilm Reactor with Elemental Sulfur and Zeolite as Support: Performance and Modeling*”.

Para ello, se montó un reactor de 2 L, el cual se inoculó utilizando lodo anaerobio de purín de cerdo y lodo aerobio obtenido de una planta faenadora de pollos. El reactor fue operado con una estrategia de alimentación distribuida, también llamada *step-feed*, la que permite disminuir los efectos de inhibición por sustrato. La operación se realizó con ciclos de tres días, distribuidos en 3 alimentaciones de una hora cada una, luego ocho horas de operación anóxica donde es llevada a cabo la desnitrificación, ocho horas de operación aireada donde es llevada a cabo la nitrificación, seis horas más de operación anóxica y finalmente una hora de operación aeróbica. Al finalizar el tercer sub-ciclo, se realiza una sedimentación y posterior extracción del efluente.

El sistema SND-SBR fue operado un total de 154 días en los cuales se realizaron 51 ciclos completos. Se operó con velocidades de carga nitrogenada (VCN) ascendente, desde 0,0296 hasta 0,0426 kg NTK/m³·d. La relación C/N se mantuvo constante durante toda la operación a través del uso de una alimentación sintética. El reactor se mantuvo en ambiente de oscuridad y a una temperatura de 31°C.

La oxidación de amonio durante el período de trabajo fue de alta eficiencia y adaptabilidad, ya que el sistema SND-SBR solo tardó 5 ciclos en alcanzar rendimientos superiores al 80%. Finalmente, la eficiencia del proceso de nitrificación (procesos aerobio) durante toda la

operación del reactor fue de 98,63%. El buen desempeño del proceso aerobio y las altas eficiencias alcanzadas se debe a el potenciamiento de metabolismos oxidantes entre poblaciones microbianas que llevan a cabo el proceso aerobio del sistema SND y una mayor concentración de microorganismos por sedimentación y retención celular. Esto quiere decir que la sedimentación logra mantener casi completamente a los microorganismos dentro del reactor.

El porcentaje de remoción promedio de nitrógeno durante la operación, tanto puesta en marcha como operación con RIL sintético de composición constante, fue de 46,33%. Además se concluye que la etapa limitante en el proceso es la desnitrificación autótrofa que utiliza azufre como dador de electrones.

Mediante experimentos realizados en laboratorio se confirma que no hay indicios de aumento en la concentración de sulfatos a lo largo del tiempo producto de la aireación, por ende, se descarta que el oxígeno en el sistema oxida al azufre y se valida que la generación de sulfatos es solo producto de la desnitrificación.

Se realizaron experimentos de nitrificación y desnitrificación a modo de ajustar un modelo cinético que represente la actividad metabólica de los microorganismos que son partícipes en el sistema SND-SBR. Para los microorganismos BAO (amonio-oxidantes) la cinética que mejor se ajustó fue la del tipo Monod y para los microorganismos BNO (nitrito oxidantes) fue una cinética del tipo Haldane, este modelo incluye un término de inhibición por sustrato, que tiene directa relación con el nitrito y la posibilidad de formar ácido nitroso, el cual es sumamente tóxico y genera inhibición. Finalmente, para los microorganismos desnitrificantes se ajustó una cinética de orden un medio, propia de cuando la reacción ocurre gracias a la presencia de un *biofilm*, que en este caso se forma utilizando la misma pastilla de azufre como soporte.

Abstract.

Simultaneous autotrophic nitrification-denitrification technology in a batch sequential reactor (SND-SBR) turns out to be an emerging and versatile technology for the elimination of nitrogen compounds present in industry effluents. However, it requires special attention in operational strategies due to the low growth rate of autotrophic microorganisms, sensitivity to changes in pH, temperature and dissolved oxygen, in addition to the energy costs incurred in trying to control these variables

The objective of the investigation was the start-up and subsequent operation of an SBR autotrophic nitrification / denitrification reactor with elemental sulfur as an electron donor, in order to evaluate the operational behavior and study the kinetics of the proposed system.

For this, a 2 L reactor was mounted, which was inoculated using anaerobic sludge of pig slurry and aerobic sludge obtained from a chicken slaughter plant. The reactor was operated with a distributed feeding strategy, also called *step-feed*, this strategy allows to reduce the effects of substrate inhibition. The operation was performed with three-day cycles, distributed in 3 feeds of one hour each, then eight hours of anoxic operation where denitrification is carried out, eight hours of aerated operation where nitrification is carried out, six more hours of anoxic operation and finally one hour of aerobic operation. At the end of the third subcycle, sedimentation and subsequent effluent extraction are performed.

The SND-SBR system was operated a total of 154 days in which 51 complete cycles were performed. It was operated with ascending nitrogen loading (VCN) speeds, from 0.0296 to 0.0426 kg NTK / m³ · d. The C / N ratio remained constant throughout the operation through the use of a synthetic feed. The reactor was kept in a dark environment and at a temperature of 31 ° C.

Ammonium oxidation during the work period was of high efficiency and adaptability, since the SND-SBR system only took 5 cycles to reach yields greater than 80%. Finally, the efficiency of the nitrification process (aerobic processes) during the entire operation of the reactor was 98.63%. The good performance of the aerobic process and the high efficiencies achieved are due to the formation of anoxic / aerobic microenvironments in the thickness of the biofilm formed on the surfaces of the sulfur lentils, the potentiation of oxidizing metabolisms between microbial populations that carry out the process aerobic SND system and a higher concentration of microorganisms by sedimentation and cell retention. This

means that sedimentation manages to keep microorganisms almost completely inside the reactor.

The average nitrogen removal percentage during the operation was 46.33%, which concludes that the limiting stage in the process is autotrophic denitrification using sulfur as an electron donor.

Through experiments carried out in the laboratory, it is confirmed that there is no evidence of an increase in sulfate concentration over time due to aeration, therefore, it is ruled out that the oxygen in the system oxidizes sulfur and it is validated that sulfate generation is purely the product of denitrification.

Nitrification and denitrification scans were performed in order to adjust a kinetic model that represents the metabolic activity of microorganisms that are involved in the SND-SBR system. For the BAO (ammonium-oxidizing) microorganisms, the kinetics that best fit was that of the Monod type and for the BNO (oxidizing nitrite) microorganisms it was a kinetics of the Haldane type, this model includes a substrate inhibition term, which has a direct relationship with nitrite and the possibility of forming nitrous acid, which is highly toxic and generates inhibition. Finally, for the denitrifying microorganisms, a medium order kinetics was adjusted, typical of when the reaction occurs thanks to the presence of a biofilm, in this case the biofilm is formed using the same sulfur tablet as a support.

Índice.

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
1 INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 GENERALIDADES.	11
1.2 OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.	12
2 MARCO TEÓRICO.....	13
2.1 CICLO DEL NITRÓGENO.	13
2.2 COMPUESTOS NITROGENADOS COMO AGENTES CONTAMINANTES.	14
2.3 REMOCIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.	15
2.3.1 Nitrificación.	15
2.3.2 Desnitrificación Heterótrofa.	17
2.3.3 Desnitrificación autótrofa.	17
2.4 ESTADO DEL ARTE:.....	18
2.5 CONTROL DE PH.	20
2.6 SIMULTANEIDAD SND EN LA OPERACIÓN DE UN SBR.....	21
2.7 CINÉTICA DE UN SISTEMA SND.	23
2.7.1 Cinética de microorganismos nitrificantes	23
2.8 CINÉTICA DE MICROORGANISMOS DESNITRIFICANTES.....	27
2.9 CONFIGURACIÓN Y ESTRATEGIAS OPERATIVAS DE UN REACTOR SBR PARA LOGRAR SND.....	29
2.9.1 Tecnología SBR.....	29
2.9.2 Configuración de Etapas.	31
2.9.3 Técnicas y estrategias de Operación	31
2.10 CONTROL DE UN PROCESO SND-SBR: PUNTOS CARACTERÍSTICOS.....	33
3 MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	35
3.1 MATERIALES.....	35
3.1.1 Insumos: Sustratos Sintéticos.....	35
3.1.2 Equipos y Materiales	36
3.1.3 Inóculo.	37
3.2 REACTOR SBR.....	37
3.2.1 Diseño.	38
3.2.2 Montaje del Reactor.....	40
3.2.3 Diseño de ciclo SND.	41
3.3 ESTRATEGIA DE OPERACIÓN.....	43

3.3.1	<i>Criterio de estabilidad y aumento de la VCN.</i>	44
3.4	PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS Y ADQUISICIÓN DE DATOS.	45
3.4.1	<i>Variables de Análisis.</i>	45
3.4.2	<i>Procedimientos de Análisis.</i>	46
3.5	ETAPAS OPERACIONALES DE LA PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL.	46
3.5.1	<i>Etapas de Puesta en Marcha.</i>	47
3.5.2	<i>Etapas operacionales de Alimentación Sintética de composición constante.</i>	47
3.6	ENSAYOS BIOLÓGICOS Y MODELACIÓN	48
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	49
4.1	COMPORTAMIENTO OPERACIONAL DEL REACTOR.	49
4.1.1	<i>Biomasa SND.</i>	50
4.1.2	<i>Estudio del comportamiento de remoción de nitrógeno. Eficiencias y Adaptabilidad.</i>	53
4.2	INTERACCIONES Y MODELO CINÉTICO	59
4.2.1	<i>Ensayos de oxidación aerobia del azufre elemental.</i>	59
4.2.2	<i>Ensayos de Nitrificación</i>	61
4.2.3	<i>Modelación Microorganismos Nitrificantes.</i>	65
4.2.4	<i>Ensayos de Desnitrificación.</i>	80
4.3	RELACIÓN ENTRE MODELOS CINÉTICOS Y EL COMPORTAMIENTO OPERACIONAL DEL REACTOR.	87
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	93
5.1	CONCLUSIONES.	93
5.2	RECOMENDACIONES.	94
6	REFERENCIAS	96
ANEXOS		98
A.	PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS	98
A.1	<i>Método espectrofotométrico uv-vis para determinación: nitratos.</i>	98
A.2	<i>Determinación de nitritos por método espectrofotométrico.</i>	99
A.3	<i>Determinación amonio método fenol.</i>	101
A.4	<i>Método turbidimétrico modificado para sulfatos.</i>	103
A.5	<i>Determinación Sólidos Suspendidos Totales.</i>	104
A.6	<i>Determinación Sólidos Suspendidos Volátiles.</i>	105
B.	IMÁGENES DE MICROSCOPIO	107
C.	ESTUDIO CINÉTICO	110
D.	MÉTODO NÚMÉRICO DE RUNGE-KUTTA	111
E.	BALANCE DE MATERIA: NITRÓGENO EN EL SISTEMA.	113

Índice de Figuras

Figura 2-1 Ciclo del Nitrógeno. (Herráez, 2019)	13
Figura 2-2 Transformación oxidativa secuencial dentro de la nitrificación total. Fuente: ..	16
Figura 2-3 Etapas sucesivas de la desnitrificación. Fuente:	18
Figura 2-4 Concentraciones relativas de NH_3 y NH_4^+ en función del pH. (Jorgensen, 2003)	21
Figura 2-5 Diagrama de un flóculo de lodo activado que muestra zonas aeróbicas y anóxicas (Metcalf y Eddy, 2014).....	23
Figura 2-6 Gráfica esquemática de las transformaciones de nitrógeno durante una nitrificación no inhibida en experimento del tipo batch (Anthonisen et al., 1976).	24
Figura 2-7 Secuencia de las Fases de un proceso llevado a cabo en un reactor SBR (Adpatado de Puig, 2008).....	30
Figura 2-8 Ciclo típico (9h) para conseguir el 90 por 100 de eliminación de N con un reactor discontinuo secuencial. (Adpatación de Rittmann y McCarty, 2014).....	31
Figura 2-9 Puntos de inflexión para nitrificación (A-D) y desnitrificación (E-F), donde las flechas muestran el punto de inflexión específico para cada perfil de parámetro Adaptado de (Puig, 2005) y de (Poo, 2006).....	33
Figura 2-10 Esquema del proceso de nitrificación parcial mediante el uso de atajos entre nitrificación y desnitrificación. Fuente: Adaptación de Jaramillo (2018).	34
Figura 3-1 Esquema de partes constituyentes del reactor SBR-SND. Fuente:	38
Figura 3-2 Compresores de Aire de Acuario.....	39
Figura 4-1 Volumen del reactor al final de cada ciclo durante toda la operación.	49
Figura 4-2 Control de pH durante la operación versus la Velocidad de Carga Nitrogenada..	50
Figura 4-3 Comportamiento del crecimiento microbiano.	51
Figura 4-4 Masa de nitrógeno amoniacal presente en el sistema SND-SBR, al comienzo y final de los ciclos de operación.....	53
Figura 4-5 Eficiencia de Nitrificación del ciclo en el tiempo versus Nitrogeno amoniacal en la alimentación al comienzo del Ciclo.....	54
Figura 4-6 Nitrógeno inicial en el sistema para cada Ciclo versus Cantidad de Nitrato y Nitrito al final de cada Ciclo.	56
Figura 4-7 Eficiencia de la Desnitrificación de los ciclos durante la operación.	56
Figura 4-8 Niveles de Remoción de Nitrógeno de cada ciclo durante todo el trabajo expérimental.	59
Figura 4-9 Experimento de Aeración de Pastillas de Azufre.	60
Figura 4-10 Experimento de Nitrificación nº1 Concentración de Amonio Inicial Alta.	62

Figura 4-11 Experimento de Nitrificación nº2. Concentración de Amonio Inicial Baja.....	63
Figura 4-12 Experimento de Nitrificación nº3. Concentración de Amonio Inicial Media...	63
Figura 4-13 Experimento de Nitrificación nº4. Concentración de Amonio Inicial Media..	64
Figura 4-14 Oxígeno Disuelto en cada Barrido de Nitrificación en el tiempoCinética Microorganismos BAO.....	66
Figura 4-15 Ajuste del modelo de Haldane BAO respecto al Experimento nº 1.	68
Figura 4-16 Ajuste del modelo de Haldane BAO respecto al Experimento nº 2.	68
Figura 4-17 Ajuste del modelo de Haldane BAO respecto al Experimento nº 3.	69
Figura 4-18 Ajuste del modelo de Haldane BAO respecto al Experimento nº4.	69
Figura 4-19 Ajuste del modelo de Monod BAO respecto al Experimento nº1.	71
Figura 4-20 Ajuste del modelo de Monod BAO respecto al Experimento nº2..	71
Figura 4-21 Ajuste del modelo de Monod BAO respecto al Experimento nº3.	72
Figura 4-22 Ajuste del modelo de Monod BAO respecto al Experimento nº4.	72
Figura 4-23 Ajuste del modelo de Haldane BNO respecto al Experimento nº1.	74
Figura 4-24 Ajuste del modelo de Haldane BNO respecto al Experimento nº2.	75
Figura 4-25 Ajuste del modelo de Haldane BNO respecto al Experimento nº3.	75
Figura 4-26 Ajuste del modelo de Haldane BNO respecto al Experimento nº4.	76
Figura 4-27 Ajuste del modelo de Monod BNO respecto al Experimento nº1.	77
Figura 4-28 Ajuste del modelo de Monod BNO respecto al Experimento nº2..	78
Figura 4-29 Ajuste del modelo de Monod BNO respecto al Experimento nº3.	78
Figura 4-30 Ajuste del modelo de Monod BNO respecto al Experimento nº4.	79
Figura 4-31 Experimento de Desnitrificación nº1.	81
Figura 4-32 Experimento de Desnitrificación nº2.	81
Figura 4-33 Ajuste del modelo de orden $\frac{1}{2}$ para Desnitrificación para Experimento nº1...	83
Figura 4-34 Ajuste del modelo de orden $\frac{1}{2}$ para Desnitrificación para Experimento nº2...	83
Figura 4-35 Ajuste del modelo de orden 1 para Desnitrificación para Experimento nº1.....	84
Figura 4-36 Ajuste del modelo de orden 1 para Desnitrificación para Experimento nº2....	85
Figura 4-37 Ajuste del modelo de orden 0 para Desnitrificación para Experimento nº1	86
Figura 4-38 Ajuste del modelo de orden 0 para Desnitrificación para Experimento nº2....	86
Figura 4-39 Comportamiento Teórico de Sistema SND-SBR para el Ciclo 30.	89
Figura 4-40 Comportamiento Teórico de Sistema SND-SBR para el Ciclo 34.....	89
Figura 4-41 Comportamiento Teórico de Sistema SND-SBR para el Ciclo 40.....	90

Figura B-1 Cúmulos microbianos suspendidos extraídos del Reactor SBR-SND. (20x Aumento).....	107
Figura B-2 Aglomeración de microorganismos suspendidos. (40x Aumento).....	107
Figura B-3 Biofilm que producen los microorganismos desnitrificantes del sistema SND-SBR. (40x Aumento).....	108
Figura B-4 Cúmulo de microorganismos bajo tinción. Se aprecian levaduras. (40x Aumento).	108
Figura B-5 Microorganismos (se identifican levaduras) adheridos a la pastilla de azufre. (40x Aumento).....	109

Índice de Tablas

Tabla 3-1 Composición del Sutrato Nitrificante.....	35
Tabla 3-2 Composición del Sutrato Desnitrificante.	36
Tabla 3-3 Equipo y Materiales para el sistema SND-SBR.....	36
Tabla 3-4 Etapas del Ciclo. Fuente:	43
Tabla 3-5 Estrategia de Operación Proyectada. Fuente:.....	44
Tabla 3-6 Variables de Medición durante el trabajo experimental.	45
Tabla 3-7 Procedimiento de Análisis de Muestras.	46
Tabla 4-1 Modificación de Variables durante la operación del sistema SND-SBR. Fuente:	51
Tabla 4-2 Coeficientes de determinación (general y ajustado) de los modelos. Fuente:	79
Tabla 4-3 Comparación de Valores de Parámetros Ajustados v/s Valores de Parámetros según literatura.	80
Tabla 4-4 Resultado de los Ajustes de las cinéticas de Desnitrificación.....	87
Tabla 4-5 Condiciones iniciales para llevar a cabo la simulación teórica de un ciclo de operación del sistema.....	88
Tabla 4-6 Remoción de nitrógeno y eficiencias en cada ciclo..	91
Tabla C-1 Resultados Experimentales de los Experimentos de Nitrificación.....	110

1 Introducción.

1.1 Generalidades.

En la actualidad, muchas aguas residuales industriales, tales como las plantas de pulpa y papel, plantas petroquímicas, curtidurías, fábricas textiles, industria farmacéutica, industria de procesamiento de alimentos, vertederos de basura y los efluentes de la digestión anaerobia de lodos y desechos agrícolas, contienen compuestos químicos específicos y fácilmente identificables, como amoníaco, sulfuros y sustancias carbonosas.

El amoníaco y los sulfuros en las aguas residuales no solo pueden corroer las instalaciones de tratamiento de aguas y las tuberías de drenaje, sino que también pueden causar una grave contaminación ambiental (Aesoy y Bentzen, 1998).

Para tratar estos compuestos (carbono-nitrógeno-azufre), se han propuesto procesos biológicos, la mayoría constan de dos o más pasos (nitrificación aeróbica y oxidación de sulfuro seguidos de desnitrificación anóxica) y requieren dos reactores separados, además, estas tecnologías poseen falencias que obstaculizan la obtención de una adecuada robustez operacional. Dentro de las falencias se pueden mencionar: bajas tasas de crecimiento microbiano, alta sensibilidad a cambios de pH, temperatura y oxígeno disuelto, altos costos energéticos y disponibilidad de materia orgánica. Es más, en la desnitrificación heterótrofa, ampliamente utilizada en los procesos de tratamiento de aguas residuales, requiere una fuente externa de carbono orgánico para proporcionar donantes de electrones cuando se tratan aguas residuales con una relación C/N muy bajas o relaciones de reciclaje internas muy altas.

Por lo tanto, aún son necesarias nuevas formas de lidiar con el carbono-nitrógeno y el sulfuro (C-N-S) provenientes de las aguas residuales que permitan bajar costos relacionados con el consumo de oxígeno y costos de instalación. Dentro de las nuevas tecnologías, existe la nitrificación y desnitrificación secuencial (SND), sistema que trata la remoción de nitrógeno en dos etapas: la oxidación de amonio (nitrificación) y luego la reducción de nitrato a N_2 (desnitrificación), la cual puede ser llevada a cabo en un solo reactor (generalmente operado por lotes), lo que se traduce en una disminución del espacio que ocupa la instalación. Además, los costos de inversión son menores, pues no se necesitan los típicos decantadores secundarios (Aema Servicios, 2019)

1.2 Objetivo general y específicos.

El objetivo general del presente estudio consiste la puesta en marcha y posterior operación de un reactor SBR de nitrificación/desnitrificación autótrofa con azufre elemental como dador de electrones, con el fin de evaluar el comportamiento operacional y estudiar la cinética del sistema propuesto.

Los objetivos específicos se enumeran a continuación:

1. Establecer una estrategia de puesta en marcha del reactor SND-SBR de nitrificación/desnitrificación autótrofa simultánea, donde se controle la concentración de compuestos nitrogenados, la ausencia de materia orgánica y el pH y fijar criterios de estabilización del reactor.
2. Una vez estabilizada la operación del reactor, determinar un rango operacional para mejorar la eliminación de nitrógeno. Para ello, se evaluará el efecto del tiempo del paso aeróbico, el tiempo del paso anóxico, la carga de nitrógeno y de azufre.
3. Determinar un modelo cinético que represente al sistema. El modelo cinético se basará en el trabajo presentado por Xu *et al* (2014). e incluirá al menos nitrificación, oxidación aeróbica de azufre (no incluida en el modelo original de Xu *et al.* (2014)), inhibición de la nitrificación por azufre (no incluida en el modelo original de Xu *et al.* (2014)) y desnitrificación autotrófica.

2 Marco Teórico.

2.1 Ciclo del nitrógeno.

Debido a la poca reactividad y combinación del N_2 con otros compuestos (a causa del triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno), no es posible que sea utilizado directamente por la mayoría de los seres vivos previo a su fijación. La incorporación del nitrógeno en la cadena trófica se realiza mediante tres mecanismos: descargas eléctricas, acción fotoquímica (en menor medida), y la fijación biológica en mayor medida (Mery, 2011).

Para ser utilizado en el crecimiento, el nitrógeno debe ser primero reducido y luego fijado en la forma de iones de amonio o nitrato. Esta fijación biológica es mediada por el complejo nitrogenasa, presente en los organismos fijadores, el cual cataliza la conversión de N_2 en NH_4^+ . Para llevar a cabo esta reacción, es necesario una gran cantidad de ATP (energía). Entre los microorganismos involucrados, se encuentran las bacterias, las cianobacterias y actinomicetos (Mayz-Figueroa, 2004).

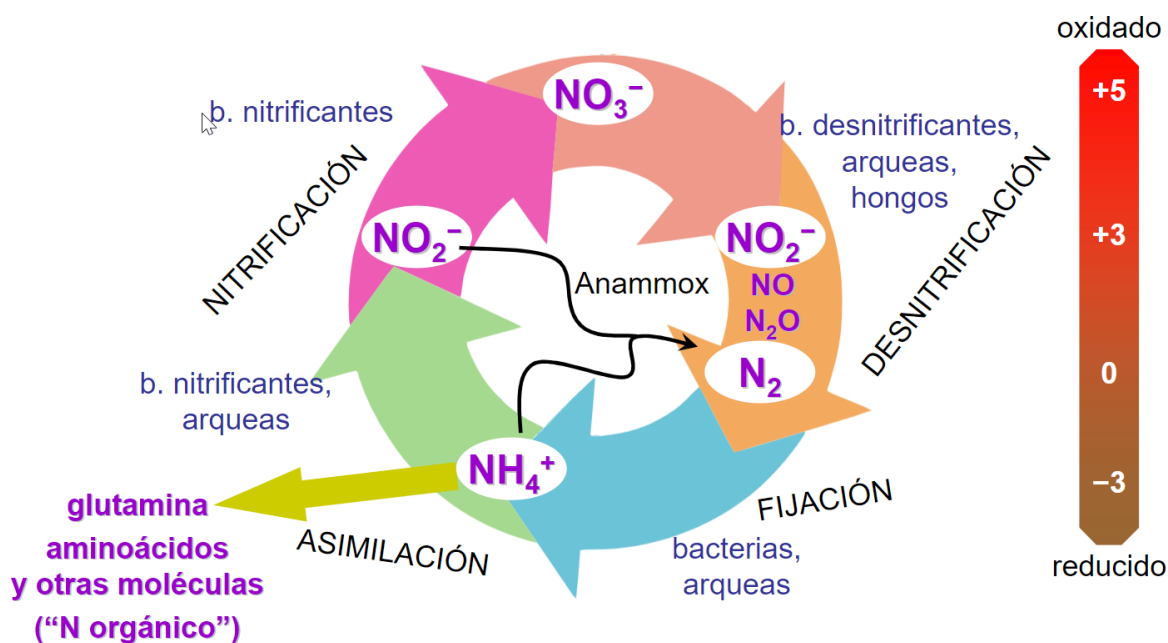


Figura 2-1 Ciclo del Nitrógeno. (Herráez, 2019)

La disponibilidad de nitrógeno en los ecosistemas depende de la acción de bacterias nitrato oxidantes (BNO) que permiten la oxidación del nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-). Además de las BNO, existen también las bacterias amonio oxidantes (BAO), las cuales oxidan el amonio (NH_4^+) a nitrito. Finalmente, la reincorporación de nitrógeno al ciclo natural finaliza con la acción de un grupo de bacterias llamadas desnitrificantes (*Pseudomonas desnitrificans*), en

su mayoría anaerobias y anaerobias facultativas, las cuales se encargan de devolver el nitrato a la atmósfera en forma de N_2 .

2.2 Compuestos nitrogenados como agentes contaminantes.

Varias industrias descargan aguas residuales con altas concentraciones de nitrógeno, como la industria petroquímica, de fertilizantes y de alimentos. El nitrógeno se presenta principalmente como amoníaco, nitrito y nitrato, lo que provoca el agotamiento del oxígeno disuelto (OD), produce toxicidad en la fauna acuática y favorece los procesos de eutrofización (Jaramillo, 2018).

En las últimas décadas, en determinadas zonas ha habido una alteración al ciclo natural del nitrógeno en el sentido de que se ha producido un aumento en la concentración de nitratos debido fundamentalmente a un excesivo uso de abonos nitrogenados y a su posterior arrastre por las aguas de lluvia o riegos. Los efectos nocivos de los nitratos sobre la salud humana, aunque se conocen desde la mitad del siglo XX, no están totalmente claros. Así, se relacionó la cianosis (falta de oxígeno en la sangre) de los niños, de 33 a 27 días de edad, con los nitratos del agua de un pozo, lo que dio pie a que se abriese una larga controversia sobre la toxicidad de estos en el organismo (Comly, 1945). De hecho, los nitratos como tales no son tóxicos, incluso a dosis considerables, ya que son eliminados por el riñón. El problema es que, en el organismo, especialmente en personas con problemas gástricos o en niños de menos de tres meses, el nitrato puede reducirse a nitrito, el cual se absorbe en los glóbulos rojos de la sangre, oxidando el hierro de la hemoglobina a metahemoglobina, disminuyendo la capacidad de los glóbulos rojos para transportar oxígeno. Asimismo, algún tipo de cáncer del tracto gastrointestinal ha sido atribuido a la acción de compuestos nitrosos, formados en el interior del organismo a partir de los nitritos, los que a su vez proceden de la reducción de los nitratos consumidos con el agua.

Los nitratos pueden ser producidos tanto por fuentes naturales como antropogénicas, siendo estas últimas las responsables del importante aumento en su concentración observado en los últimos años. Así, los residuos industriales constituyen una fuente importante de nitratos en las aguas, siendo las industrias más contaminantes los criaderos, destilerías, azucareras, industrias de levadura, de almidón, textiles y fertilizantes (Palomares, 2013).

En específico, en la industria ganadera existen criaderos de cerdos cuyo principal desecho son los purines de animales, que son generalmente residuos resultado de una mezcla de orina,

la parte líquida de eso que rezuma de todo tipo de estiércoles de animales y usualmente agua que se forma al reunir los desechos de animales domésticos. La principal diferencia entre los purines y el resto de los excrementos es que los purines tienen un bajo contenido en materia seca. Los purines están formados por diversos componentes contaminantes o perjudiciales para el medio ambiente, principalmente un exceso importante de nitrato (NO_3^-) y de fosfato (PO_4^{3-}). Tanto el nitrógeno como el fósforo son macronutrientes, esenciales para la vida de las plantas, de manera que su exceso provoca la proliferación de vida descontrolada (Pons *et al.*, 2016).

2.3 Remoción biológica de nitrógeno.

El nitrógeno está presente en las aguas residuales de diferentes formas, como amoníaco, nitrito y nitrato o como moléculas orgánicas (como los aminoácidos). Una de las formas para eliminar estos compuestos del RIL (residuos industriales líquidos) se basa en emplear microorganismos con funciones específicas que son capaces de transformar en nitrógeno presente en la descarga (en las formas ya mencionadas) en nitrógeno gaseoso. A este proceso se le denomina Remoción Biológica de Nitrógeno y consta de dos etapas: la nitrificación y la desnitrificación. La investigación se enfocó en un sistema que realizará nitrificación para convertir el amonio en nitrato y desnitrificación autótrofa para convertir el nitrato en nitrógeno gaseoso.

2.3.1 Nitrificación.

La nitrificación es un proceso respiratorio aeróbico llevado a cabo por dos grupos de bacterias quimiolitotróficas gram negativas, filogenéticamente no relacionadas entre sí, que son las bacterias oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito y pertenecen a la familia Nitrobacteraceae (Beristain-Cardoso, 2009). Las bacterias oxidantes de amonio (BAO) son especies de los siguientes géneros: Nitrosomonas, Nitrospira, Nitrosolobus, Nitrosococcus y Nitrosovibrio, siendo Nitrosomonas el género más estudiado. En el caso de las bacterias oxidantes de nitrito (BNO), Nitrobacter, Nitrospina, Nitrococcus y Nitrospira son los géneros encontrados. El género Nitrobacter ha sido ampliamente estudiado (Beistain-Cardoso *et al.*, 2010).

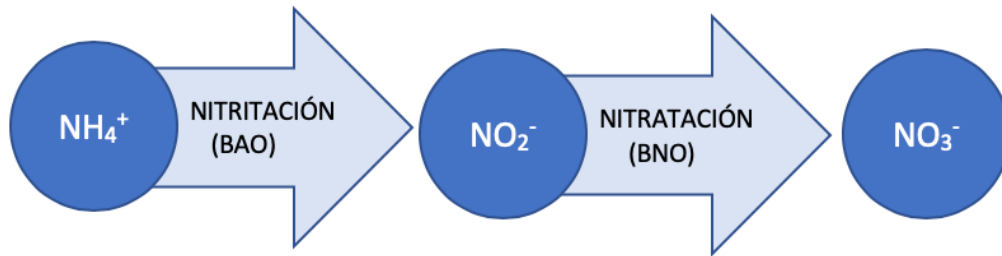
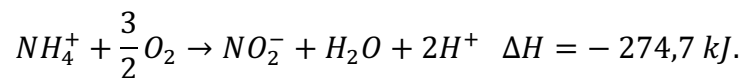


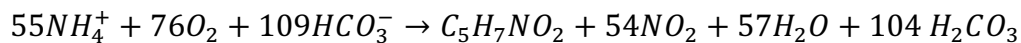
Figura 2-2 Transformación oxidativa secuencial dentro de la nitrificación total. Fuente: .

En el primer paso de la nitrificación, el amoníaco es oxidado a nitrito por las bacterias, de acuerdo a la siguiente ecuación catabólica (Wiesmann, 1994):



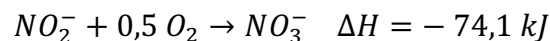
Ecuación 2-1

Se puede apreciar que se necesita una gran cantidad de oxígeno y que el pH disminuiría sin un control adecuado. De la estequiometría para el catabolismo y el anabolismo se tiene (Wiesmann, 1994):



Ecuación 2-2

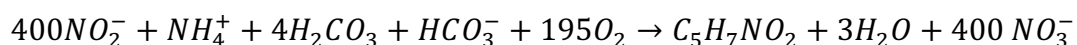
En el segundo paso, el nitrito es oxidado hasta nitrato de acuerdo con la siguiente ecuación catabólica (Wiesmann, 1994)



Ecuación 2-3

Esta ecuación muestra que hay menos energía disponible para el crecimiento de bacterias oxidantes de nitrito en comparación con Nitrosomonas. También se puede apreciar que el cambio de energía libre de Gibbs en ambos pasos es bajo. Por lo tanto, durante la nitrificación, el trabajo termodinámico será siempre escaso, particularmente para las bacterias oxidantes de nitrito. Por lo tanto, la magnitud del crecimiento microbiano será baja (Beistain-Cardoso *et al.*, 2010).

Wiesmann (1994) utiliza la siguiente estequiometría para catabolismo y anabolismo, donde se considera que la bacteria Nitrobacter necesita NH_4^+ para su respectiva biosíntesis:



Ecuación 2-4

2.3.2 Desnitrificación heterótrofa.

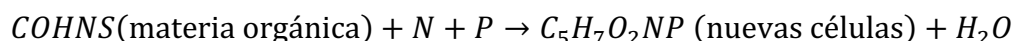
Posterior a la nitrificación, el efluente puede ser tratado por medio de desnitrificación a través del metabolismo de organismos desnitrificantes heterótrofos y bajo condiciones anóxicas. Las formas oxidadas de nitrógeno (NO_2^- y/o NO_3^-) son reducidas a N_2 al ser asimiladas como aceptores de electrones producto de la oxidación de carbono, fuente energética para los organismos heterótrofos.

Hasta ahora, solo las bacterias quimioorganoheterotróficas se han utilizado en el tratamiento de aguas residuales. Un gran número de especies pueden usar oxígeno bajo un metabolismo aeróbico y, en ausencia de oxígeno, reducir el nitrato bajo un metabolismo anóxico (aeróbicos facultativos). Por lo tanto, se puede usar la misma biomasa en un proceso combinado aeróbico/anóxico para la eliminación de carbono y nitrato (Wiesmann, 1994).

La disponibilidad de sustrato orgánico es un factor clave para llevar a cabo la desnitrificación heterótrofa. Un sustrato orgánico externo (metanol, etanol, glucosa, etc.) actúa como fuente de carbono y fuente de electrones simultáneamente.

La desnitrificación es llevada a cabo mediante una serie de pasos catalizados por sistemas enzimáticos diferentes con la aparición de productos intermedios (Figura 2-3). El paso más importante es el último, donde la enzima “óxido nitroso reductasa” cataliza la transformación de N_2O a N_2 , pero que en presencia de oxígeno es inhibida.

A su vez, como resultado de la remoción, la biomasa utiliza la materia orgánica disponible en tres pasos: síntesis, oxidación y decaimiento, siendo el paso de síntesis celular en el que ocurre la desnitrificación:



2.3.3 Desnitrificación autótrofa.

Muchas bacterias heterotróficas pueden reducir el nitrato al utilizar sustratos orgánicos como metanol, etanol y acetato para la conversión de nitrato a gas nitrógeno en condiciones anóxicas. La desnitrificación también puede llevarse a cabo mediante bacterias de azufre autotróficas que usan una variedad de compuestos de azufre reducidos (S^{2-} , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, SO_3^{2-}) en lugar de compuestos orgánicos mientras reducen el nitrato (Oh *et al.*, 2000).

Algunas ventajas que posee la desnitrificación autótrofa frente a la heterótrofa son: evitar el efecto tóxico de algunas fuentes orgánicas de carbono, baja acumulación de biomasa y menor producción de lodos (Cortés, 2013).

El proceso de desnitrificación autotrófa aplicado en esta investigación corresponde a la reducción de NO_3^- y/o NO_2^- a N_2 mediante compuestos de azufre como donantes de electrones, CO_2 y HCO_3^- como fuente de carbono y gracias a la acción de las bacterias oxidantes de azufre (SOB). Estas bacterias son quimiolitotróficas obligatorias o facultativas, y pueden crecer en ambientes mesofílicos y termofílicos.

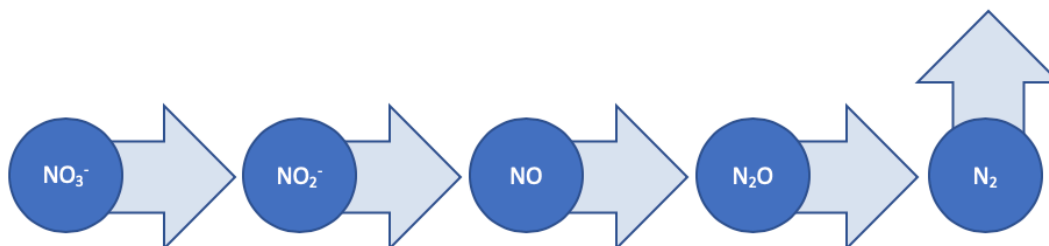
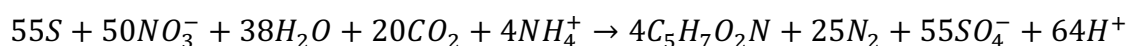


Figura 2-3 Etapas sucesivas de la desnitrificación. Fuente: .

Como alternativa, la desnitrificación autotrófica con *Thiobacillus denitrificans* puede reducir el nitrato a nitrógeno gaseoso mientras oxida el azufre elemental a sulfato. La ecuación que representa los procesos de catabolismo y metabolismo de la bacteria es la siguiente (Darbi y Viraraghavan, 2003):



Ecuación 2-5

Desafortunadamente, el azufre elemental es un sólido insoluble en agua a temperatura ambiente, por lo que su disponibilidad para los microorganismos es limitada. Se espera que el crecimiento con azufre elemental sea más lento que el crecimiento con sustratos solubles debido al problema adicional de solubilizar y transportar azufre a las células (Bathchelor y Lawrence, 1978) .

2.4 Estado del arte:

Es importante destacar los siguientes estudios relacionados a la nitrificación y desnitrificación simultánea en los cuales se utiliza azufre (sulfuros en su mayoría) como dador de electrones en un reactor de tipo SBR.

Aoi *et al.* (2005) propuso un proceso de eliminación de nitrógeno autotrófico de una sola etapa que consta de dos capas compuestas de biomasa inmovilizada, una de bacterias nitrificantes y otra de bacterias desnitrificantes de sulfuro y azufre elemental, en una matriz de escoria fibrosa de Fe-Ni. La nitrificación y el consumo de oxígeno disuelto ocurrieron en la parte externa, y la desnitrificación del azufre en la parte interna anóxica de la matriz

compuesta, logrando así la eliminación autótrofa de nitrógeno en un solo reactor. Informaron la eliminación completa de amoníaco y sulfuro, pero a pesar de que el proceso se desarrolló con éxito, su aplicación a escala industrial podría ser problemática, específicamente debido al soporte especial de *biofilm* que se necesita.

Beristain-Cardoso *et al.* (2010), utilizó un sistema de biorreactor de biopelículas por lotes (*batch*) y continuo (CSTR) para mostrar que bajo condiciones de nitrificación era posible llevar a cabo simultáneamente la nitrificación y la oxidación de azufre, pese a que el valor de IC_{50} ¹ para el proceso de oxidación de amonio fue de 13 mg/L de sulfuro.

De Souza Moraes *et al.* (2014) investigó la viabilidad de la nitrificación – desnitrificación (SND) simultánea junto con la oxidación de sulfuro en un reactor de biopelícula de lotes (*batch*) alimentados por secuenciación (*sequencing fed-batch*), aireado de forma intermitente para el tratamiento posterior del efluente de un reactor de lodo anaeróbico de flujo ascendente (UASB). El objetivo principal fue evaluar dos alternativas de puesta en marcha y estrategias de alimentación para el establecimiento de la nitrificación y la desnitrificación autótrofa. El modo de alimentación discontinua con la aplicación de sulfuro en exceso solo en los períodos anóxicos fue la mejor estrategia de alimentación, proporcionando eficiencias promedio de 85,7% y 5,0% para la nitrificación y desnitrificación, respectivamente. Sin embargo, la baja eficiencia global de eliminación de nitrógeno y algunas restricciones operativas indicaron que la desnitrificación autotrófica que utiliza sulfuro en un solo SBR no era adecuada para la SND en las condiciones probadas.

La desnitrificación autótrofa que utiliza azufre elemental como dador de electrones se ha estudiado en el campo de tratamiento de agua potable, industrias petroquímicas, aguas residuales de revestimiento metálico, aguas residuales municipales, aguas residuales altamente concentradas tales como efluentes de levadura de panadería y lixiviados nitrificados.

Los reactores SBR se utilizan normalmente para promover el proceso de nitrificación – desnitrificación secuencial, SND. Básicamente, se operan en ciclos secuenciales compuestos de cuatro etapas: alimentación, reacción, sedimentación y extracción de líquidos. En este

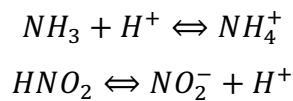
¹ La IC_{50} es una medida del potencial de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica. Esta medida cuantitativa indica qué cantidad de una sustancia inhibidora es necesaria para inhibir un proceso biológico a la mitad.

sentido, el uso de biomasa inmovilizada en un soporte inerte permite la eliminación del paso de sedimentación y la reducción del tiempo del ciclo global. Además, las pérdidas de biomasa son normalmente muy bajas, lo que resulta en altos tiempos de retención celular (de Souza Moraes *et al.*, 2014).

Finalmente, este sistema SBR para llevar a cabo SND fue utilizado por De Souza Moraes *et al.* (2014), quienes indicaron que podría ser útil solo si la concentración de sulfuro se controla en la etapa aeróbica, mientras que el sulfuro fue el reactivo limitante en el proceso. Como se mencionó anteriormente, hay informes de que la eliminación simultánea de sulfuro y amoníaco es posible en un biorreactor aeróbico suspendido, mientras que el presente proyecto propone el uso de azufre elemental para la desnitrificación autótrofa para evitar la falta de donantes de electrones. Si bien existen problemas con respecto al funcionamiento de SBR para SND con sulfuro como donador de electrones, también hay informes que obtienen buenos resultados y eficiencias en los sistemas de biopelículas, lo que indica que la investigación sobre este tema aún es necesaria

2.5 Control de pH.

Dada las reacción catabólicas que ocurren durante la nitrificación, es que se necesita una gran cantidad de oxígeno y que el pH disminuiría sin el control del pH. Pero, además, si se analizan las reacciones de disociación de las especies NH_4^+ y NO_2^- , las cuales son:



Ecuación 2-6

Es posible notar que las concentraciones de equilibrio de disociación de tanto el NH_4^+ como del NO_2^- son función del pH:

$$C_{NH_3} = \frac{K_{NH_3} C(-3)}{K_{NH_3} + 10^{-pH}}$$

$$C_{HNO_2} = \frac{K_{HNO_2} C(+3)}{K_{HNO_2} + 10^{-pH}}$$

Ecuación 2-7

Suponiendo que las concentraciones totales son constantes ($C(-3) = C_{NH_3} + C_{NH_4^+}$ y $C(+3) = C_{HNO_2} + C_{NO_2^-}$), un aumento de pH se traduce en un aumento de la concentración de NH_3 y la disminución de la concentración de HNO_2 . Por lo tanto, un leve cambio en el pH

puede generar *stripping* de amonio, lo cual tiene un efecto sobre el catabolismo de BAO y BNO. Una temperatura de 30°C y valores de pH entre 7,2 y 8,0 proporcionan condiciones óptimas de crecimiento (Pirsing *et al.*, 1996).

Por lo tanto, es importante que el pH se mantenga bajo cierto valor para evitar que ocurra stripping de amoniaco, lo que significaría que no haya disponibilidad de sustrato para el proceso de nitrificación. Esto comienza a ocurrir a pH sobre los 7,6 y la concentración relativa del 50% se logra alrededor del pH 9, de acuerdo con la curva de equilibrio de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. Además, la presencia de NH_3 inhibe el catabolismo de las BNO, lo que se traduce en una acumulación de nitrito en el sistema. La figura 2-4 describe el comportamiento del equilibrio químico en función del pH.

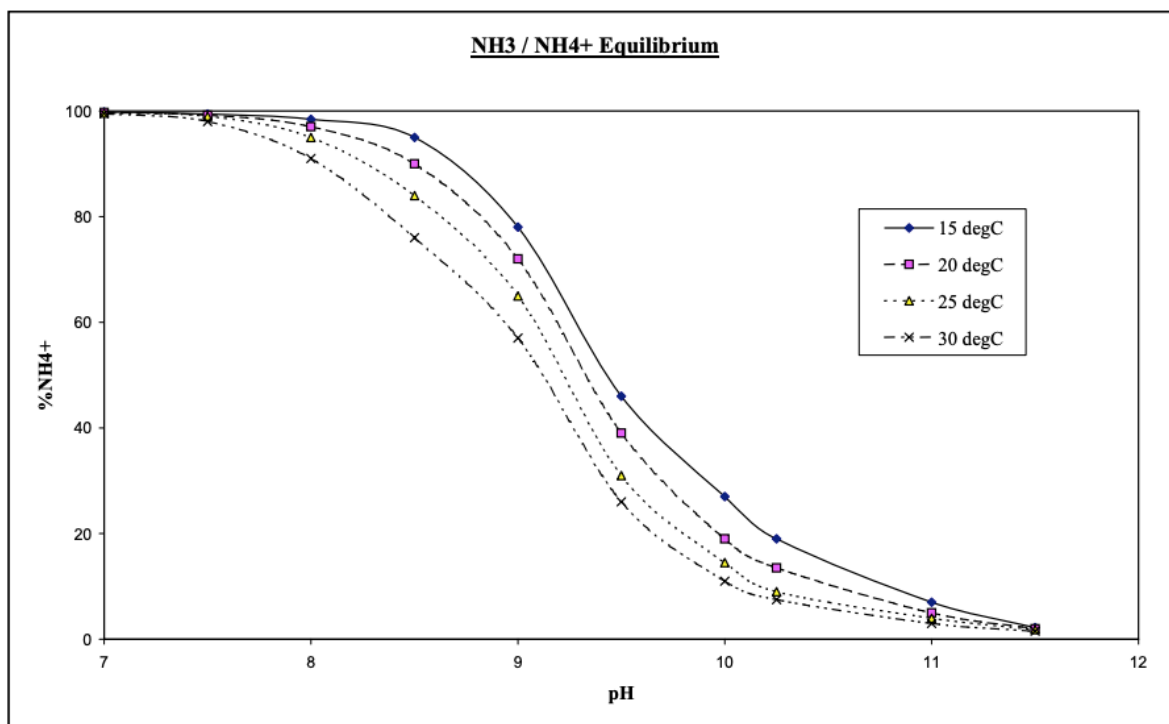


Figura 2-4 Concentraciones relativas de NH_3 y NH_4^+ en función del pH. (Jorgensen, 2003)

2.6 Simultaneidad SND en la operación de un SBR.

En un proceso SBR típico, la desnitrificación puede ocurrir durante las etapas de llenado o reacción al alternar la operación de los aireadores y el período de asentamiento y extracción. Una ventaja obvia del sistema SBR con flujos bajos es que el contenido del reactor se puede retener hasta que se alcance el nivel de tratamiento deseado, siempre que exista suficiente tanque para igualar o acomodar el influente adicional. Además, la nitrificación tiene lugar

durante la fase aireada de reacción y durante las porciones del período de llenado cuando se practica la aireación (Wang y Shammas, 2010).

Durante el llenado (aireado) del reactor, comienzan las reacciones aeróbicas, las cuales son completadas durante a fase de reacción aireada. El llenado aireado puede reducir el tiempo de aireación requerido en la fase de reacción. Las reacciones biológicas se completan en la etapa de reacción, en el que pueden existir dos tipos de reacción: mixta o aireada. En la mixta se alterna la aireación de modo que se establecen períodos anóxicos. Durante la reacción aireada, se completan las reacciones aeróbicas inicializadas durante el llenado aireado y se puede lograr la nitrificación. La nitrificación es la conversión de nitrógeno amónico en nitrógeno nitrito y, finalmente, en nitrógeno nitrato. Si se selecciona el modo de reacción mixta, se pueden alcanzar condiciones anóxicas para lograr la desnitrificación una vez que se agota el oxígeno disuelto. Las condiciones anaeróbicas también se pueden lograr en el modo de reacción mixta para la eliminación de fósforo (Wang y Shammas, 2010).

En un proceso simultáneo de nitrificación/desnitrificación, las tasas dentro del sistema son menores a los valores óptimos que se alcanzarían si estos dos procesos ocurrieran por separado. Solo se utiliza una parte de la biomasa para cada una de estas reacciones. Debido a lo anterior, se decidió que el sistema SND a implementar en el reactor es del tipo cíclico, donde existe paso de aireación con OD (oxígeno disuelto) elevado para la nitrificación, el cual es seguido por un tiempo mixto sin airear para la desnitrificación (Metcalf y Eddy, 2014).

En los procesos SBR y otros procesos de decantación por lotes, la eliminación de nitrato (desnitrificación) se puede lograr mediante 4 formas o métodos: (1) Generar una reducción de nitrato mediante el uso de un período de llenado mixto no aireado, (2) Utilizar un ciclo de aireación de encendido/apagado durante el período de reacción, (3) Implementar un tiempo anóxico de contacto después de que se complete la nitrificación y justo antes de un corto tiempo de aireación, sedimentación y decantación, y (4) operando a una baja concentración de OD para estimular SNdN (*simultaneous nitrification-denitrification*) durante la secuencia de aireación. Bajo condiciones de aireación cíclica después del período de llenado y reacción, el SDNR es impulsado principalmente por la respiración endógena. La desnitrificación durante un período de llenado mixto no aireado proporciona los medios más

eficientes para la eliminación de nitrato y también proporciona una operación de selección para evitar la acumulación de lodo filamentoso (Metcalf y Eddy, 2014).

El oxígeno disuelto puede inhibir la reducción de nitrato, al reprimir una enzima que actúa sobre la reducción de nitrato. En los flóculos de lodo activado y las biopelículas, la desnitrificación puede realizarse en presencia de bajas concentraciones de OD. Se ha informado que una concentración de oxígeno disuelto de 0,2 mg/L o superior inhibe la desnitrificación para un cultivo de *Pseudomonas*. En condiciones de baja concentración de OD, la desnitrificación puede ocurrir en el interior del flóculo, mientras que la nitrificación se produce en el exterior del flóculo (Metcalf y Eddy, 2014), tal como se muestra en la Figura 2-5.

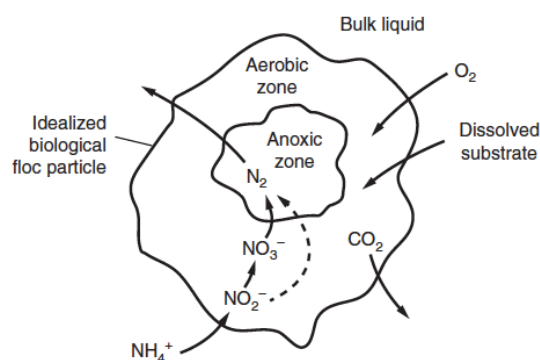


Figura 2-5 Diagrama de un flóculo de lodo activado que muestra zonas aeróbicas y anóxicas (Metcalf y Eddy, 2014).

2.7 Cinética de un sistema SND.

Teniendo en cuenta que el proceso SND es realizado por dos reacciones paralelas, las cinéticas de nitrificación y desnitrificación vienen dadas por las características de los grupos microbianos involucrados, las velocidades de crecimiento (μ) y las circunstancias y elementos de inhibición.

2.7.1 Cinética de microorganismos nitrificantes

La oxidación de amonio juega un papel clave en la generación de una fuente de nitrato para las bacterias desnitrificantes. El acoplamiento de este proceso aeróbico (nitrificación) con un proceso anóxico (desnitrificación) conduce a la liberación de nitrógeno gaseoso a la atmósfera.

La nitrificación es un proceso respiratorio aeróbico llevado a cabo por dos grupos de bacterias quimiolitotróficas gramnegativas, filogenéticamente no relacionadas entre sí, que son las

bacterias oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito y pertenecen a la familia Nitrobacteraceae (Beristain-Cardoso, 2009). La Figura 2-6 representa un proceso de nitrificación cualquiera, en el cual se consume el amonio y producto de ello, se genera nitrito y nitrato. Luego, el nitrito se consume para formar nitrato.

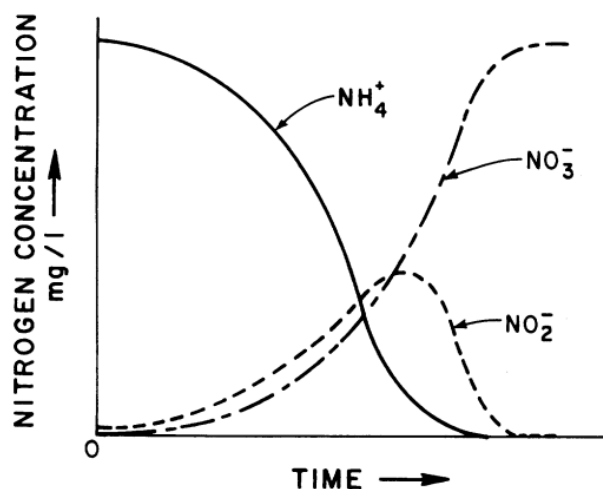


Figura 2-6 Gráfica esquemática de las transformaciones de nitrógeno durante una nitrificación no inhibida en experimento del tipo batch (Anthonisen et al., 1976).

2.7.1.1 Microorganismos amonio oxidantes:

Dado que las bacterias autótrofas oxidantes de amoníaco generalmente se han caracterizado por bajas tasas de crecimiento y bajos rendimientos, la nitritación es generalmente considerada un paso limitante en un proceso biológico de eliminación de nitrógeno (He *et al.*, 2009).

El amoníaco en su forma no ionizada es el verdadero donante de electrones (sustrato) para las bacterias de tipo BAO, porque se requiere menos energía para su transporte en la célula en comparación con el transporte de una molécula ionizada como NH_4^+ . Sin embargo, conociendo el pH, es posible relacionar las concentraciones de NH_3 y NH_4 en todo momento (Wiesmann, 1994).

La inhibición del sustrato a menudo se ha descrito en la literatura de las última décadas. La cinética de Haldane, que inicialmente fue derivada para describir la inhibición en reacciones enzimáticas de sustrato, proporciona la descripción más simple de la inhibición del sustrato. Pero también, dentro de los modelos a ajustar también se considerará el cual describe una cinética de tipo Monod, con el fin de comparar y establecer si existen diferencias

significativas. La inhibición de sustrato según la cinética de Haldane acoplada a la función interruptor queda descrita por la siguiente expresión (Wiesmann, 1994):

$$\mu_{AOB} = \mu_{max} \frac{C(NH_4^+)}{K_s + C(NH_4^+) + \frac{C(NH_4^+)^2}{K_i}} \frac{C'}{K' + C'}$$

Ecuación 2-8

La función interruptor corresponde al término $\frac{C'}{K' + C'}$ que describe la disponibilidad de oxígeno.

En donde:

μ_{AOB} : Velocidad de crecimiento bacteriano $\left[\frac{1}{d}\right]$

μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento bacteriano $\left[\frac{1}{d}\right]$

C' : Concentración de Oxígeno Disuelto $\left[\frac{mg}{L}\right]$

K_s : Constante de crecimiento por sustrato $\left[\frac{mg}{L}\right]$

K_i : Constante de inhibición por sustrato $\left[\frac{mg}{L}\right]$

El segundo término de la ecuación describe la disponibilidad de oxígeno disuelto. Para concentraciones de OD (C') altas ($C' \gg K'$) y para una constante de inhibición alta o concentraciones bajas de sustrato ($K_i \gg NH_4^+$), la ecuación toma la forma típica de una cinética del tipo Monod (Wiesmann, 1994):

$$\mu_{AOB} = \mu_{max} \frac{C(NH_4^+)}{K_s + C(NH_4^+)}$$

Ecuación 2-9

En caso de que en el proceso SND, la nitrificación no sea la etapa limitante, también es válido considerar que la reacción pueda ser de primer orden. Esto debido a que es común que en *biofilms* la reacción se comporte de primer orden. La cinética de primer orden viene dada por:

$$\frac{dC(NH_4^+)}{dt} = -K_{cAOB} \cdot C(NH_4^+)$$

Ecuación 2-10

Donde K_{cAOB} corresponde a la constante de primer orden para las bacterias amonio oxidantes.

2.7.1.2 Microorganismos nitrito oxidantes

Durante la nitrificación, el trabajo termodinámico será siempre escaso y la magnitud del crecimiento microbiano será baja, pero particularmente para las bacterias oxidantes de nitrito (Pirsing *et al.*, 1996). Y aunque la tasa de crecimiento de BAO es más rápida que la de BNO ($Y_{x/sAOB} > Y_{x/sNOB}$), en el proceso de nitrificación tradicional, el primer paso es el proceso de limitación de velocidad, ya que la velocidad máxima (μ_{max}) de las bacterias nitrito oxidantes es mayor que la de las bacterias amonio oxidantes (Rittmann y McCarty, 2001). Hay una influencia similar del dador de electrones de la molécula no ionizada HNO_2 en la tasa de crecimiento de BNO, porque se requiere menos energía para su transporte en la célula en comparación con el transporte de la molécula ionizada NO_2^- . Finalmente, la cinética descrita por Haldane proporciona una descripción más simple a fenómenos tales como la inhibición por sustrato. La expresión es la misma que para las bacterias BAO (Wiesmann, 1994):

$$\mu_{NOB} = \mu_{max} \frac{C(NO_2^-)}{K_s + C(NO_2^-) + \frac{C(NO_2^-)^2}{K_i}} \frac{C'}{K' + C'}$$

Ecuación 2-11

En donde:

μ_{NOB} : Velocidad de crecimiento bacteriano $\left[\frac{1}{d}\right]$

μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento bacteriano $\left[\frac{1}{d}\right]$

C' : Concentración de Oxígeno Disuelto $\left[\frac{mg}{L}\right]$

K_s : Constante de crecimiento por sustrato $\left[\frac{mg}{L}\right]$

K_i : Constante de inhibición por sustrato $\left[\frac{mg}{L}\right]$

Si el sistema se encuentra saturado en oxígeno a concentraciones bajas de sustrato, entonces es posible aproximar la cinética de tipo Haldane a una de tipo Monod:

$$\mu_{NOB} = \mu_{max} \frac{C(NO_2^-)}{K_s + C(NO_2^-)}$$

Ecuación 2-12

Finalmente, al igual que en el caso de los microorganismos amonio oxidantes, no se puede descartar en un comienzo que la cinética que rige el consumo de nitrito sea de orden 1. Entonces, se tendría:

$$\frac{dC(NO_2^-)}{dt} = -K_{cNOB} \cdot C(NO_2^-)$$

Ecuación 2-13

Donde K_{cNOB} corresponde a la constante de primer orden para las bacterias nitrato oxidantes.

2.8 Cinética de microorganismos desnitrificantes

Desnitrificación es la reducción de NO_3^- o NO_2^- a (principalmente) N_2 gaseoso. Debido a que muchas aguas residuales contienen nitrógeno reducido, la desnitrificación se acopla frecuentemente a la nitrificación, que es necesaria para oxidar el nitrógeno. Vale destacar que todas los microorganismos (protobacterias, bacterias y arqueas) son del tipo aerobio facultativos. La desnitrificación se ve favorecida cuando las bacterias desnitrificantes se sitúan dentro de flóculos o películas fijas, donde la concentración de oxígeno es más baja que en el líquido a tratar (Rittmann y McCarty, 2001).

En casi todas las circunstancias, el donante de electrones es el sustrato limitador de tasa. Incluso, aunque el NO_3^- puede ser un contaminante objetivo, el donante de electrones controla la cinética de utilización del sustrato y el crecimiento de biomasa. Para el caso de estudio, el donante de electrones es el azufre elemental, y no solo su disponibilidad en el reactor es fundamental, sino también si disponibilidad en fase disuelta, ya que el azufre elemental es insoluble en solventes polares, como lo es el agua. Para ello, es necesario que microorganismos dentro del reactor logren generar un *biofilm* sobre las pastillas de azufres para que posteriormente destruyan la estructura y permitan que el azufre este disponible para ser utilizado en la desnitrificación autótrofa.

En la mayoría de los trabajos de investigación se utiliza un modelo cinético de doble Monod, en el cual el NO_3^- como aceptor de electrones (Wiesmann, 1994):

$$\mu_{DN} = \mu_{max} \frac{C_s}{K_s + C_s} \frac{C(NO_3^-)}{K_{NO_3^{-2}} + C(NO_3^-)}$$

Ecuación 2-14

En donde:

μ_{DN} : Velocidad de crecimiento microbiano desnitrificante $\left[\frac{1}{d}\right]$

μ_{max} : Velocidad máxima de crecimiento microbiano $\left[\frac{1}{d}\right]$

C_s : Concentración de sustrato donante de electrones $\left[\frac{mg}{L}\right]$

K_s : Constante de crecimiento por sustrato $\left[\frac{mg}{L}\right]$

El modelo presentado se adecúa con gran precisión para bacterias desnitrificantes heterótrofas o para autótrofas donde la disponibilidad de sustrato donante de electrones no se ve afectada por la dificultad de solubilización de este. El caso de estudio, al no ser ninguno de los casos anteriores, no se representa con la rigurosidad suficiente.

Los fenómenos predominantes asociados con la desnitrificación autotrófica en reactores de *biofilm* con azufre como dador de electrones son: (1) el azufre "se disuelve" en la biopelícula adherida a la superficie de las partículas de azufre, posiblemente bajo el efecto de una enzima, y se difunde a través de la biopelícula; (2) el nitrato se difunde desde el líquido a granel hacia la biopelícula; (3) la desnitrificación autotrófica tiene lugar dentro de la biopelícula; y (4) los productos de reacción (SO_4^{-2} , N_2 , etc.) se difunden desde la biopelícula al líquido a granel (Koenig y Liu, 2001).

En general, se supone que el consumo de sustrato dentro de las biopelículas sigue la relación cinética de Monod. En muchos casos, la cinética de Monod se puede representar como una reacción de primer orden o como una reacción de orden cero, dependiendo del valor de la constante de saturación de Monod K_s en la expresión de Monod. Como la constante de saturación de Monod, K_s para la desnitrificación autotrófica es muy baja con respecto a las concentraciones de nitrato de trabajo (sobre los 30 mg/L), por ejemplo, Claus y Kutzner (1985) informaron un valor de K_s de 0,2 mg/L como NO_3^- , Batchelor y Lawrence (1978) informaron un K_s de 0,03 mg/L como NO_3-N , por lo tanto, la reacción intrínseca dentro de la biopelícula puede tomarse como orden cero. Finalmente, Koenig y Liu (2001) realizaron experimentos utilizando la desnitrificación autótrofa de aguas residuales sintéticas mediante *Thiobacillus denitrificans* en reactores de lecho llenos de azufre. Los resultados experimentales mostraron que la desnitrificación autotrófica por la biopelícula en los reactores puede describirse mediante un modelo cinético de medio orden, ya que la penetración del sustrato en los poros de la biopelícula es menos que completamente efectiva, una reacción de orden cero en la biopelícula se convierte en una reacción de orden medio en la superficie de la biopelícula.

Una biopelícula parcialmente eficiente dará como resultado una reacción de orden un medio (Darbi y Viraraghavan, 2003):

$$r_v = k_{1/2} v C^{1/2}$$

Ecuación 2-15

En donde $k_{1/2 v}$ es la constante de reacción de orden un medio por unidad de volumen de reactor.

$$-\frac{dC}{dt} = k_{1/2 v} C^{1/2}$$

$$C_e^{1/2} = C_0^{1/2} - \frac{1}{2} k_{1/2 v} t$$

Ecuación 2-16

En donde:

$C_e^{1/2}$: concentración del efluente $\left[\frac{mg^{1/2}}{L^{1/2}} \right]$

$C_0^{1/2}$: concentración inicial en el reactor $\left[\frac{mg^{1/2}}{L^{1/2}} \right]$

$k_{1/2 v}$: constante de reacción de orden un medio por unidad de volumen $\left[\frac{mg^{1/2}}{L^{1/2} h} \right]$

El perfil debe ser una línea recta en una gráfica de $C^{1/2}$ versus tiempo. La velocidad de reacción de medio orden por unidad de volumen se puede calcular a partir de la pendiente de la línea.

También es válido considerar que la reacción pueda ser de primer orden. Esto debido a que es común que en *biofilms* la reacción se comporte de primer orden, y es parte de la investigación determinar si los organismos desnitrificantes estarán suspendidos o adheridos a las pastillas de azufre, generando un *biofilm*. La cinética de primer orden viene dada por:

$$\frac{dC(NO_3^-)}{dt} = -k_1 \cdot C(NO_3^-)$$

Ecuación 2-17

Finalmente, existe la posibilidad que la cinética sea de orden cero, ya que las concentraciones de sustrato son muy altas. La cinética de orden cero viene dada por:

$$\frac{dC(NO_3^-)}{dt} = -k_0$$

Ecuación 2-18

2.9 Configuración y estrategias operativas de un reactor SBR para lograr SND.

2.9.1 Tecnología SBR.

La tecnología SBR se considera una alternativa a los procesos convencionales para eliminar nutrientes de las aguas residuales. Esta configuración tiene una mayor flexibilidad y capacidad de control, lo que permite un ajuste más rápido a las características influyentes

cambiantes. Es necesaria una inversión más baja y un costo recurrente porque no se requieren tanques de sedimentación secundarios y sistemas de retorno de lodos (Puig, 2008).

Además, es especialmente apropiado para lugares donde existe una variabilidad significativa de flujo y carga o donde los problemas de espacio se convierten en una restricción (Metcalf y Eddy, 2014).

El SBR es un sistema de lodo activado de llenado y drenaje para el tratamiento de aguas residuales. Mientras que en los sistemas continuos la reacción y el asentamiento ocurren en diferentes reactores, en SBR todos los procesos se llevan a cabo en un solo reactor siguiendo una secuencia de llenado, reacción, asentamiento y fases de extracción, tal como se muestra en la Figura 2-7. La configuración del ciclo depende de las características de las aguas residuales y los requisitos legales.

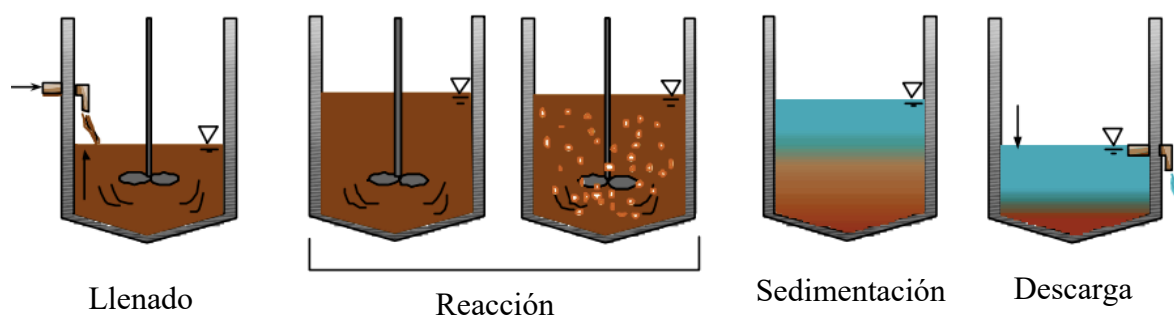


Figura 2-7 Secuencia de las Fases de un proceso llevado a cabo en un reactor SBR (Adaptado de Puig, 2008).

La fase de llenado puede ser estática, mixta o aireada, dependiendo de los objetivos del tratamiento. Un llenado estático da como resultado una entrada de energía mínima y una alta concentración de sustrato al final de la fase de llenado. Un relleno mixto resulta en desnitrificación (en caso de haber nitratos), e incluso proporciona condiciones anaeróbicas requeridas para la eliminación biológica de fósforo. Los rellenos aireados provocan el comienzo de reacciones aeróbicas que mantienen bajas las concentraciones de sustrato, lo que puede ser importante si existen componentes biodegradables que sean tóxicos a altas concentraciones. Además, la fase de alimentación podría ser una alimentación única o múltiple según el objetivo del tratamiento. Durante la fase de reacción, generalmente en condiciones de mezcla, la biomasa consume el sustrato en condiciones ambientales controladas (aeróbicas, anóxicas o anaeróbicas) dependiendo del tratamiento de las aguas residuales. En las fases de reacción aeróbica, se produce la oxidación y nitrificación de la

materia orgánica. El proceso clásico de desnitrificación requiere condiciones anóxicas. (Puig, 2008).

2.9.2 Configuración de etapas.

Para un ciclo típico de 9 horas, para alcanzar mas del 90% de eliminación de N_2 , se realiza el llenado sin oxígeno de manera que ocurra desnitrificación del NO_3^- arrastrado del ciclo anterior. La primera etapa de reacción oxida el TKN (Nitrógeno total Kjeldahl) del afluente a nitrato. El período sin oxígeno consigue la desnitrificación, luego el segundo período de reacción aerobia convierte el NH_4^+ liberado en la reacción sin oxígeno en NO_3^- , que, tras sedimentar, se descarga en el efluente y se transporta para el llenado sin oxígeno de la etapa del siguiente ciclo. La configuración de tiempos para este ciclo consta de 3 horas de llenado y mezclado sin oxígeno, luego 3 horas de aireación (primera reacción), 2 horas de mezclado sin oxígeno (para que ocurra la segunda reacción), después 0,33 horas de aireación y finalmente 0,67 horas de reposo para sedimentar (Rittmann y McCarty, 2001), tal como se muestra en la Figura 2-8.

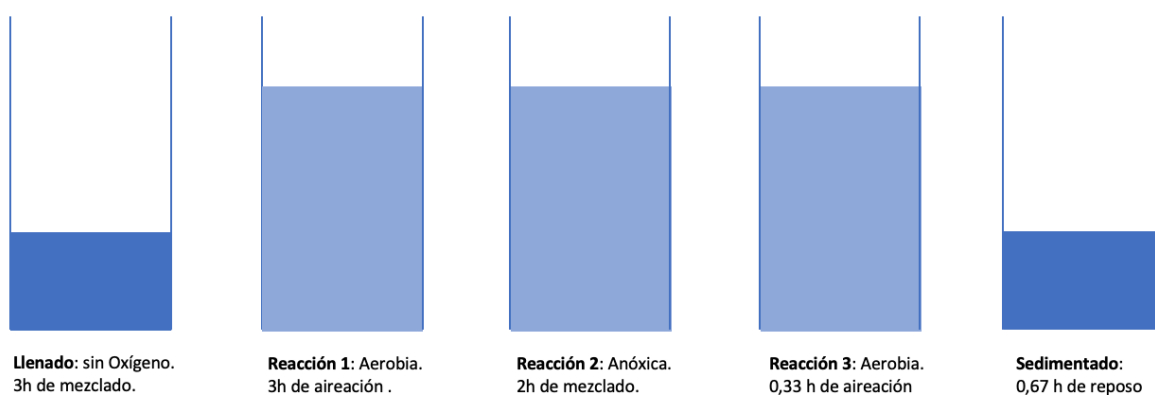


*Figura 2-8 Ciclo típico (9h) para conseguir el 90 por 100 de eliminación de N con un reactor discontinuo secuencial.
(Adaptación de Rittmann y McCarty, 2014)*

2.9.3 Técnicas y estrategias de Operación

La optimización de la eliminación biológica de nitrógeno (BNR) en un reactor *batch* secuenciado (SBR) se ha convertido en el objetivo de los investigadores para aumentar la eficiencia y reducir los costos de energía y operación. En un SBR, la eficiencia y el consumo de energía en términos de las reacciones de nitrificación y desnitrificación dependerán de las condiciones ambientales (p. Ej., pH, temperatura, OD, potencial de reducción de oxidación

(ORP)) y operativas (p. Ej., Patrón de alimentación, tiempo de retención de lodo, duración del ciclo) durante cada fase de reacción. Pequeños cambios en las concentraciones o los flujos entre los ciclos de lotes pueden afectar la cinética de las reacciones biológicas no lineales, lo que conduce a la variabilidad en la calidad del efluente y el crecimiento del lodo, lo que dificulta mantener el rendimiento de las estrategias de operación diseñadas a lo largo del SBR a largo plazo (Jaramillo, 2018).

La precisión para estimar la longitud de cada fase es crítica debido a la no linealidad de la cinética del crecimiento bacteriano y las incertidumbres inherentes al proceso SBR. Tiempos de reacción insuficientes conducen a una eliminación incompleta de nitrógeno (nitrificación parcial) y longitudes de fase más largas de lo necesario, lo que aumenta los costos operativos. Sinha y Annachhatre (2007) analizaron varios trabajos relacionados con la nitrificación parcial, donde encontraron que un SBR que funciona a altas temperaturas ($> 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), con un pH en el rango de 7,5 - 8,5 y OD $< 0,5\text{ mg O}_2/\text{L}$ puede acumular nitrito. Los parámetros fisicoquímicos tales como OD, pH, ORP y la tasa de consumo de oxígeno se pueden usar para estimar la duración de las fases de nitrificación y desnitrificación en el SBR (Jaramillo, 2018).

La presente investigación busca eliminar nitrógeno mediante procesos autótrofos, por ende, es clave señalar que la velocidad de reacción que llevan a cabo los microorganismos que cumplen la función de desnitrificar es notoriamente menor que la de los microorganismos nitrificantes. En la práctica esto fue observable al ir ajustando los tiempos de ciclos dentro del SBR y apreciar como a tiempos aeróbicos y anóxicos similares se generaba una acumulación de nitrato. Por ende, para definir los períodos de reacción aeróbicos y anóxicos es necesario implementar una estrategia que favorezca la desnitrificación. Teniendo como referencia la investigación realizada por Cortés (2013), la estrategia que se usa para mejorar la desnitrificación es la *step-feed*. Esta estrategia consiste en la alimentación por etapas, y significa que para la eliminación de nitrógeno, las fases de llenado deben llevarse a cabo en condiciones anóxicas, lo que permite aumentar las eficiencias de desnitrificación (Puig, 2008).

En una estrategia de alimentación única, pueden permanecer cantidades sustanciales de nitrato en el efluente porque la desnitrificación no puede reducir el nitrato de manera eficiente en la reacción anóxica y el período de sedimentación ya que no hay donante de electrones.

Con la estrategia *step-feed*, es posible dosificar la carga que debe soportar el SBR de manera de no sobrecargar a los microorganismos desnitrificantes y mantenerlos activos durante períodos de actividad críticos del sistema (Puig, 2008).

2.10 Control de un Proceso SND-SBR: Puntos Característicos.

La detección de puntos de inflexión o característicos es una estrategia que utiliza variables secundarias como lo son el pH y el oxígeno disuelto para determinar la duración de las fases aeróbicas/anóxicas en un SBR para ahorrar energía y capacidad de proceso. Cuando el pH, OD, ORP (potencial de oxidación/reducción) y OUR (tasa de consumo de oxígeno) no están controlados en circuito cerrado, es posible identificar cambios relativos (puntos de inflexión) en sus perfiles durante las reacciones aeróbicas/anóxicas. Estos puntos de flexión en los perfiles de variables secundarias se muestran en la Figura 2-9 y se utilizan para determinar el punto final de cada fase de reacción (Jaramillo, 2018).

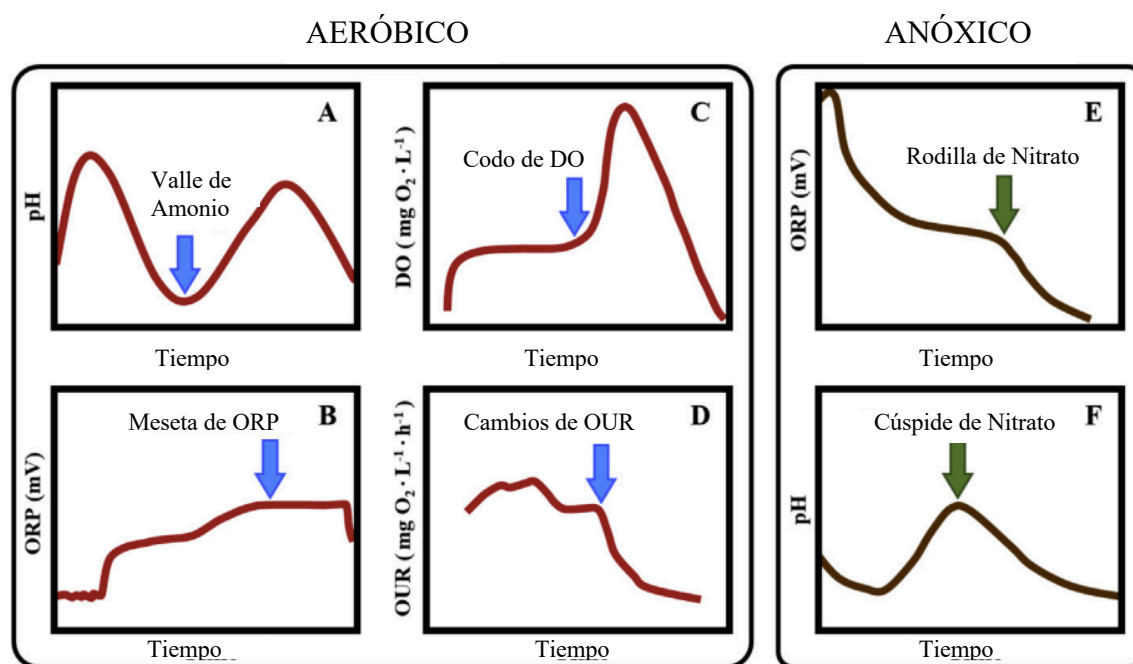


Figura 2-9 Puntos de inflexión para nitrificación (A-D) y desnitrificación (E-F), donde las flechas muestran el punto de inflexión específico para cada perfil de parámetro Adaptado de (Puig, 2005) y de (Poo, 2006)

Dado que a largo plazo podría producirse un aumento sostenido de las poblaciones de BNO en el reactor, los investigadores se enfrentan al desafío de limitar/inhibir el crecimiento de BNO para alcanzar una acumulación estable de nitrito con el tiempo. De esta manera no es necesario oxidar el amonio hasta nitrato para que luego ocurra la desnitrificación,

ahorrándose la energía que esta reacción conlleva. Esta forma de llevar a cabo el proceso se denomina desnitrificación vía nitrito, tal como se muestra en la Figura 2-10.

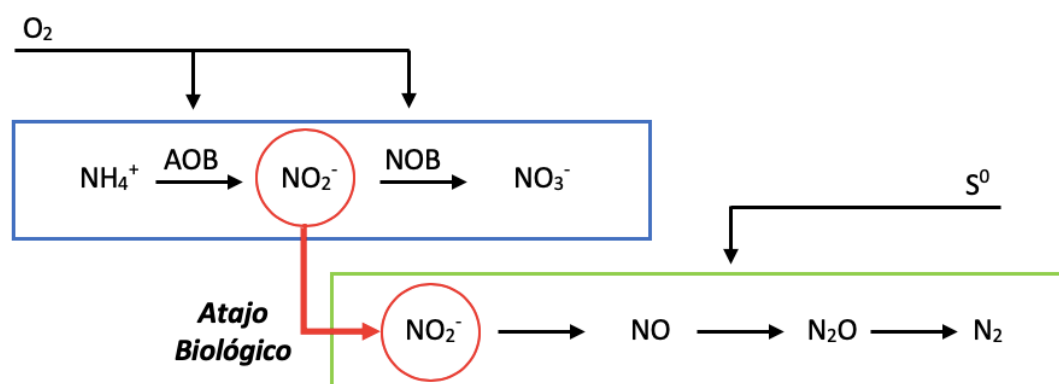


Figura 2-10 Esquema del proceso de nitrificación parcial mediante el uso de atajos entre nitrificación y desnitrificación.

Fuente: Adaptación de Jaramillo (2018).

Aunque si bien se han identificado puntos de inflexión utilizando múltiples factores, el pH es siempre un buen indicador de reacciones biológicas. A continuación, serán descritos los puntos de inflexión relacionados a este factor:

- Valle de Amonio (Figura 2-9.A): En la fase aeróbica, cuando se agota el amonio, aparece un punto mínimo llamado valle de amoníaco en el perfil de pH como consecuencia del equilibrio entre la producción de protones durante el proceso de nitrificación (disminución del pH) y la eliminación de CO₂ (aumento del pH). Antes del final de la nitrificación, el pH disminuye porque la producción de protones en el proceso de nitrificación es mayor que el efecto de extracción. Sin embargo, una vez que finaliza la nitrificación, no se producen más protones y el efecto de eliminación es considerablemente mayor, lo que representa un aumento en el pH (Al-Ghusain, 1995).
- Máximo del Nitrato (Figura 2- 9.F): Este máximo en el pH es causado por el equilibrio entre la producción de OH⁻ durante la desnitrificación y la alcalinidad del sistema. Desde la visualización de estos puntos antes del final de las fases de reacción anóxica y aeróbica, es posible optimizar su longitud y la longitud total del ciclo. Cuando el nitrato es completamente consumido, existe un cambio brusco en el pH, el cual corresponde al agotamiento del nitrato y el comienzo de la anaerobiosis (procesos metabólicos que tienen lugar en ausencia de oxígeno) (Puig, 2008).

3 Materiales y metodología.

3.1 Materiales.

En el siguiente apartado se detallan los insumos para el montaje y operación del sistema SND-SBR.

3.1.1 Sustratos sintéticos.

La composición de los sustratos sintéticos nitrificante y desnitrificante, se han elaborado en base a la estequiometría que utilizan los autores Wiesmann (1994) y Darbi (2003). Además, trazas de compuestos y elementos han sido añadidos en la alimentación desnitrificante, tomando como referencia los experimentos de Koenig (2001). Similar para la alimentación nitrificante, donde compuestos que sirvan para enriquecer la biomasa han sido seleccionados en base al trabajo experimental realizado por Cortés (2013), donde, parte de su investigación, también incluye organismos nitrificantes autótrofos.

Para controlar el pH, se utiliza un *buffer* de K_2HPO_4/KH_2PO_4 . Para cada sustrato sintético, se agrega HCl o NaOH de manera de que el pH de la alimentación se encuentre entre 7,0 y 7,3 al momento de iniciar el ciclo.

A continuación, se detalla la composición de los sustratos en las Tablas 3-1 y 3-2:

3.1.1.1 *Sustrato nitrificante.*

Los compuestos que sirvan para enriquecer la biomasa han sido seleccionados en base al trabajo experimental realizado por Cortés (2013) del cual se obtiene la cantidad inicial de NH_4Cl y de *buffer* K_2HPO_4/KH_2PO_4 , además de tener en cuenta la reacción catabólica formulada por Wiesmann (1994), considerando la estequiometría y un exceso del 20% de $NaHCO_3$. (ver tabla 3-1).

Tabla 3-1 Composición del Sutrato Nitrificante.

Compuesto	Cantidad [g]
NH_4Cl	0,3567
K_2HPO_4	2,8442
KH_2PO_4	1,8961
$NaHCO_3$	1,9343

Compuesto	Cantidad [g]
NaCl	0,1200

El sustrato nitrificante se prepara en un aforo de 1,4 L. La razón C/N es aproximadamente de 3.

3.1.1.2 Sustrato desnitrificante.

La composición del sustrato desnitrificante se ha elaborado en base a la estequiometría que utiliza Darbi (2003) (ecuación 2-5), teniendo en consideración un 20% de exceso. Las trazas de compuestos y elementos han sido añadidos en la alimentación desnitrificante, tomando como referencia los experimentos de Koenig (2001) y la cantidad inicial de NH_4Cl y de *buffer* $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ fue obtenida de Cortés (2013). (ver Tabla 3-2).

Tabla 3-2 Composición del Sutrato Desnitrificante.

Compuesto	Cantidad [g]
NH_4Cl	0,3210
K_2HPO_4	2,6147
KH_2PO_4	1,7179
NaHCO_3	1,1007
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,7000
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0140
S°	0,7736

El sustrato desnitrificante se prepara en un aforo de 0,6 L, con lo que se tiene una alimentación total de 2 L. La razón C/N es aproximadamente de 2.

3.1.2 Equipos y materiales

Los equipos indicados en la sección anterior para el montaje para el sistema SND-SBR consisten en los indicados en la tabla a 3-3:

Tabla 3-3 Equipo y Materiales para el sistema SND-SBR

Cantidad	Equipo/Material	Marca	Modelo
1	Reactor SND-SBR		
1	Cámara Aislante para el Reactor		

Tabla 3-4 Equipo y Materiales para el sistema SND-SBR (continuación)

Cantidad	Equipo/Material	Marca	Modelo
1	Agitador Mecánico	VELP Scientifica	LS
2	Timers Analógicos		
1	RTD (Pt-100)	Omega	
2	Compresores de aire para acuarios		
1	Medidor de flujo de aire	ColeParmer	32707-32 Air
1	pH-metro	Thermo Scientific	Orion Star A211
1	Bomba Peristáltica	Lead Fluid	BT300L
1	Bomba Peristáltica	Longerpump	BT300-2J
1	Bomba Peristáltica	Masterflex	L/S
2	Vasos precipitados		
1	Equipo calefactor	Havel	FH 2000

3.1.3 Inóculo.

Se utilizó lodo anaerobio proveniente de una laguna anaerobia tapada que trata purín de cerdo, con una concentración 53,47 g/L SSV, proveniente de una empresa agrícola de crianza de cerdos (Agrícola AASA, V región de Valparaíso), mientras que el lodo aerobio de concentración 1,8 g/L SSV, fue obtenido de una laguna tapada de una planta faenadora de pollos. El reactor fue inoculado con 1 L de una mezcla de lodos aerobio/anaerobio en razón 30/70, lo cual corresponde a una estimación en base a la investigación de Cortés (2013), con el fin de tener una población de microorganismos nitrificantes y desnitrificantes balanceadas. Finalmente, se tiene una concentración de biomasa inicial de aproximadamente 9 g/L. Cabe destacar que esta biomasa contiene microorganismos de todo tipo, incluyendo heterótrofos, los cuales, dadas las condiciones de operación, irán disminuyendo a lo largo del tiempo debido a la falta de sustrato orgánico para su supervivencia.

3.2 Reactor SBR.

Para la experiencia, ha sido confeccionado un reactor de estructura de plástico transparente de alta densidad con cubierta y un agitador mecánico, y con un volumen máximo efectivo de 3 litros.

3.2.1 Diseño.

De acuerdo con la Figura 3-1, el reactor fue diseñado con 3 ductos de entrada, un ducto de salida, y un ducto que permite la toma de muestra y medir el pH dentro del reactor. Además cuenta con un sistema de aireación compuesto por 3 difusores de aire y un agitador mecánico.

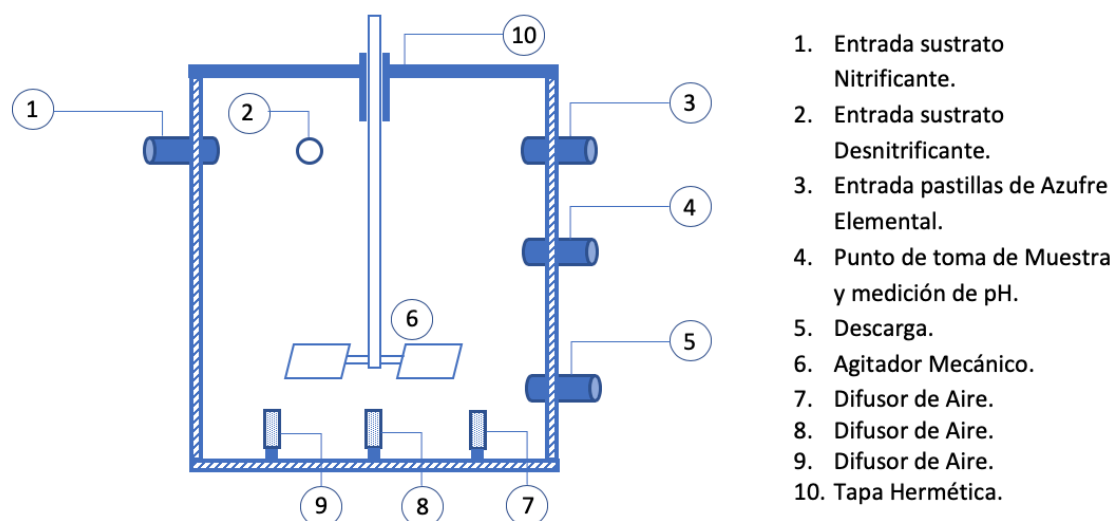


Figura 3-1 Esquema de partes constituyentes del reactor SBR-SND. Fuente: .

Dos de las tres entradas permiten el ingreso de los sustratos nitrificante y desnitrificantes, que están cada uno en vasos precipitados sellados con papel aluminio para evitar la evaporación de la alimentación previo a que ingrese al reactor. La tercera entrada sirve para hacer ingreso del azufre que se utiliza en la desnitrificación al comienzo de cada ciclo, y se mantiene sellada a excepción de cuando se requiere para la desnitrificación.

Los sustratos son suministrados al reactor mediante bombas peristálticas para el sustrato nitrificante y Desnitrificante. Se fija un flujo de 7,8 mL/min para la alimentación nitrificante y 3,3 mL/min para la alimentación desnitrificante.

De la misma forma en que el sustrato ingresa al sistema, tanto el efluente tratado como las muestras, son retiradas con una bomba peristáltica. Para el caso de la descarga, el efluente es depositado en probetas plásticas de 1 litro de capacidad, de manera de corroborar que el volumen dentro del reactor está acorde al volumen retirado en forma de efluente. Para la toma de muestra, la bomba es operada manualmente y regulada mediante el accionamiento del operador.

Con la finalidad de disponer de oxígeno de la manera más homogénea posible durante la fase de reacción aerobia, se ha instalado un arreglo de tres difusores de forma diagonal en el fondo

del reactor, utilizando 2 compresores de aire para acuarios (Figura 3-2), donde cada compresor tiene dos salidas. Uno de ellos en la modalidad de alto flujo para ambas salidas y uno (el que le corresponde el difusor central) en la modalidad de bajo flujo con una salida conectada al reactor y la otra salida al ambiente, con lo que se consigue un caudal de aire de 2,96 L/min.



Figura 3-2 Compresores de Aire de Acuario.



Figura 3-3 Medidor de Flujo de Aire.

La agitación es suministrada por una aspa rotatoria de 4,5 cm cada aspa, instalada en la parte superior de del reactor y mantenida a 100 r.p.m mediante un rotor marca VELP Scientifica. El monitoreo (la frecuencia del monitoreo depende del caso de estudio dentro de la experiencia) del pH dentro del reactor es efectuado por un medidor de pH Thermo Scientific, modelo Orion Star A211, tal como se muestra en la Figura 3-4.

La ejecución de las distintas fases dentro del ciclo está controlada por *timer*, conectados a cada una de las bombas y de los aireadores. Los *timers* activan cada período de acuerdo a lo que corresponde en función de en que fase del ciclo se encuentre el SBR, el cual se puede observar en la Figura 3-5.



Figura 3-4 Medidor de pH.



Figura 3-5 Montaje final del sistema.

3.2.2 Montaje del reactor.

Para asegurar las condiciones óptimas de baja luminosidad y control sobre la temperatura ambiente durante el proceso, el reactor ha sido montado dentro de una jaula térmica confeccionada mediante plumavit y una estructura metálica. Dentro de la cámara aislante se encuentra una Pt-100, la cual esta conectada a un controlador seteado en $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, de

manera que cuando la temperatura baja fuera del rango óptimo, el controlador activa un calefactor eléctrico que eleva la temperatura hasta alcanzar el *set point*.

3.2.3 Diseño de ciclo SND.

La operación del reactor ha sido diseñada en base a ciclos diarios, con un TRH (tiempo de retención hidráulico) de 72 horas distribuidos en 3 alimentaciones. Los tiempos para cada etapa del ciclo son definidos teniendo en consideración que se fueron probando distintas configuraciones de períodos de reacciones, pero luego de observar que existía acumulación de nitrato, se llegó a la conclusión que la reacción anóxica de desnitrificación es la fase limitante dentro del ciclo SND. Finalmente, considerando que un ciclo está compuesto de 3 alimentaciones, es decir 3 sub-ciclos, la distribución horaria porcentual de cada etapa es descrita en la Figura 3-6:

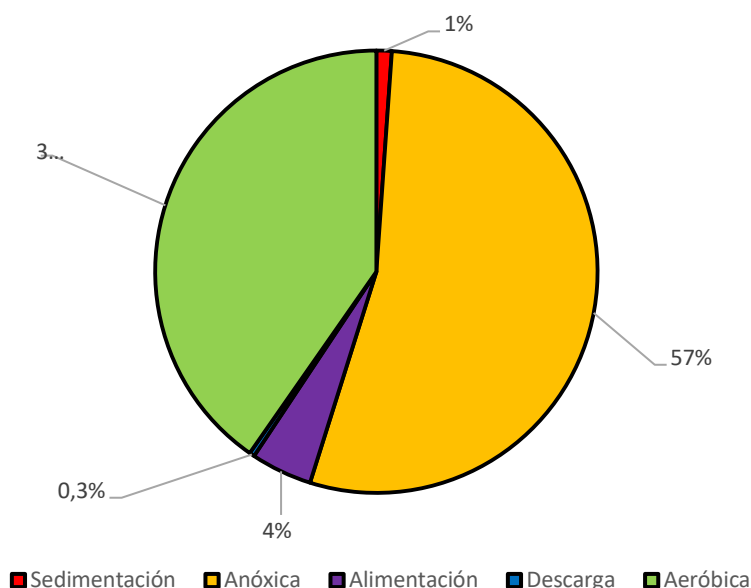


Figura 3-6 Distribución Porcentual de horas de cada etapa en un ciclo del reactor SND-SBR. .

Cabe destacar que las etapas de alimentación, sedimentación y descarga constituyen períodos donde no hay inyección de aire, es decir son anóxicos y contribuyen a la desnitrificación.

3.2.3.1 Estrategia de Alimentación.

El ciclo, obviando la sedimentación y la descarga, ha sido dividido en tres sub-ciclos. Cada sub-ciclo comienza con una alimentación que corresponde a un tercio del total del afluente que tiene que ingresar al reactor. Cada sub-ciclo se compone de una alimentación anóxica y etapas de reacción aerobia y anóxica.

En la alimentación, se incorpora, con los caudales mencionados anteriormente, un tercio de los dos litros que componen la alimentación durante una hora. Esto permite suministrar el amonio de forma dosificada para evitar la posterior sobrecarga de los organismos desnitrificantes, lo que genera una acumulación de nitrato en el reactor.

El sub-ciclo está definido en base el orden de las reacciones que se expone en la Figura 2-8. Terminada la etapa de alimentación, comienza la primera etapa anóxica a modo *mixed-react*, donde el SBR es agitado a 100 r.p.m. La etapa anóxica continua por 8 horas, haciendo un total de 9 horas de una vez indicado el ciclo. Luego sigue la primera etapa aerobia, la cual posee una duración de 8 horas, donde el aire es suministrado por los compresores de acuario. El SBR sigue estando agitado a una velocidad de 100 r.p.m. A continuación, se vuelve a alternar el tipo de reacción, creando condiciones anóxicas por una duración de 6 horas, con lo que el sub-ciclo lleva una duración de 23 horas desde que se comenzó a alimentar el reactor.

Finalmente, y previo a que comience una nueva alimentación, se realiza una última etapa de aireación de una hora de duración, completando el sub-ciclo de 24 horas. De esta manera, el ciclo permite la alternancia entre condiciones aeróbicas y anóxicas de manera de lograr sinergia entre la oxidación de amonio y el atajo biológico (desnitrificación vía nitrito) para la desnitrificación, evitando acumulación de nitrato en el reactor.

3.2.3.2 Sedimentación.

Luego de terminado los tres sub-ciclos con sus tres etapas de alimentaciones respectivas, se prepara el sistema para retirar el efluente tratado. Por ello, se ejecuta una etapa de separación de la biomasa del sobrenadante. Gracias a experimentos de sedimentabilidad realizados en el laboratorio, se concluye que el lodo presente en el reactor es de fácilmente sedimentable y con 45 minutos de sedimentación se alcanza una recuperación del lodo mayor al 95%.

Es clave mantener un período acorde a las características del lodo inoculado en un comienzo, ya que de existir filamentosas se necesitaría un período mucho mayor de sedimentación para evitar el lavado de biomasa del equipo (Cortés, 2013).

3.2.3.3 Descarga.

Posterior a la sedimentación, se utiliza una bomba peristáltica Masterflex L/S para la descarga el efluente, el cual es depositado en probetas de un litro de manera de medir la cantidad de volumen retirado y conocer la cantidad de volumen remanente en el SBR.

3.2.3.4 Planificación del ciclo.

Las etapas descritas anteriormente han sido programadas de acuerdo a la Tabla 3-4.

Tabla 3-5 Etapas del Ciclo. Fuente:

Hora Inicio	Hora Término	Fase	Etapas
0	1	Alimentación Anóxica	Subciclo 1
1	9	Reacción Anóxica	Subciclo 1
9	17	Reacción Aerobia	Subciclo 1
17	23	Reacción Anóxica	Subciclo 1
23	24	Reacción Aerobia	Subciclo 1
24	25	Alimentación Anóxica	Subciclo 2
25	33	Reacción Anóxica	Subciclo 2
33	41	Reacción Aerobia	Subciclo 2
41	47	Reacción Anóxica	Subciclo 2
47	48	Reacción Aerobia	Subciclo 2
48	49	Alimentación Anóxica	Subciclo 3
49	57	Reacción Anóxica	Subciclo 3
57	65	Reacción Aerobia	Subciclo 3
65	71	Reacción Anóxica	Subciclo 3
71	72	Reacción Aerobia	Subciclo 3
72	72,75	-	Sedimentación
72,75	73	-	Descarga

3.3 Estrategia de operación.

Para cada una de las etapas de puesta en marcha y operación con el RIL sintético de composición fija (sustratos nitrificantes y desnitrificantes), las condiciones generales de operación son las mismas.

Para poder alcanzar los objetivos planteados con respecto a la puesta en marcha, se ha decidido aumentar progresivamente la VCN en un 20% por sobre las condiciones de operación del sustrato del ciclo anterior.

3.3.1 Criterio de estabilidad y aumento de la VCN.

El aumento de la velocidad de carga nitrogenada se aplica cuando se cumplen los siguientes criterios de estabilidad:

- Se logra una remoción superior al 50% con respecto a la cantidad de nitrógeno que ingresa en la alimentación más en nitrógeno que hay en el volumen remanente posterior a la descarga del ciclo previo.
- Durante todo el ciclo anterior, el pH siempre se mantiene entre 7,0 y 7,6, De manera que el nitrógeno faltante en el balance de masa es producto de la reacción desnitrificante que libera nitrógeno atmosférico y no del *stripping* de amoníaco.
- Lo anterior se debe cumplir al menos 3 ciclos seguidos.

La estrategia de operación se ilustra a través de la Tabla 3-4. Donde se proyecta el aumento de la VCN en caso de que cada ciclo cumpla con los criterios de estabilidad. El aumento de VCN es de un 20%.

Tabla 3-6 Estrategia de Operación Proyectada. Fuente:

Número de ciclos	Tiempo [d]	VCN [kg N-NH ₄ ⁺ /(m ³ d)]
0	0	0,0296
1	3	0,0296
2	6	0,0296
3	9	0,0355
4	12	0,0355
5	15	0,0355
6	18	0,0423
7	21	0,0426
8	24	0,0426
9	27	0,0511
10	30	0,0511
11	33	0,0511

3.4 Procedimiento de análisis y adquisición de datos.

3.4.1 Variables de Análisis.

Las variables para analizar, es decir, variables de interés, de acuerdo a la naturaleza del proceso SND son señaladas en la Tabla 3-6.

Tabla 3-7 Variables de Medición durante el trabajo experimental.

Estado	Variable	Objetivo
Compuestos nitrogenados	NH_4^+	Remoción de Nitrógeno
	N-NH_4^+	Remoción de Amonio, Cinética
	NO_3^-	Remoción de Nitrógeno
	N-NO_3^-	Remoción de Nitrógeno, Cinética
	NO_2^-	Remoción de Nitrógeno
	N-NO_2^-	Remoción de Nitrógeno, Cinética
Biomasa	SSV	Control de Purga, Cinética
Sulfatos	SO_4^{2-}	Rendimiento Desnitrificación, Cinética
	S^0	Rendimiento Desnitrificación, Cinética
Operación SND	pH	Comportamiento Operacional

Para el muestreo de compuestos nitrogenados y sulfatos, se extrae una muestra de 60 mL de la descarga previamente sedimentada. Para el muestreo de biomasa se extrae una muestra de 50 mL, pero cuando el reactor se encuentra agitado, de manera de tomar una muestra con el reactor en estado homogéneo.

Para los compuestos nitrogenados, se cuantifican previo a ingresar al ciclo, midiendo la composición de la alimentación, y posterior al ciclo (de tres días), al medir el sobrenadante sedimentado (extraído del reactor) que se dejó reposar de entre 15 a 20 horas a temperatura de refrigeración. Para cada una de ellas se midió la concentración de amonio, nitrito y nitrato utilizando espectrofotometría UV-vis según los métodos 4500-NH₃ F, 4500-NO₂⁻ y 4500-NO₃⁻ B respectivamente, obtenidos desde *standard methods for the examination of waters and wastewaters*. Mismo procedimiento para la cuantificación de sulfatos. La medición de

sólidos volátiles se realiza cada 3 ciclos de manera de poder cuantificar el crecimiento de la biomasa durante la puesta en marcha y la etapa de operación con alimentación sintética.

3.4.2 Procedimientos de análisis.

Las variables mencionadas en 3.4.1 y posteriormente muestreadas de acuerdo con 3.4.2 son analizadas de acuerdo a los procedimientos expuestos en la siguiente tabla:

Tabla 3-8 Procedimiento de Análisis de Muestras.

Estado	Variable	Procedimiento
Compuestos nitrogenados	NH_4^+	Espectrofotometría
	N-NH_4^+	Espectrofotometría
	NO_3^-	Espectrofotometría
	N-NO_3^-	Espectrofotometría
	NO_2^-	Espectrofotometría
	N-NO_2^-	Espectrofotometría
Biomasa	SSV	Standard Methods
Sulfatos	SO_4^{2-}	Espectrofotometría
	S^0	Standard Methods
Operación SND	pH	Electrodo Selectivo

Todas las metodologías señaladas en la Tabla 3-4 se explican con mayor detalle en el Anexo A.1.

3.5 Etapas operacionales de la planificación experimental.

Dentro de la planificación experimental propuesta es posible diferenciar claramente dos etapas operacionales: puesta en marcha y operación. Cada una de las etapas consideran objetivos específicos y resultados esperados. Para diferenciar estas etapas es necesario definir criterios que permitan enmarcar los objetivos con las etapas.

Los criterios que permiten establecer en qué etapa de la planificación experimental se está operando son los siguientes:

- Comportamiento del crecimiento microbiano.
- Rendimiento del reactor y adaptación de la biomasa en distintas condiciones de alimentación.

3.5.1 Etapa de puesta en marcha.

La etapa inicial del estudio corresponde a la puesta en marcha del sistema SND-SBR. Las principales actividades a realizar durante a esta etapa consideran:

- El diseño del proceso, duración de ciclos, flujos y composición de alimentación.
- Establecer y ejecutar el montaje de los equipos necesarios para el proceso SND operando de la forma SBR, reactores, sistema de aireación, bombas peristálticas, conexiones de tuberías, programación de *timers* y del sistema termorregulador.
- Permitir la adaptación de los microorganismos que lleven a cabo los procesos simultáneos, evaluando sus actividades y velocidades de consumo de sustratos en base a los niveles de remoción que alcanza el proceso.
- Determinar puntos operacionales característicos en base al perfil de pH y los niveles de acumulación de nitrito y nitrato.

3.5.2 Etapa operacional de alimentación sintética de composición constante.

Tras la realización de la etapa de puesta en marcha, donde la operación del sistema SND-SBR consiste principalmente en el aumento gradual (escalonado) de VCN, continúa la etapa de alimentación con una composición fija. Es importante dejar establecido que durante toda la operación, la razón C/N se mantiene constante, tanto para la alimentación nitrificante como la desnitrificante.

El sustrato utilizado en esta fase también es sintético, de acuerdo con lo informado en el punto 3.1.1. Se debe estudiar el comportamiento de la biomasa, esto quiere decir, su crecimiento y estabilidad, además de la cantidad de nitrógeno removida en el efluente. Las principales actividades y objetivos por realizar durante esta etapa son:

- Estudiar el comportamiento del sistema SND-SBR y las tasas de remoción de compuestos nitrogenados al ir variando la VCN en torno a la composición final de la alimentación en el término de la puesta en marcha.
- Determinar puntos operacionales característicos en base al perfil de pH y los niveles de acumulación de nitrito y nitrato.
- Establecer la significancia de las variables en el comportamiento del sistema y su eficiencia en la remoción de nitrógeno.

- Estudiar la cinética de los microorganismos presentes en el sistema SND-SBR mediante bio-experimentos de nitrificación y desnitrificación. Luego ajustar modelos cinéticos previamente definidos en la literatura.

3.6 Ensayos biológicos y modelación

Para modelar la cinética de nitrificación y desnitrificación, se realizarán ensayos biológicos de nitrificación, los cuales consisten en experimentos de tipo *batch* donde se vierte un volumen conocido del reactor principal con una concentración conocida de biomasa (microorganismos). Luego se imitan las mismas condiciones del sistema SND-SBR dependiendo de que proceso se quiere representar: aerobio o anóxico.

Para el proceso bajo condiciones aerobias se tiene planeado realizar 4 bio-ensayos de nitrificación, a diferentes concentraciones de amonio (que será oxidado) con una duración máxima de 12 horas, mientras que para el proceso anóxico se tiene planeado realizar 2 bio-ensayos de desnitrificación, con concentraciones iniciales de nitrato diferentes y una duración máxima del barrido de tres días.

Una vez obtenidos los valores de concentración en función del tiempo, mediante los métodos expuestos en 3.4.3, se ajustarán los modelos expuestos en 2.7. Para ello se harán simulaciones matemáticas (usando el método numérico Runge-Kutta) con valores iniciales tentativos de los parámetros, luego mediante un software (MatLab) se encontrarán los valores reales de los parámetros al minimizar el error entre las simulaciones y los datos experimentales.

4 Resultados y Discusión.

4.1 Comportamiento Operacional del Reactor.

El reactor SND-SBR fue puesto en marcha y posteriormente operado por un total de 154 días, completando 51 ciclos durante ambas etapas. Todos los balances y eficiencias van a ser calculados en función de la masa del compuesto de interés que haya en el reactor o en la alimentación. Es por ello que es necesario conocer el volumen del reactor al final de cada ciclo, previo a la sedimentación y descarga. El volumen, Figura 4-1, depende de la alimentación, del remanente posterior a la descarga del ciclo anterior y de las pérdidas por evaporación

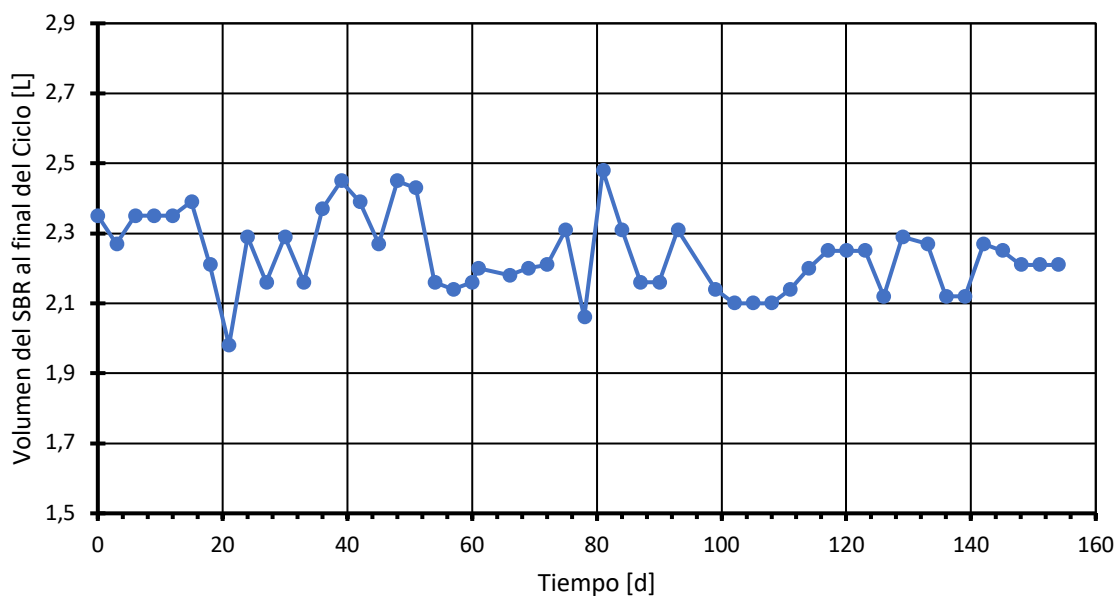


Figura 4-1 Volumen del reactor al final de cada ciclo durante toda la operación. .

En la Figura 4-2 es posible apreciar el la operación completa, el control de pH ejercido durante el trabajo experimental y la variación de la VCN durante la totalidad de la operación (es decir, las etapas de puesta en marcha y operación). El pH promedio de operación fue de $7,39 \pm 0,3$.

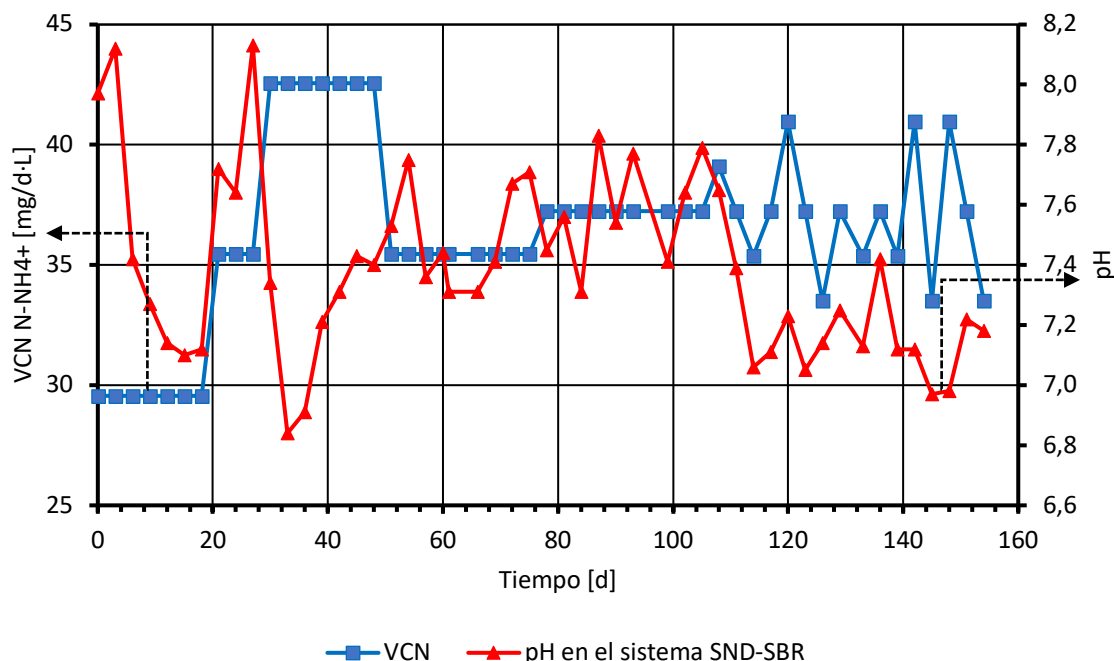


Figura 4-2 Control de pH durante la operación versus la Velocidad de Carga Nitrogenada.

4.1.1 Biomasa SND.

Inicialmente la biomasa fue inoculada de acuerdo con lo señalado en 3.3. Cabe mencionar que la concentración de masa bacteriana ha sido cuantificada como sólidos suspendidos volátiles (SSV).

4.1.1.1 Crecimiento Bacteriano y Estabilización.

Para la etapa de puesta en marcha, en el comienzo de la operación, existe decrecimiento de la biomasa dentro del reactor, esto debido a que existe un lavado de biomasa que no logra sedimentar adecuadamente según el volumen del reactor y el tiempo de sedimentación definido durante los primeros ciclos, y en menor medida, debido a que los microorganismos heterótrofos se quedan sin la carga orgánica que posee el reactor producto de los inóculos iniciales. Finalmente, el reactor alcanzó un mínimo de 1614 mg SSV/L el día 33 de operación (Figura 4-3), para luego estabilizarse y permitir el aumento de la concentración de biomasa, hasta aproximadamente 2 g/L. La puesta en marcha se extendió hasta estabilizar la biomasa dentro del reactor, esto se logró al hacer que la biomasa lavada durante la sedimentación y descarga se equiparara con el aumento de esta producto del metabolismo intrínseco del sistema SND-SBR, teniendo como consecuencia un proceso estacionario con respecto al balance de biomasa del sistema. El criterio de estabilización de la biomasa fue que al menos

durante 12 días, la concentración de biomasa no variaba más de un 5% con respecto a la concentración del ciclo anterior, esto es lo mismo a decir 4 ciclos completos de operación. Estabilizar la biomasa del reactor y dar por terminada la puesta en marcha tardó 75 días (Figura 4-1), siempre teniendo en cuenta el criterio de estabilidad y aumento de la VCN.

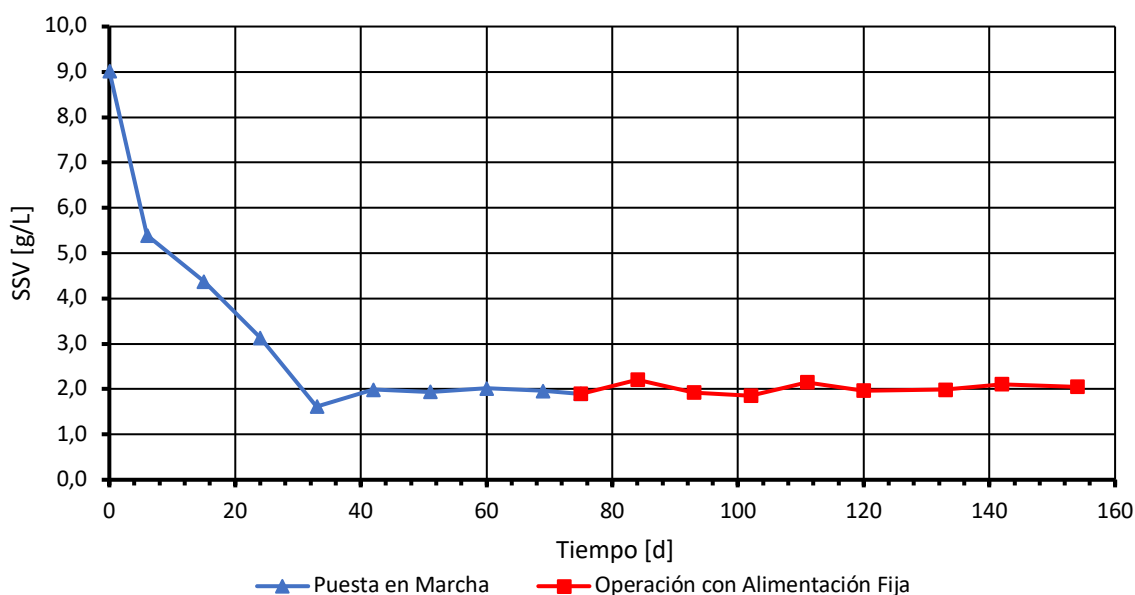


Figura 4-3 Comportamiento del crecimiento microbiano.

Posterior a la puesta en marcha, comienza la etapa de operación de alimentación con RIL sintético de composición fija, donde el enfoque está dado en aumentar la VCN y determinar la cinética de nitrificación y desnitrificación del sistema SND-SBR. En la Tabla 4-1 se detallan los cambios realizados durante la operación, incluyendo el aumento de la VCN. A partir del día 111 se estudió el comportamiento del reactor SND-SBR ante fluctuaciones en la cantidad de nitrógeno que ingresa al sistema.

Tabla 4-1 Modificación de Variables durante la operación del sistema SND-SBR. Fuente: .

Días	Variable que se modifica	Magnitud y/o Comentario
0 – 6	Comienzo de la Operación	
6 – 21	Flujo de aire	Aumento a 1,96 LPM (litros por minuto)
21 – 27	Alimentación	Aumento 20% VCN a un valor de 35,47 [mg/d·L]

Días	Variable que se modifica	Magnitud y/o Comentario
30 – 48	Alimentación	Aumento 20% VCN a un valor de 42,56 [mg/d·L]
45 – 51	Tiempo de ciclos	11,5 h período aerobio
		11,5 h período anaerobio
51 – 66	Alimentación	Disminución 20% VCN a un valor de 35,47 [mg/d·L]
66 – 69	Tiempo de ciclos	10 h período aerobio
		13 h período anaerobio
69 – 78	Orden de etapas	Se implementa las fases y períodos en función del ciclo típico de 9 horas (Rittmann y McCarty, 2001).
78 – 111	Alimentación	Aumento 5% VCN a un valor de 37,24 [mg/d·L]
111- 154 (Fin del trabajo Experimental)	Alimentación	Diversas fluctuaciones que incluyen disminuciones y aumentos de 5% y 10% a la VCN, es decir, entre valores de 33,51 y 40,96 [mg/d·L]

Sin importar los cambios que se hacen en la cantidad de nitrógeno que entra al sistema, a partir del día 42 la biomasa dentro del reactor se mantiene estable en $2,001 \pm 0,105$ g/L. Esto se debe a que el crecimiento de la biomasa es muy lento y de bajo rendimiento en comparación a la VCN que se suministra al reactor SND-SBR. También se puede apreciar que el aumento progresivo de la VCN durante los primeros días del trabajo experimental sirvió para amortiguar la concentración de biomasa dentro del reactor que disminuía conforme a los microorganismos heterótrofos se les iba acabando la disponibilidad de sustrato orgánico proveniente del inóculo. Esto se puede apreciar ya que el valor mínimo de SSV durante la puesta en marcha fue solo un 19,4% menor al que se alcanzó una vez estabilizado el sistema.

4.1.2 Estudio del comportamiento de remoción de nitrógeno. Eficiencias y Adaptabilidad. Durante el período de trabajo experimental, se estudio el comportamiento histórico de los compuestos nitrogenados (Amonio, Nitrito y Nitrato).

4.1.2.1 Nitrificación.

La oxidación de amonio durante el período de trabajo fue de alta eficiencia y adaptabilidad, el sistema SND-SBR solo tardó 5 ciclos en alcanzar rendimientos superiores al 80% (Figura 4-2).

Cabe destacar que se define la eficiencia del proceso de nitrificación en el ciclo en función de la cantidad de amonio remanente en el remanente del reactor y en la descarga previamente sedimentada:

$$\eta_{\text{nitrificación}} = \frac{m_{\text{amonio inicial}} - m_{\text{amonio final}}}{m_{\text{amonio inicial}}}$$

Finalmente, la eficiencia del proceso de nitrificación (procesos aerobio) durante la operación del reactor, fue de 98,63%.

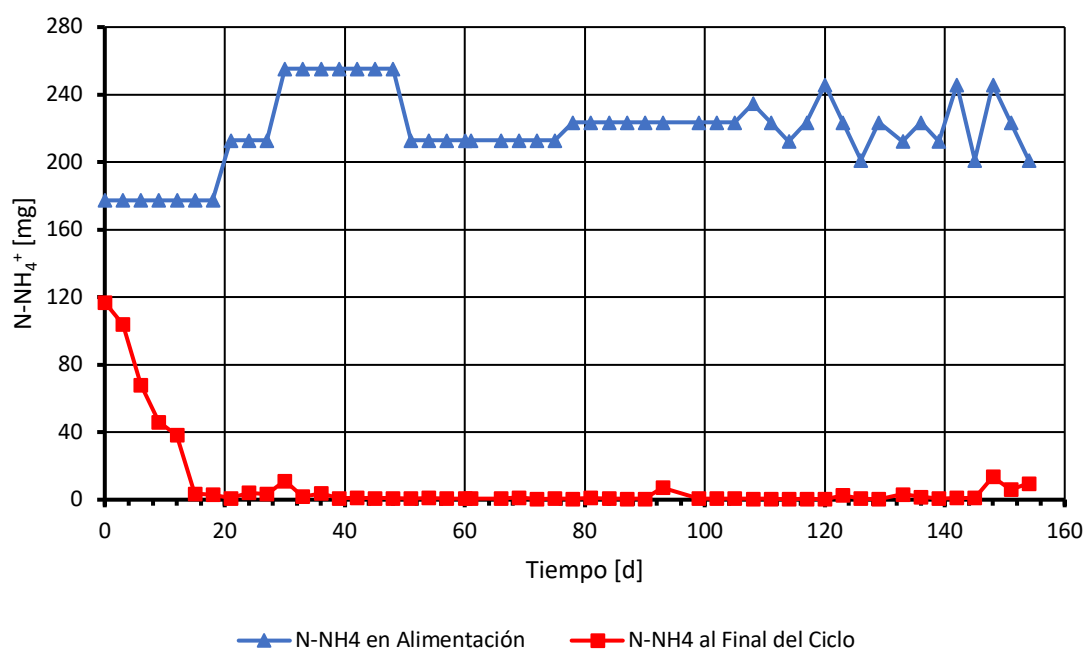


Figura 4-4 Masa de nitrógeno amoniacal presente en el sistema SND-SBR, al comienzo y final de los ciclos de operación.

Se puede apreciar que el rendimiento de la nitrificación es prácticamente estable durante toda la operación, variando ligeramente en los últimos días cuando se llevaron a cabo fluctuaciones en la alimentación, como se menciona en la Figura 4-4.

El valor mínimo de concentración de amonio alcanzado durante la operación fue de 0,17 mg N-NH₄⁺/L y corresponde al ciclo número 40, día 120 de operación, lo que se traduce en un 99,85% de eficiencia. Cabe destacar que ese ciclo corresponde al período de fluctuaciones de alimentación y específicamente a un ciclo donde se aumenta en un 10% la VCN que ingresa al sistema SND-SBR. Por lo tanto, queda demostrado que los microorganismos nitrificantes que componen el sistema SND se adaptan bien a cambios en las condiciones de entrada del sistema.

Basado en la bibliografía, el buen desempeño del proceso aerobio y las altas eficiencias alcanzadas se pueden deber a

- Formación de microambientes anóxicos/aerobios en el espesor del *biofilm* formado en la superficies de las lentes de azufre.
- Potenciamiento de metabolismos oxidantes entre poblaciones microbianas que llevan a cabo el proceso aerobio del sistema SND
- Mayor concentración de microorganismos por sedimentación y retención celular. Esto quiere decir que la sedimentación logra mantener casi completamente a los microorganismos dentro del reactor, lo que se traduce en un tiempo de retención largo.

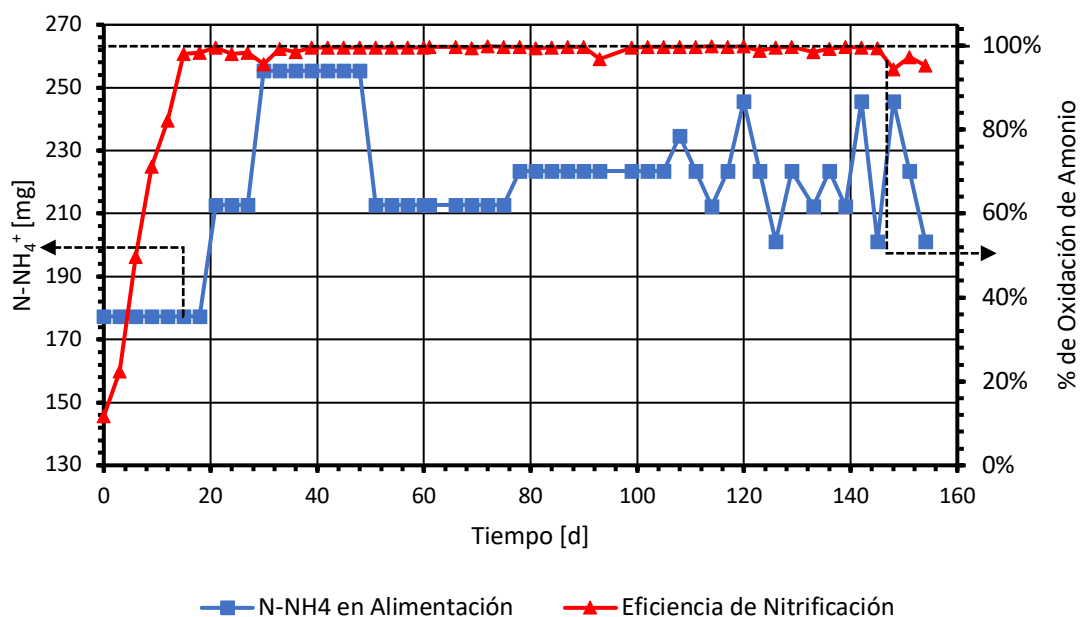


Figura 4-5 Eficiencia de Nitrificación del ciclo en el tiempo versus Nitrogeno amoniacal en la alimentación al comienzo del Ciclo.

4.1.2.2 Desnitrificación y remoción de nitrógeno.

“La reducción biológica de nitrato o nitrito a gas nitrógeno se denomina desnitrificación” (Metcalf y Eddy, 2014).

Para analizar el rendimiento de la desnitrificación bajo ese concepto es necesario estudiar el comportamiento de las concentraciones de nitrato y nitrito durante la operación. Como el sistema consta de dos procesos, la remoción total de nitrógeno al final del ciclo va a depender de cuán eficientes hayan sido los microorganismos nitrificantes y desnitrificantes. De lo cual se obtiene la siguiente expresión para determinar la eficiencia del proceso de desnitrificación:

$$\eta_{\text{desnitrificación}} = \frac{m_{\text{nitrógeno removida}}}{m_{\text{nitrógeno oxidado disponible}}}$$
$$\eta_{\text{desnitrificación}} = \frac{m_{\text{nitrógeno oxidado disponible}} - m_{\text{nitrógeno oxidado final}}}{m_{\text{nitrógeno oxidado disponible}}}$$

En donde:

$\eta_{\text{desnitrificación}}$ = eficiencia de la remoción de nitrógeno en el proceso de desnitrificación.

$m_{\text{nitrógeno oxidado disponible}}$ = masa de N-NO_2^- y N-NO_3^- al comienzo de la desnitrificación.

$m_{\text{nitrógeno oxidado final}}$ = masa de N-NO_2^- y N-NO_3^- al final del ciclo.

Cabe destacar que la cantidad de nitrito y nitrato inicial es función de cuánto amonio se oxidó en la nitrificación. Además, es fundamental considerar el remanente que queda en el reactor una vez realizada la sedimentación y descarga, ya que la cantidad de nitrógeno que hay al comienzo del ciclo no va a ser solo función de la VCN que se fija en la alimentación, sino que también va a depender del amonio, nitrito y nitrato que queda en el fondo (0,2 L) el cual a su vez depende de la eficiencia del ciclo anterior. Es por eso por lo que no se puede tener control total de la cantidad de nitrógeno que ingresa al sistema al comienzo del ciclo, tal como es apreciable en la Figura 4-6. Finalmente, la cantidad de N-NO_2^- y N-NO_3^- inicial viene dada por:

$$m_{\text{nitrógeno oxidado disponible}} = m_{\text{N-NH}_4^+ \text{ alimentación}} + m_{\text{N-NH}_4^+ \text{ remanente}} - m_{\text{N-NH}_4^+ \text{ final}}$$

Donde el primer término hace referencia al nitrógeno amoniacal que entra al sistema, el segundo corresponde al nitrógeno amoniacal que queda en el remanente al final del ciclo anterior y el tercer término corresponde al amonio al final del presente ciclo.

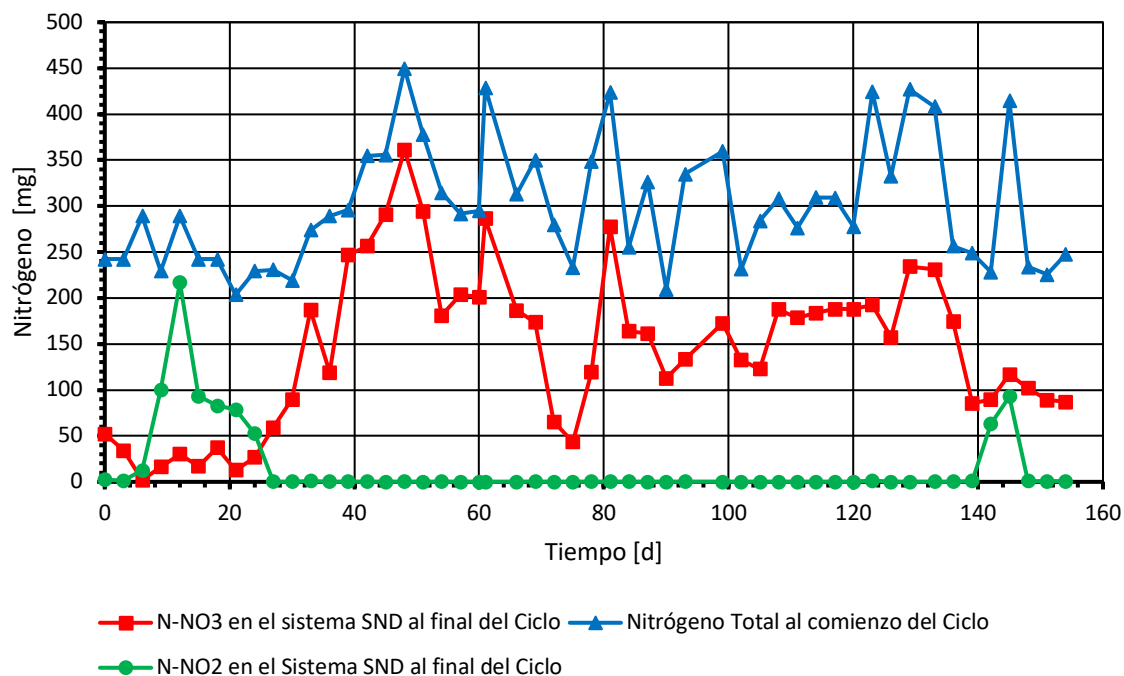


Figura 4-6 Nitrógeno inicial en el sistema para cada Ciclo versus Cantidad de Nitrato y Nitrito al final de cada Ciclo.

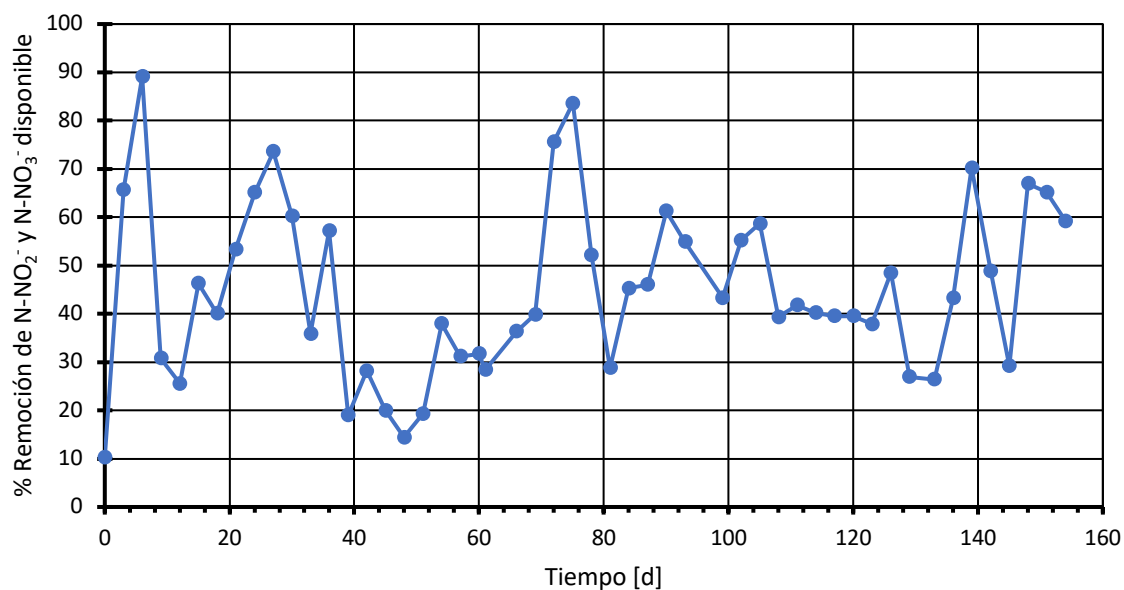


Figura 4-7 Eficiencia de la Desnitrificación de los ciclos durante la operación.

Como se puede observar en la Figura 4-6, no se logra estabilizar la cantidad de nitrógeno al comienzo del ciclo, alcanzando un máximo de 449,5 mg de nitrógeno el día 48 de operación y un mínimo de 203,4 mg el día 21 de operación. La cantidad de nitrógeno inicial tuvo un valor promedio de $295,6 \pm 63,6$ mg.

Las altas eficiencias de remoción del nitrógeno oxidado disponible de los primeros ciclos (Figura 4-7) se debe a que en un comienzo la nitrificación tenía rendimientos de bajo el 80% porque la biomasa se estaba adaptando al medio, por ende, al haber poco nitrógeno que reducir, la eficiencia es alta. Caso contrario ocurre entre los días 39 y 51, donde la VCN fue la mayor en toda la operación (42,56 mg/d·L) y los rendimientos son los peores en toda la operación junto con los ciclos donde se variaba la alimentación de entrada, subiéndole un 10% más de nitrógeno amoniacal. Finalmente, la eficiencia promedio de la desnitrificación durante toda la operación fue de 44,9%.

En un comienzo se trató de operar con el objetivo de acumular nitrito para realizar la desnitrificación vía NO_2^- , pero los niveles de remoción fueron los más bajos en toda la operación, esto sucede durante los ciclos 6 primeros ciclos porque la acumulación es tal que genera inhibición en los microorganismos presentes en el reactor, ya que, al haber mayor concentración de nitrito, es más fácil que se genere ácido nitroso en el reactor, donde concentraciones de tan solo 0,04 mg/L de N- HNO_2 son consideradas tóxicas. Por ejemplo, a 25 ° C, un sistema que contenga 1000 mg/L N- NO_2 y un pH de 7 tendrá aproximadamente una concentración de 0,15 mg/L de N- HNO_2 , que es significativamente mayor que el nivel inhibitorio de 0,04 mg/L y basta con notar en la Figura 4-5 que durante la operación se alcanzaron niveles por sobre los 200 mg de nitrito a temperaturas y pH superiores que favorecen la disociación de nitrito a ácido nitroso (Glass y Silverstein, 1997).

Tabla 4-2 Concentraciones de nitrito y ácido nítrico inhibitorias.

Variable operacional	Presente Investigación	Glass y Silverstein
pH	7,39	7
Temperatura	31 °C	25 °C
Concentración de N- NO_2	200 mg/L	1000 mg/L
Concentración de N- HNO_2	No Determinado	0,015 mg/L
Concentración inhibitoria de N- HNO_2	0,04 mg/L	0,04 mg/L

En cambio, generar acumulación de nitrato (fomentar el proceso aerobio de nitrificación) no generó inhibición en el proceso y permitió alcanzar niveles de remoción sobre el 50% como muestra la Figura 4-8, esto debido a que, a medida que va sucediendo la cadena de reacciones

de desnitrificación, el nitrito que se genera tras reducir el nitrato, continúa reaccionando hasta ser liberado en forma de nitrógeno gaseoso, con lo cual la presencia de nitrito es prácticamente nula y así también, la de ácido nitroso. Por ende, durante toda la operación, se mantuvieron niveles casi despreciables de nitrito, excepto durante el período en que se realizaron cambios en la VCN, período en el cual aumentó la presencia de nitritos debido a que la nitrificación no fue tan efectiva y parte de la desnitrificación fue solamente parcial. Observando la Figura 4-8, donde se muestra el rendimiento de cada uno de los 51 ciclos llevados a cabo durante el trabajo experimental, es posible apreciar que, como se dijo anteriormente, la acumulación de nitrito generó niveles de remociones menores al 25% (primeros 4 puntos). Además, existe una notoria disminución en los rendimientos entre los días 39 a 51, que coinciden con la mayor VCN fijada para la alimentación (255,4 mg de N-NH_4^+ en la alimentación). Ese valor, sumado a el nitrógeno presente en el remanente en formas de nitrito y nitrato, generan la mayor cantidad de nitrógeno que ingresa a sistema, lo cual se puede corroborar al comparar el mismo período (39 a 51 días) en la Figura 4-6. Finalmente se consideró ese valor como una VCN superior a la que puede soportar el sistema SND-SBR en base a los criterios de estabilidad definidos anteriormente. Por eso se baja la cantidad de nitrógeno que entra al sistema mediante la alimentación, lo que permite recuperar rendimientos normales para el sistema.

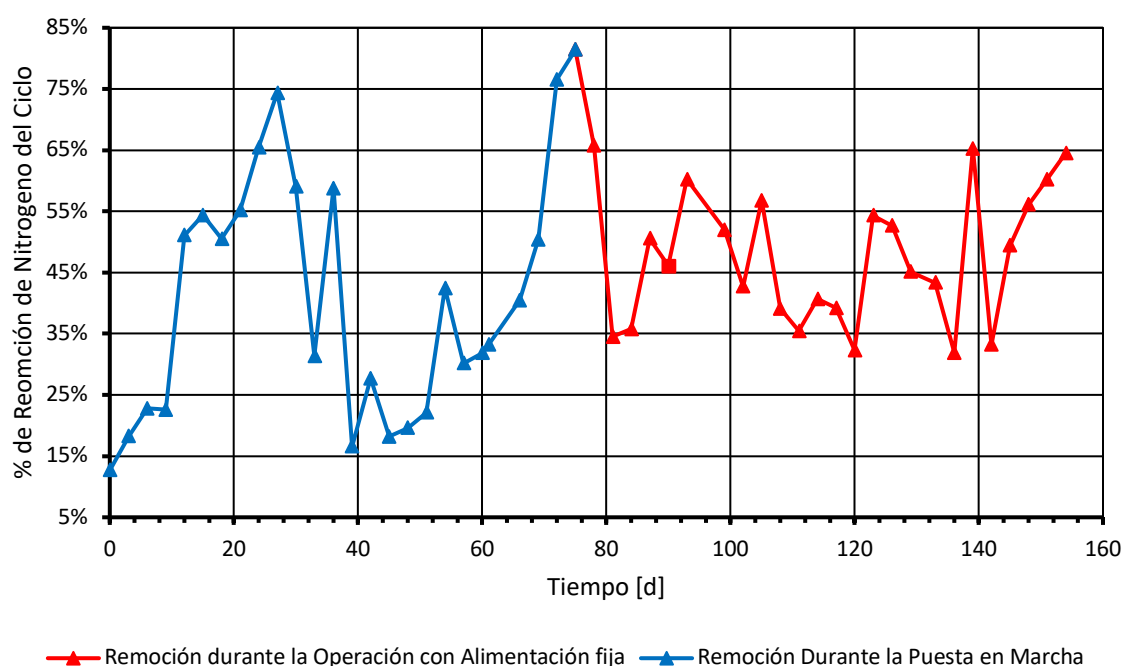


Figura 4-8 Niveles de Remoción de Nitrógeno de cada ciclo durante todo el trabajo experimental.

Es posible notar según la Figura 4-8 que en el día 39 la remoción global de nitrógeno cae dramáticamente, registrándose la acumulación máxima de nitrato durante todo el trabajo experimental, correspondiente a $246,9 \pm 5,5$ mg. Es por consecuente, que el día 45 se implementa una modificación de los tiempos del ciclo que favorezca la fase anóxica y en consecuencia permita la reducción del nitrito acumulado en el reactor (aumento de la fase anóxica en 1 h y disminución de la fase aeróbica en 1h) y disminución de la VCN con el fin de lograr recuperar la eficiencia del proceso SND que existía previamente.

Los porcentajes de remoción vuelven a descender hacia el final de la operación y coinciden con el período de la operación en que se realizaron cambios en las concentraciones de amonio en la alimentación (días 111 a 154), donde, para aumentos en la VCN de la alimentación, exceptuando el último ciclo bajo esta condición, el ciclo no se supera una eficiencia de remoción del 40% con un promedio de 40,19%. A diferencia, cuando se baja la VCN en la alimentación, el porcentaje de remoción aumenta, obteniendo una eficiencia promedio del 55,15%.

Finalmente, sin considerar los primeros 4 ciclos en los que se trató de acumular nitrito, el porcentaje de remoción promedio durante la operación fue de 46,33%, con un máximo de 81,38% logrado el día 75, el cual coincide con el día en que se termina la etapa de puesta en marcha y comienza la de operación con RIL sintético de composición fija.

4.2 Interacciones y Modelo Cinético

El estudio cinético fue realizado mediante la generación de experimentos, para ambos procesos del sistema SND-SBR. Las interacciones del sistema fueron puestas a prueba en el laboratorio al aislar los demás factores de manera de corroborar la validez de estas interacciones en los futuro modelos, de nitrificación y de desnitrificación.

A continuación, se detallan las interacciones y procesos que pueden ocurrir en el sistema SND-SBR y que deben ser consideradas por el modelo cinético:

4.2.1 Ensayos de oxidación aerobia del azufre elemental

Los siguientes ensayos tuvieron la finalidad de determinar si la oxidación del azufre es producto solo de la desnitrificación, o si también, el hecho de inyectar oxígeno durante la nitrificación provoca también la producción de sulfatos.

La oxidación aerobia del azufre elemental corresponde al proceso de formación de sulfatos producto de la aireación del sistema. Es decir, parte del sustrato necesario para llevar a cabo la desnitrificación deja de estar disponible, al interactuar con el oxígeno disuelto en el reactor. Cabe destacar que, en caso de ocurrir en el sistema, la oxidación del azufre ocurriría durante los periodos de reacción aeróbica, entonces consumiría parte del oxígeno que originalmente está destinado para la oxidación de amonio. Por lo tanto, si el oxígeno disuelto es limitado, la oxidación del azufre puede generar que la cadena de reacciones del proceso SND no ocurra en su totalidad y afectar la eficiencia del sistema.

Para corroborar la validez de esta interacción se realizó un experimento en el cual se masaron 2 gramos de lentejas de azufre, para luego llevarlas a un aforo de 500 mL en un vaso precipitado. Luego se emplea el mismo sistema de compresores de acuario para airear el vaso con un caudal de 1,96 L/min, manteniendo la temperatura del sistema a 31°C. Al momento de tomar una muestra se mide el oxígeno disuelto. Luego, siguiendo el procedimiento propuesto en Standard Methods for the examination of Waters and Wastewaters (American Public Health Association, 2019), se mide la concentración de sulfatos a lo largo de tiempo de manera de determinar si ocurre la oxidación del azufre producto del oxígeno inyectado al sistema.

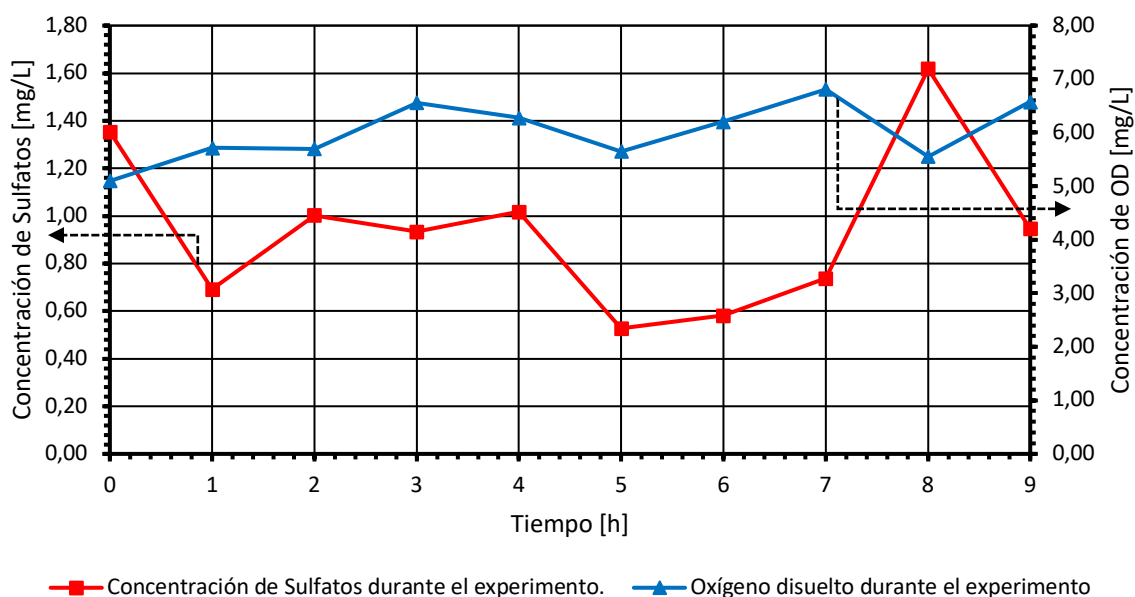


Figura 4-9 Experimento de Aeración de Pastillas de Azufre.

Como se puede apreciar en la Figura 4-9, no hay indicios de aumento en la concentración de sulfatos a lo largo del tiempo, por ende, se descarta esta interacción y se valida que la generación de sulfatos es solamente producto de la desnitrificación.

4.2.2 Ensayos de Nitrificación

Para determinar la cinética de los microorganismos nitrificantes se realizaron 4 bio-ensayos de nitrificación a diferentes concentraciones iniciales. Para realizar los experimentos, se toma un volumen de 60 mL del reactor que se aforan en un vaso precipitado de 600 mL. Luego se ingresa una cantidad de amonio conocida y comienza el experimento. Durante el barrido, los reactores muestrales se mantienen a la temperatura de operación del sistema SND-SBR original de 31°C y con un flujo constante de 1,96 L/min de aire. De las muestras que se retiran, se miden las concentraciones de todos los compuestos nitrogenados: Amonio, Nitrito y Nitrato, y además la concentración de oxígeno disuelto a distintos tiempos.

Previo a sacar el volumen de 60 mL (que contiene la biomasa), se realiza la cuantificación de SSV que hay en el reactor, de manera que conociendo la dilución (homogénea), es posible calcular la cantidad de microorganismos al comienzo de cada experimento, la cual será la misma en todos.

Para determinar qué fracción de la biomasa corresponde a microorganismos amonio-oxidantes y qué fracción a los microorganismos nitrito-oxidantes, se aproxima la siguiente ecuación (Metcalf y Eddy, 2014) que proviene del balance de masa del sustrato y de la biomasa para un reactor de mezcla completa.

$$X_{AOB} = \frac{Q \cdot Y_{AOB} \cdot N_{OX} \cdot SRT}{V[1 + b_{AOB} \cdot (SRT)]}$$

En donde:

X_{AOB} = Concentración de microorganismos BAO.

Y_{AOB} = Rendimiento [g de biomasa/g N-NH₄⁺]. Obtenido de Wiesmann (1994).

b_{AOB} = Decaimiento endógeno. Obtenido de Metcalf y Eddy (2014).

N_{OX} = La concentración de nitrógeno amoniacal oxidado.

SRT = Tiempo de retención de sólidos.

V = Volumen del reactor.

Q = Tasa de flujo diaria promedio que ingresa al reactor.

La naturaleza de la operación del sistema SND-SBR implica grandes tiempos de retención de sólidos debido al lento crecimiento de la biomasa y a la buena sedimentabilidad del lodo. Por lo tanto, la expresión se puede simplificar a la siguiente ecuación:

$$X_{AOB} \approx \frac{Q \cdot Y_{AOB} \cdot N_{OX}}{V \cdot b_{AOB}}$$

La ecuación también aplica para los microorganismos nitrito-oxidantes. Reemplazando los valores (respectivos a BAO y BNO), se tiene los siguientes valores de concentración: $X_{AOB} = 1,04$ g/L y $X_{NOB} = 0,30$ g/L. Conociendo la concentración total de microorganismos, es posible determinar la concentración de microorganismos desnitrificantes, $X_{DN} = 0,66$ g/L.

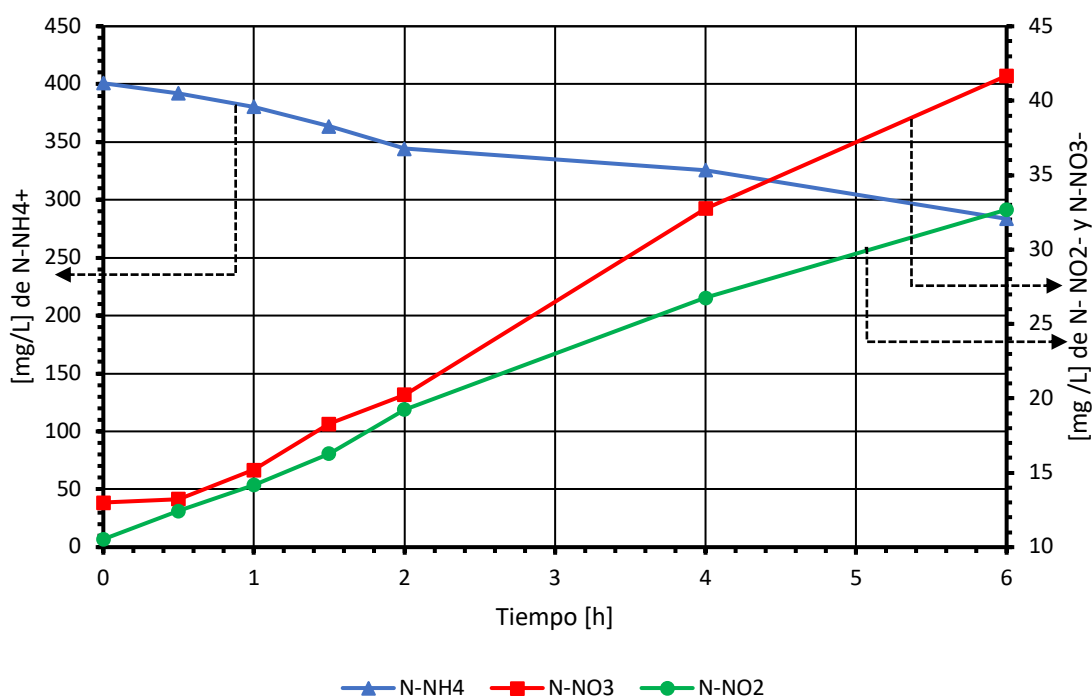


Figura 4-10 Experimento de Nitrificación n°1 Concentración de Amonio Inicial Alta.

Los cuatro experimentos de nitrificación se llevaron a cabo con concentraciones iniciales de amonio distintas. Un barrido se realizó a una concentración de amonio alta de 400,8 mg/L de $N-NH_4^+$ (Figura 4-9), otro a una concentración de amonio baja de 11,1 mg/L de $N-NH_4^+$ (Figura 4-10) y los otros dos bio-experimentos se realizaron a concentraciones medias similares a las de Beristain (2013) de 50,0 y 53,9 mg/L de $N-NH_4^+$ (Figura 4-11 y Figura 4-12, respectivamente).

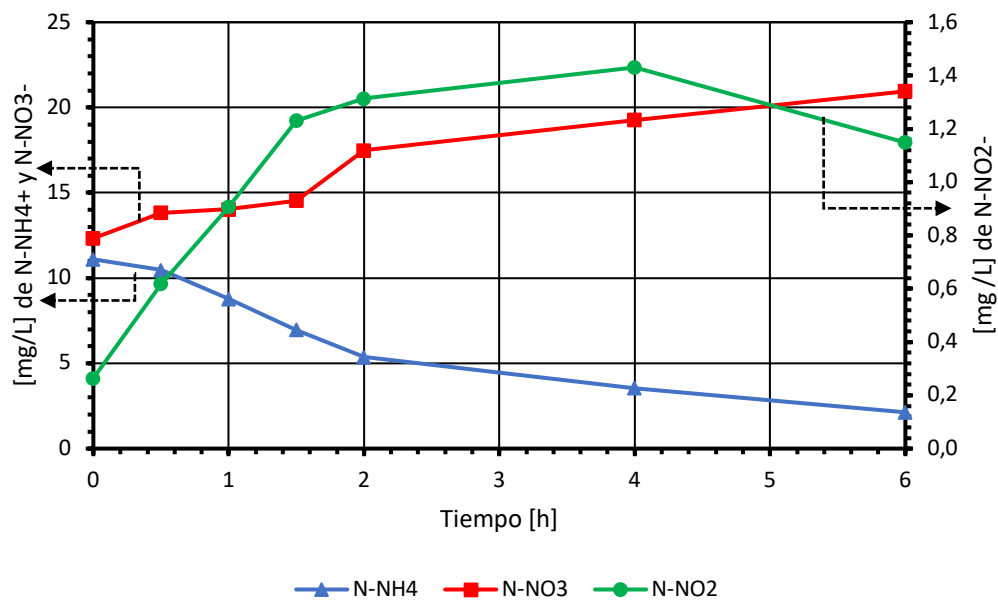


Figura 4-11 Experimento de Nitrificación n°2. Concentración de Amonio Inicial Baja.

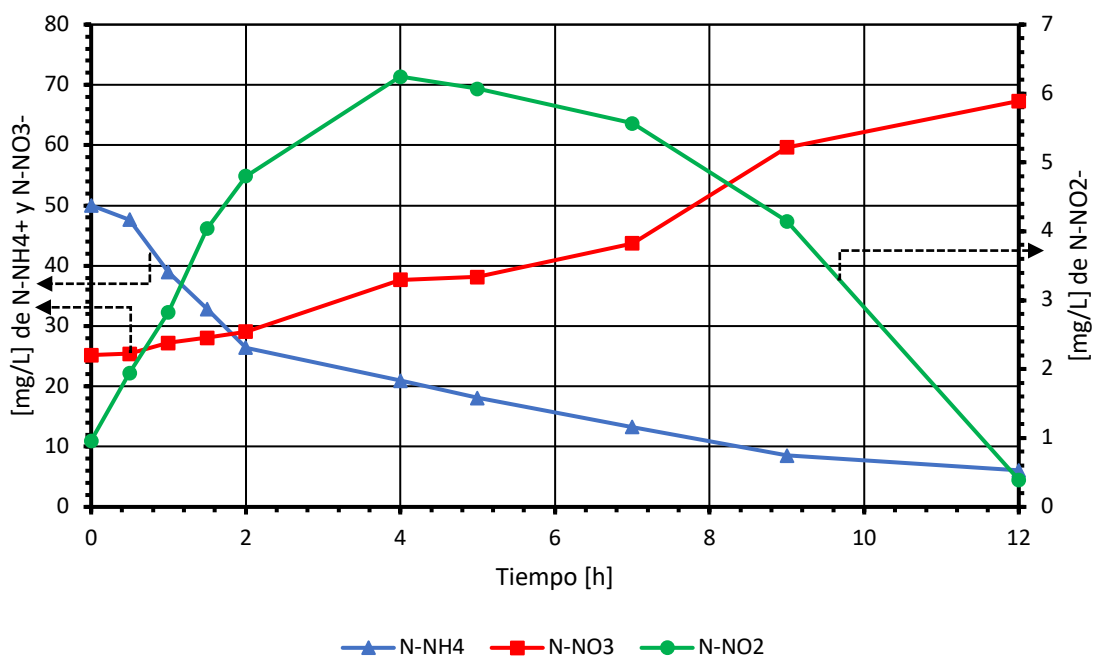


Figura 4-12 Experimento de Nitrificación n°3. Concentración de Amonio Inicial Media.

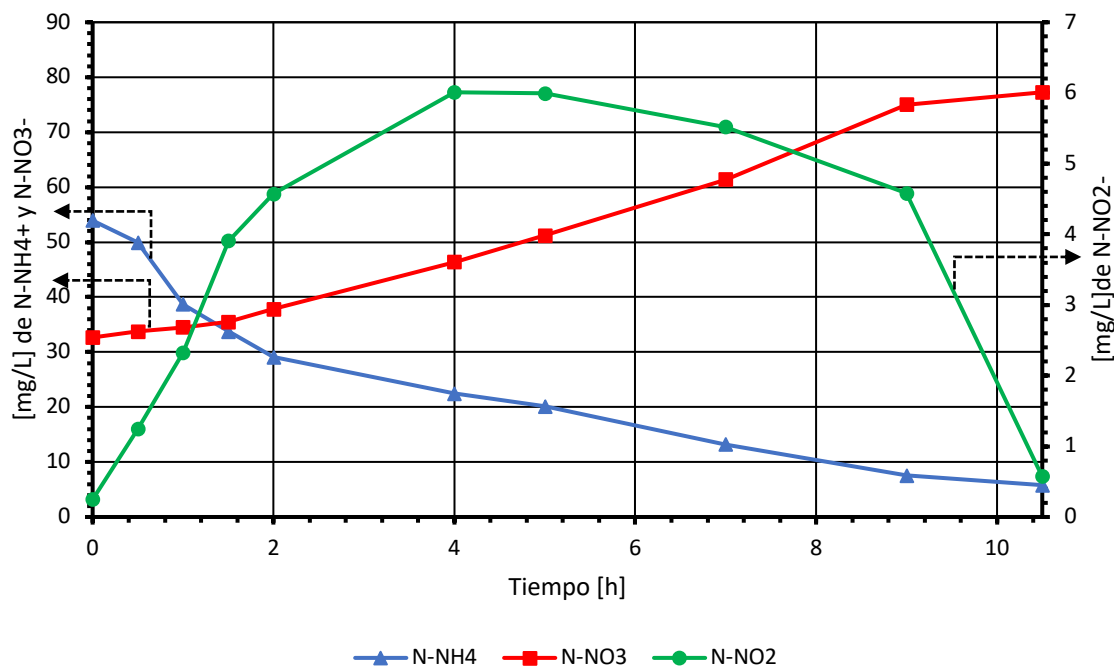


Figura 4-13 Experimento de Nitrificación n°4. Concentración de Amonio Inicial Media.

De los bio-ensayos, es posible observar como el amonio se va consumiendo y en un comienzo la concentración de nitrato se mantiene estable y la de nitrito sube. Ese fenómeno se explica por la actividad de las bacterias BAO que oxidan el amonio a nitrito. Luego, cercano a las dos horas desde que comenzó el experimento, empieza a aumentar la concentración de nitrato y a estabilizarse la de nitrito. Para los bio-ensayos tres y cuatro (de media concentración inicial de amonio) sucede que entre las 4 y 5 horas de experimento se alcanza un máximo de concentración de nitrito. Es en este período donde las bacterias BNO oxidan el nitrito en nitrato a una tasa mayor a la que las BAO oxidan amonio a nitrito y, por ende, el nitrito comienza a desaparecer. Cabe destacar que, en el barrido de baja concentración inicial de amonio, este fenómeno sucede antes debido a que hay menos amonio que se pueda oxidar a nitrito, entonces el máximo se alcanza prematuramente. Caso contrario ocurre en el barrido con alta concentración de amonio, donde la alta disponibilidad de este retrasa el tiempo en que se logra una máxima acumulación de nitrito.

En ambos experimentos 3 y 4 (a concentración media), es posible notar un comportamiento parecido con una nitrificación genérica no inhibida (Figura 2-6), asimismo, para el barrido a alta concentración tampoco hubo inhibición durante el experimento, por ende, es predecible que la constante de inhibición para la nitrificación modelada según la cinética de Haldane

sea grande, ya que los microorganismos nitrificantes del reactor tienen tolerancia a altas concentraciones.

4.2.3 Modelación Microorganismos Nitrificantes.

Para la modelación de la cinética de los microorganismos, es necesario simular la cinética, para ello se utilizará el método numérico de Runge-Kutta de cuarto orden con un paso de integración de 0,5/1000 [día].

En un principio se trató de hacer la simulación con el software de MatLab, pero no fue posible ya que las funciones integradas del software trabajan bajo el caso de ajustar un modelo para distintos experimentos con repeticiones, donde los experimentos tienen la misma escala y valores de tiempo en los cuales se tomaron muestras (en otras palabras, no existe una función en MatLab asociada al ajuste de un modelo de ecuación diferencial a un set de datos con distintos experimento e iguales tiempos). Solo era posible ajustar un modelo a cada experimento individualmente, lo cual no refleja la realidad de la experiencia, donde es necesario encontrar un set de parámetros globales que representen lo que sucede en la realidad. La programación de un código especializado escapa a las competencias necesarias para la realización del trabajo de investigación.

Por lo tanto, la simulación será contrastada con los datos experimentales, y luego mediante la herramienta de Excel, Solver, se ajustarán los parámetros mediante la técnica de análisis numérico de optimización matemática de mínimos cuadrados, donde los errores se tratarán de forma porcentual con respecto al valor experimental, de esa manera no hay diferencias al momento de evaluar el modelo para los cuatro experimentos distintos (Jorquera y Gelmi, 2018).

Para aplicar un modelo, primero es necesario establecer los balances de materia y los supuestos que se consideran para llevar a cabo la modelación. Los supuestos son:

- Durante los experimentos de barrido llevados a cabo, la biomasa está completamente mezclada y su distribución es uniforme en todo el volumen.
- Cuando el microorganismo lleva a cabo sus procesos metabólicos y catabólicos, solo se considera crecimiento y se descarta el agotamiento de la biomasa, es decir, el coeficiente de decaimiento endógeno es cero ($b \approx 0$; $\mu \gg b$).

- Debido a que el crecimiento de biomasa es casi imperceptible por los equipos de laboratorio, los rendimientos van a ser valores conocidos y calculados de acuerdo con las Ecuaciones 2-2 y 2-4. De lo cual se obtiene: $Y_{BAOB/NH_4^+} = 0,15$; $Y_{BAOB/NO_2^+} = 0,047$.
- Durante la realización de los experimentos de nitrificación, los mini-reactores se mantuvieron aireados de manera que la disponibilidad de oxígeno fue la máxima posible, además, Weismann (1994) detalló que para organismos nitrificantes $K'_{AOB} = 0,3 \text{ mg/L}$; $K'_{NOB} = 1,1 \text{ mg/L}$, por ende: $\frac{C_r}{K' + C_r} \approx 1$.

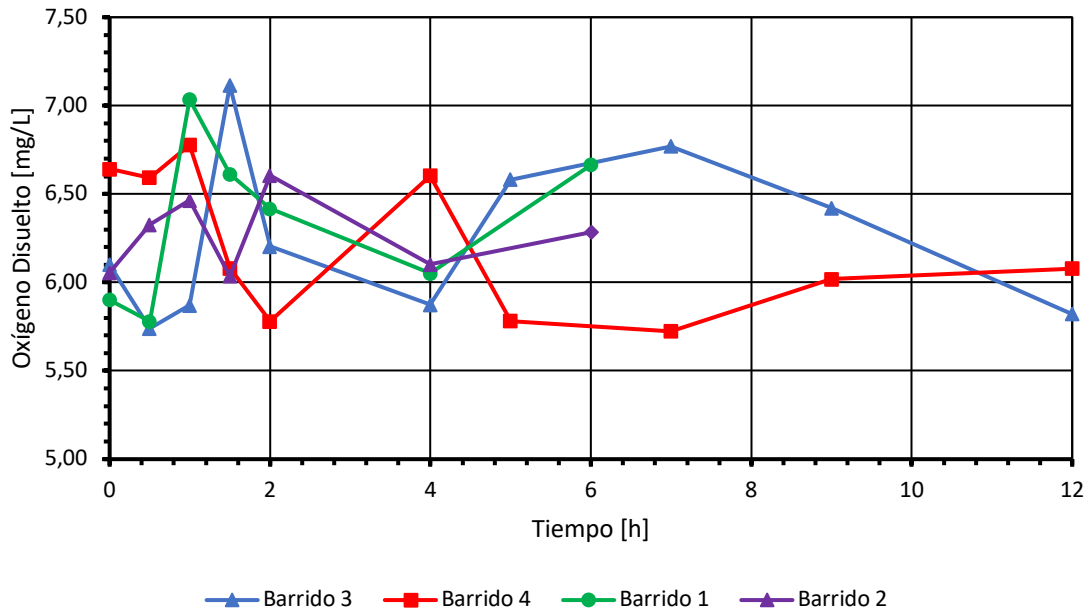


Figura 4-14 Oxígeno Disuelto en cada Barrido de Nitrificación en el tiempo

4.2.3.1 Cinética Microorganismos BAO.

En base a los experimentos de nitrificación realizados en laboratorio, se ajustaron modelos cinéticos para los microorganismos amonio oxidantes utilizando la técnica de análisis numérico de mínimos cuadrados, definiendo F_o como:

$$F_o = \sum_{i=1}^n (S_{i,experimental} - S_{i,modelado})^2$$

Ecuación 4-1

Donde i corresponde al punto experimental, el cual puede pertenecer a cualquiera de los cuatro experimentos. Los parámetros óptimos se obtienen al encontrar el mínimo valor posible para F_o (Jorquera y Gelmi, 2018).

4.2.3.1.1 Modelo de Haldane.

Una desventaja de los modelos típicos, como el de Monod, es que no tienen en cuenta la posibilidad de los efectos de inhibición del sustrato sobre la velocidad de crecimiento específica, concretamente cuando éste se encuentra en elevadas concentraciones, este caso se reproduce en el Barrido nº1. El sistema de ecuaciones queda definido como:

$$\begin{aligned}\frac{dC_{N-NH_4^+}}{dt} &= -\frac{\mu_{AOB}}{Y_{BAOB/NH_4^+}} \cdot X \\ \frac{dX}{dt} &= \mu_{AOB} X \\ \mu_{AOB} &= \mu_{max} \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_s + C_{N-NH_4^+} + \frac{C_{N-NH_4^+}^2}{K_i}} \cdot \frac{C'}{K'_{AOB} + C'}\end{aligned}$$

Teniendo en cuenta que Y_{BAOB/NH_4^+} es conocido y el sistema se encuentra saturado en oxígeno, es decir, el término que corresponde a la disponibilidad de oxígeno se puede despreciar, se obtiene:

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{\mu_{max}}{0,15} \cdot \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_s + C_{N-NH_4^+} + \frac{C_{N-NH_4^+}^2}{K_i}} \cdot X$$

Ecuación 4-2

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_s + C_{N-NH_4^+} + \frac{C_{N-NH_4^+}^2}{K_i}} \cdot X$$

Ecuación 4-3

Una vez establecidas las ecuaciones diferenciales, se ingresan valores iniciales para los parámetros μ_{max} ; K_s ; K_i y se realiza la simulación mediante el método numérico Runge-Kutta. Luego se ajustan los parámetros de manera de minimizar la función objetivo (F_o) que corresponde a la suma de los errores cuadrados. Con ello se obtienen los siguientes valores: $\mu_{max} = 0,807 d^{-1}$; $K_s = 76,27 mg/L$; $K_i = 18177,30 mg/L$; $F_o = 518,48$.

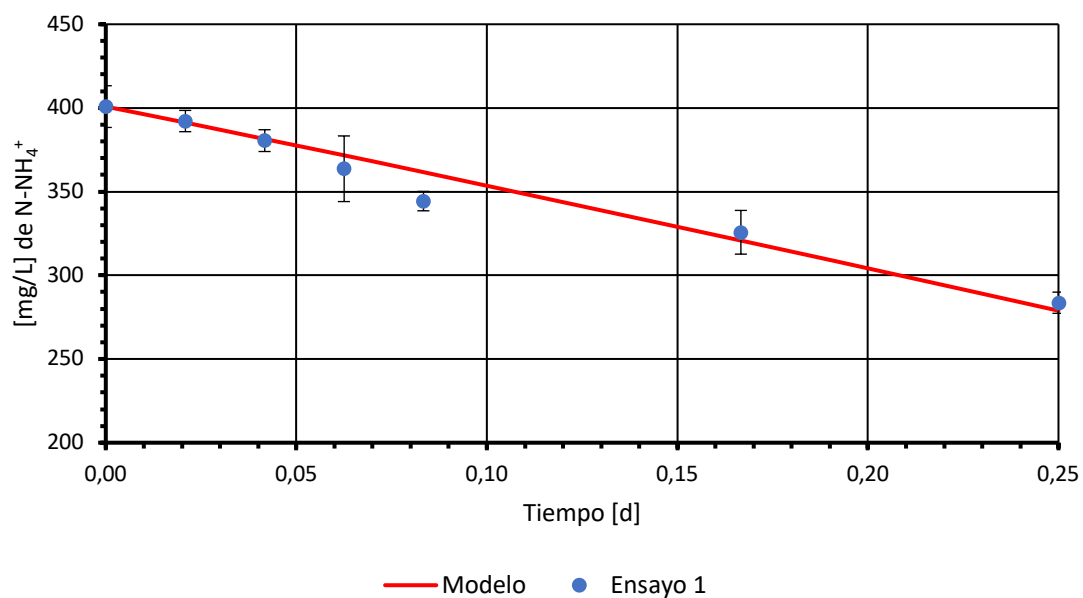


Figura 4-15 Ajuste del modelo de Haldane BAO respecto al Experimento n° 1.

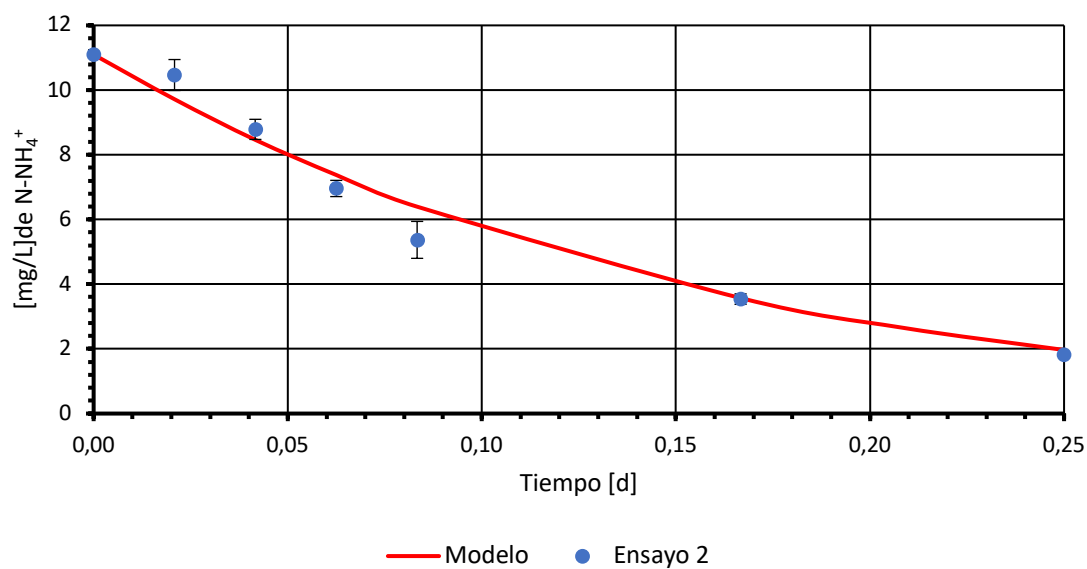


Figura 4-16 Ajuste del modelo de Haldane BAO respecto al Experimento n° 2.

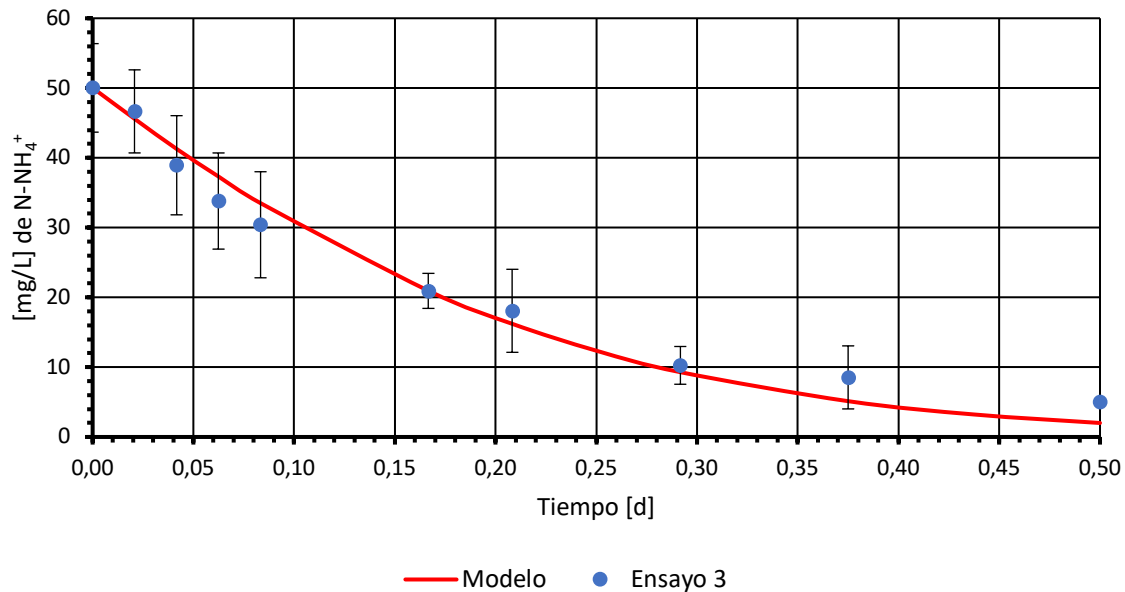


Figura 4-17 Ajuste del modelo de Haldane BAO respecto al Experimento n° 3.

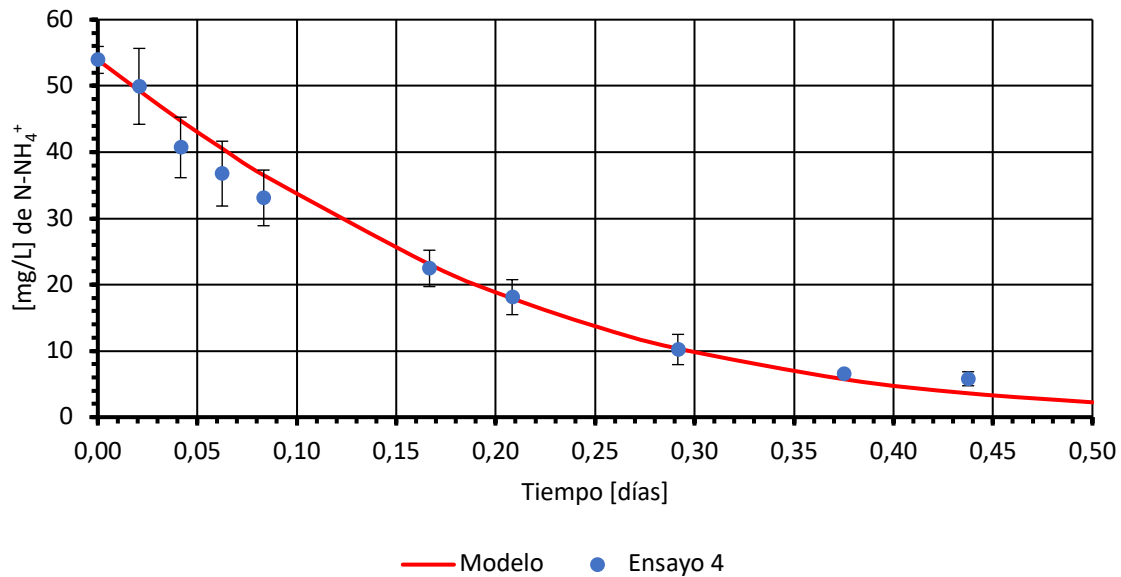


Figura 4-18 Ajuste del modelo de Haldane BAO respecto al Experimento n° 4.

El valor de K_i es muy alto, lo cual tiene relación con los experimentos puesto que no existe inhibición en ningún momento en ninguno de los experimentos. Es probable que el modelo de tipo Monod tenga un mejor ajuste que de Haldane para los microorganismos BAO.

4.2.3.1.2 Modelo de Monod.

Este modelo se aplica debido a su facilidad de ajuste con los datos experimentales para cultivos de bacterias. Sin embargo, el mismo Monod explica que cualquier curva sigmoideal

puede ajustarse correctamente a los datos experimentales. El sistema de ecuaciones queda definido como:

$$\begin{aligned}\frac{dC_{N-NH_4^+}}{dt} &= -\frac{\mu_{AOB}}{Y_{BAOB/NH_4^+}} \cdot X \\ \frac{dX}{dt} &= \mu_{AOB} X \\ \mu_{AOB} &= \mu_{max} \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_s + C_{N-NH_4^+}} \cdot \frac{C'}{K'_{AOB} + C'}\end{aligned}$$

Teniendo en cuenta que Y_{BAOB/NH_4^+} es conocido y el sistema se encuentra saturado en oxígeno, es decir, el término que corresponde a la disponibilidad de oxígeno se puede despreciar, se obtiene:

$$\frac{dC_{N-NH_4^+}}{dt} = -\frac{\mu_{max}}{0,15} \cdot \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_s + C_{N-NH_4^+}} \cdot X$$

Ecuación 4-4

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_s + C_{N-NH_4^+}} \cdot X$$

Ecuación 4-5

Al igual que para el modelo anterior, se ingresan valores iniciales para los parámetros μ_{max} ; K_s ; K_i y se realiza la simulación mediante el método numérico Runge-Kutta. Luego se ajustan los parámetros de manera de minimizar la función objetivo (F_o) que corresponde a la suma de los errores cuadrados. Con ello se obtienen los siguientes valores: $\mu_{max} = 0,791 d^{-1}$; $K_s = 74,18 mg/L$; $F_o = 517,4$.

El hecho de que la cinética que mejor describa el comportamiento de los microorganismos BAO sea la cinética del tipo Monod se debe a que se suprime el efecto de inhibición por producto al utilizar un *buffer*, el cual regula la concentración de protones en el medio y por ende no permite fluctuaciones bruscas en el cambio de pH.

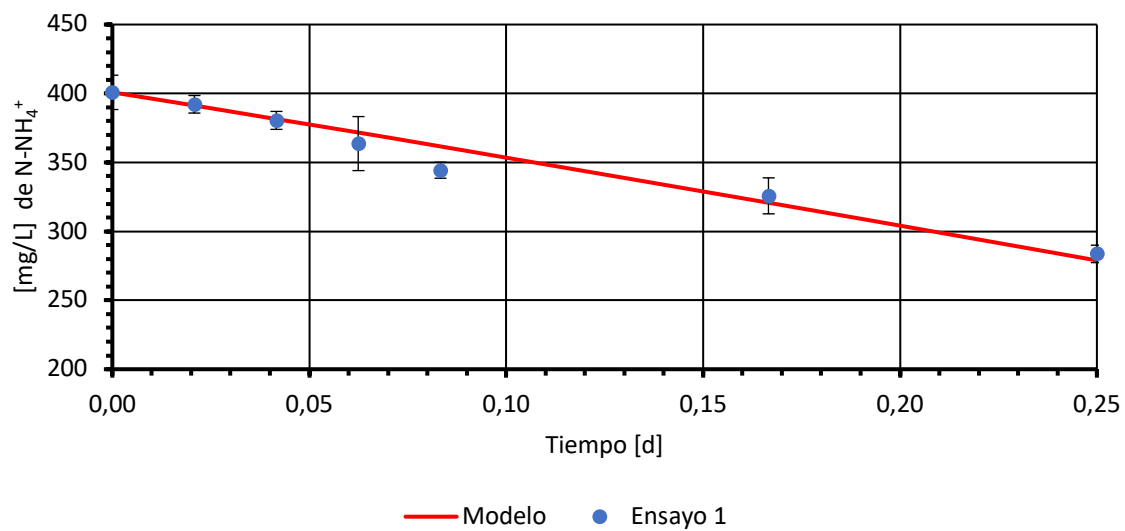


Figura 4-19 Ajuste del modelo de Monod BAO respecto al Experimento n°1.

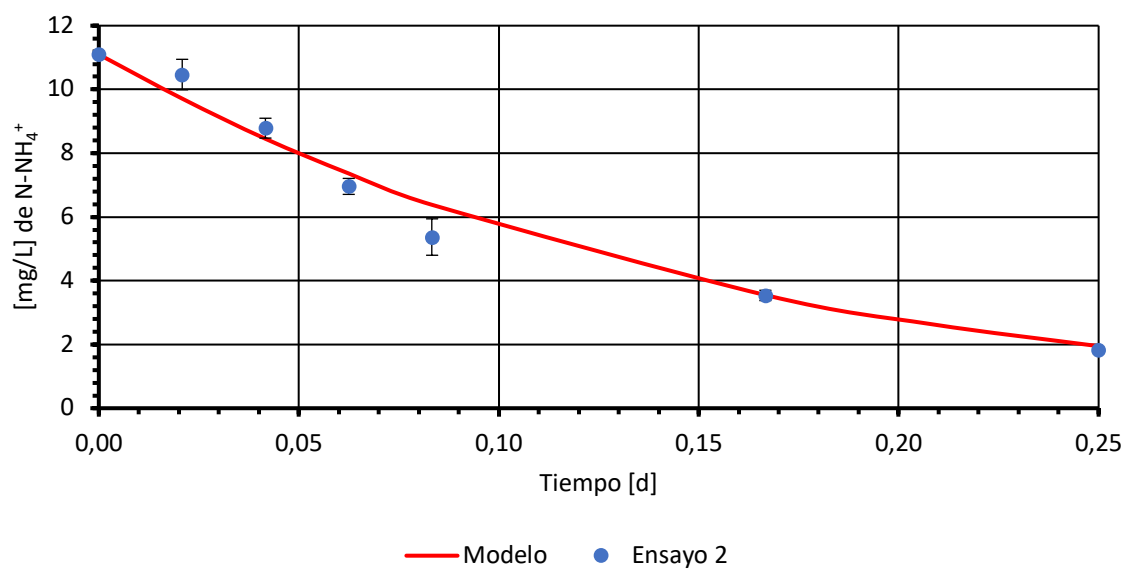


Figura 4-20 Ajuste del modelo de Monod BAO respecto al Experimento n°2.

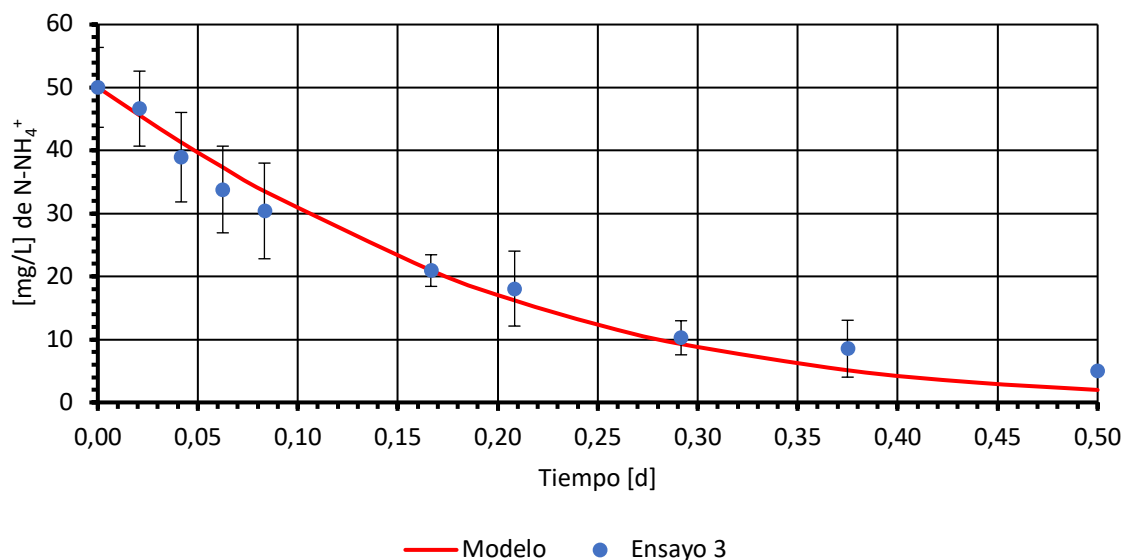


Figura 4-21 Ajuste del modelo de Monod BAO respecto al Experimento n°3.

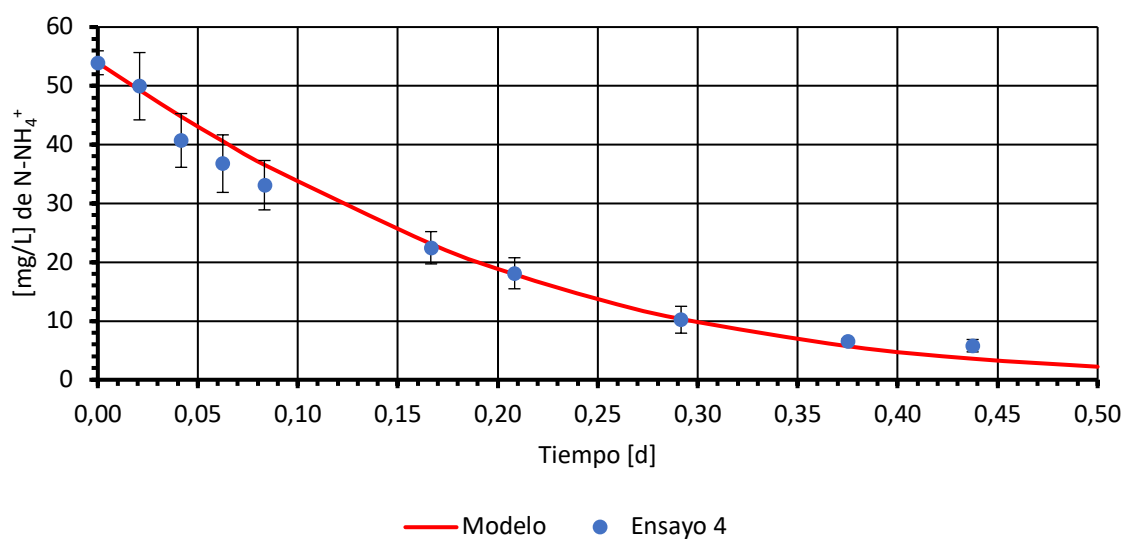


Figura 4-22 Ajuste del modelo de Monod BAO respecto al Experimento n°4.

La cinética descrita por la ecuación de Monod se ajusta mejor que la de Haldane para los microorganismos amonio-oxidantes, ya que no solo la función objetivo es menor en el caso de Monod, sino que también el ajuste se realiza con un parámetro menos. Esto se debe a que existen más grados de libertad cuando se utilizan menos parámetros. Por lo tanto, la cinética que representa de mejor manera los microorganismos que llevan a cabo la oxidación de amonio es la de Monod.

4.2.3.2 Cinética Microorganismos BNO.

En base a los experimentos de nitrificación realizados en laboratorio, se ajustaron modelos cinéticos para los microorganismos nitrito oxidantes utilizando la técnica de análisis numérico de mínimos cuadrados, pero a diferencia de la función definida para ajustar modelos en la cinética de los microorganismos amonio oxidantes, se definió F_o como:

$$F_o = \sum_{i=1}^n \left(\frac{S_{i,experimental} - S_{i,modelado}}{S_{i,experimental}} \right)^2$$

Ecuación 4-6

Donde i corresponde al punto experimental, el cual puede pertenecer a cualquiera de los cuatro experimentos. El término que se agrega como denominador sirve para escalar el error del modelo y así, convertir el error absoluto en error porcentual. Esto último debido a que el primer barrido alcanza valores de concentración de nitrito hasta cinco veces mayores que la del resto de los experimentos (debido a que la concentración de amonio inicial es alta). Si la función no tenía como argumento el error porcentual, los ajustes se centraban en el primer barrido, lo que tenía como consecuencia un mal ajuste en los otros tres experimentos. Finalmente, los parámetros óptimos se obtienen al encontrar el mínimo valor posible para F_o .

4.2.3.2.1 Modelo de Haldane

El modelo debe representar la variación de concentración de nitrito producto de la actividad de los microorganismos BAO y BNO, mientras unos generan nitrito, los otros lo consumen.

$$\begin{aligned} \frac{dC_{NO_2^-}}{dt} &= \text{producción de } NO_2^- - \text{consumo de } NO_2^- \\ \frac{dC_{NO_2^-}}{dt} &= \frac{\mu_{AOB}}{Y_{BAOB/NH_4^+}} \cdot X_{AOB} - \frac{\mu_{NOB}}{Y_{BNOB/NO_2^-}} \cdot X_{NOB} \\ \frac{dX_{NOB}}{dt} &= \mu_{NOB} X_{NOB} \\ \mu_{AOB} &= \mu_{max\ AOB} \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_{SAOB} + C_{N-NH_4^+} + \frac{C_{N-NH_4^+}^2}{K_{iAOB}}} \cdot \frac{C'}{K'_{AOB} + C'} \\ \mu_{NOB} &= \mu_{max\ NOB} \frac{C_{N-NO_2^-}}{K_{SNOB} + C_{N-NO_2^-} + \frac{C_{N-NO_2^-}^2}{K_{iNOB}}} \cdot \frac{C'}{K'_{NOB} + C'} \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta que tanto Y_{BAOB/NH_4^+} como Y_{BAOB/NO_2^-} es conocido y el sistema se encuentra saturado en oxígeno, es decir, el término que corresponde a la disponibilidad de oxígeno se puede despreciar, se obtiene:

$$\frac{dC_{NO_2^-}}{dt} = \frac{\mu_{max\ AOB}}{Y_{BAOB/NH_4^+}} \cdot \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_{sAOB} + C_{N-NH_4^+} + \frac{C_{N-NH_4^+}^2}{K_{iAOB}}} \cdot X_{AOB} - \frac{\mu_{max\ NOB}}{Y_{BNOB/NO_2^-}} \cdot \frac{C_{N-NO_2^-}}{K_{sNOB} + C_{N-NO_2^-} + \frac{C_{N-NO_2^-}^2}{K_{iNOB}}} \cdot X_{NOB}$$

Ecuación 4-7

$$\frac{dX_{NOB}}{dt} = \mu_{max\ NOB} \frac{C_{N-NO_2^-}}{K_{sNOB} + C_{N-NO_2^-} + \frac{C_{N-NO_2^-}^2}{K_{iNOB}}} \cdot X_{NOB}$$

Ecuación 4-8

Una vez establecidas las ecuaciones diferenciales, se ingresan valores iniciales para los parámetros $\mu_{max\ NOB}$; K_{sNOB} ; K_{iNOB} y se realiza la simulación mediante el método numérico Runge-Kutta. Luego se ajustan los parámetros de manera de minimizar la función objetivo (F_o). Con ello se obtienen los siguientes valores: $\mu_{max\ NOB} = 0,822\ d^{-1}$; $K_{sNOB} = 86,06\ mg/L$; $K_{iNOB} = 1,77\ mg/L$; $F_o = 0,127$.

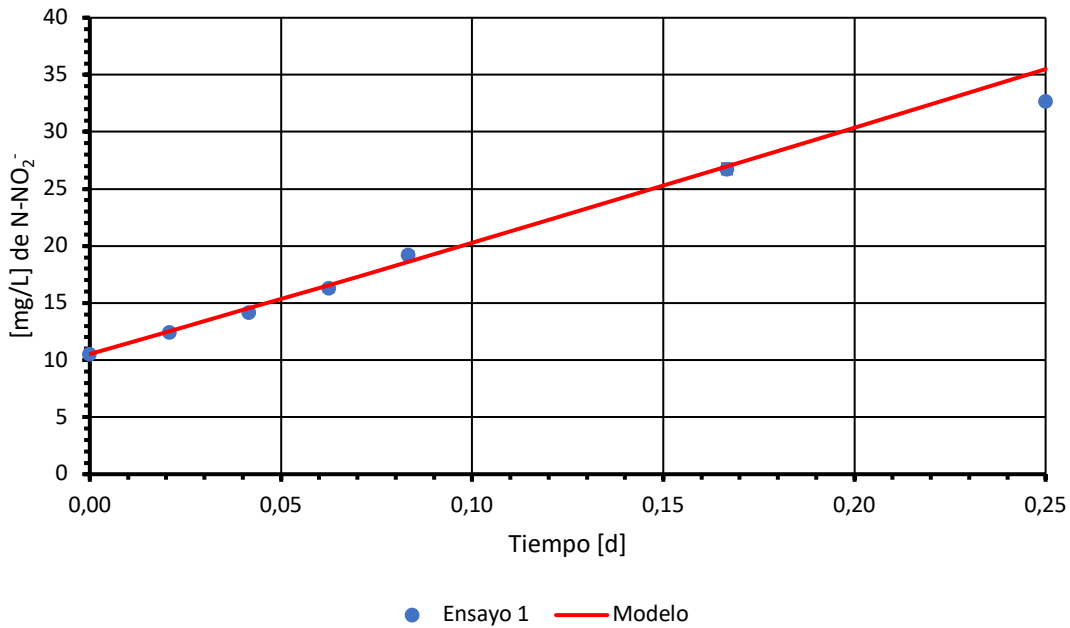


Figura 4-23 Ajuste del modelo de Haldane BNO respecto al Experimento n°1.

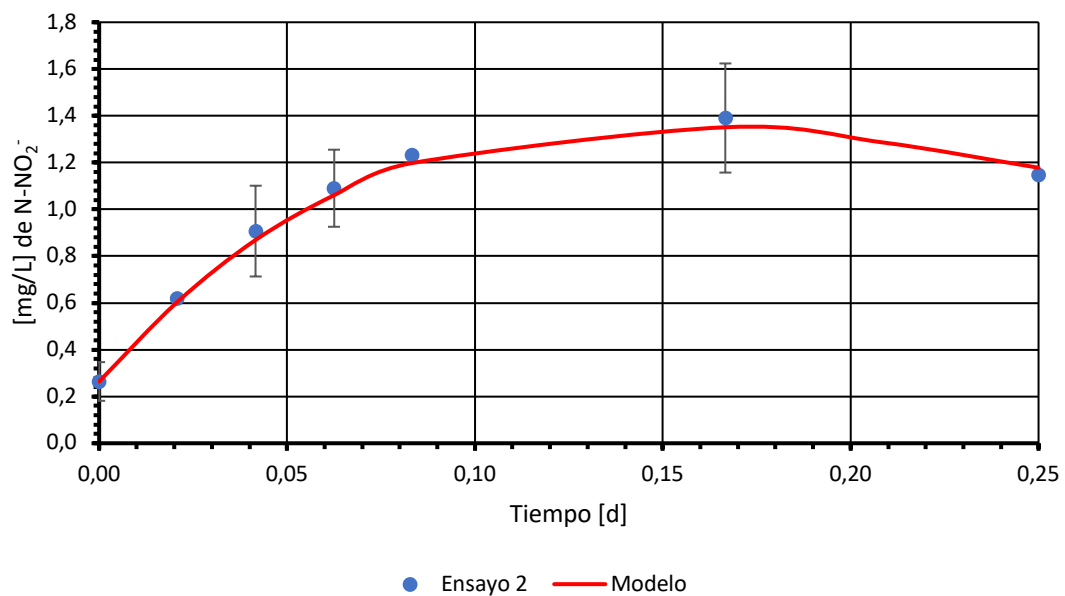


Figura 4-24 Ajuste del modelo de Haldane BNO respecto al Experimento n°2.

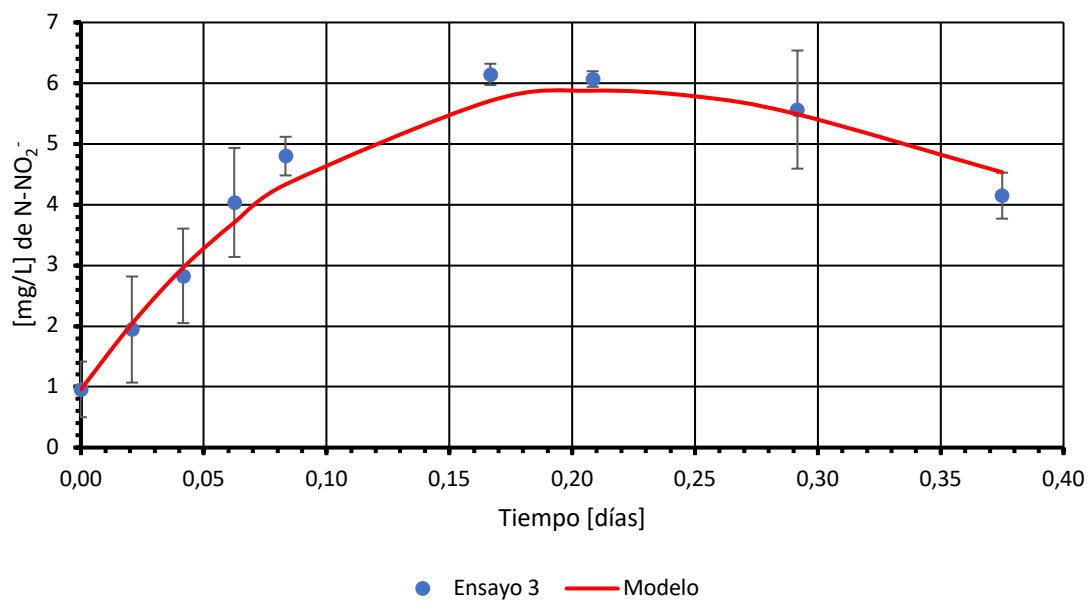


Figura 4-25 Ajuste del modelo de Haldane BNO respecto al Experimento n°3.

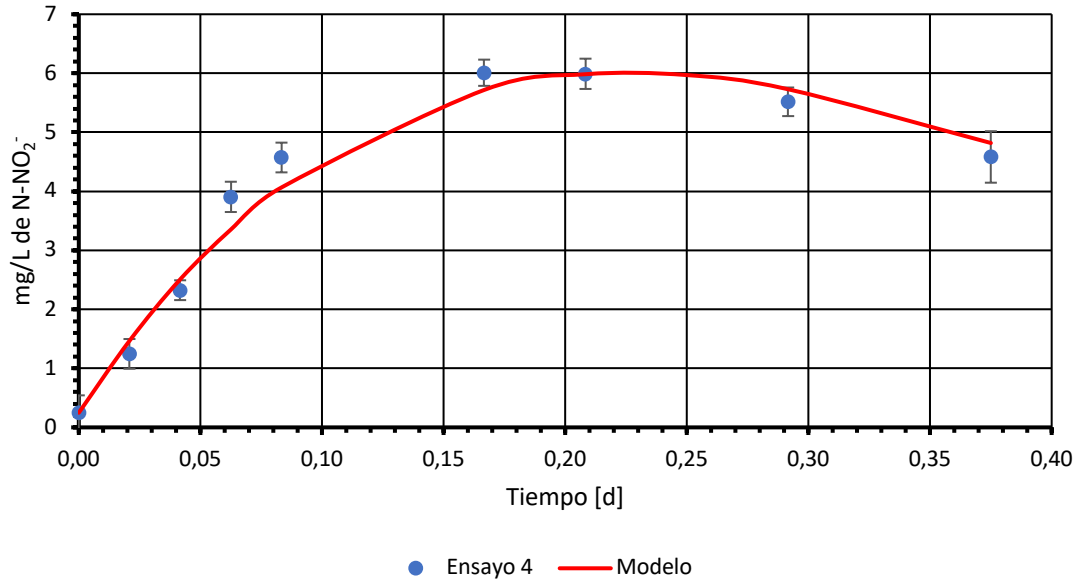


Figura 4-26 Ajuste del modelo de Haldane BNO respecto al Experimento n°4.

Se puede apreciar que el ajuste describe el fenómeno experimental. Además, la constante de inhibición K_{iNOB} tiene un valor mucho menor que la constante de sustrato K_{SNOB} , esto significa que, para concentraciones pequeñas de nitrito, la actividad de los microorganismos nitrito oxidantes se detiene debido a la poca disponibilidad del sustrato. Luego, una vez que la acumulación de nitrito vuelve a niveles aptos producto de la oxidación del amonio, el metabolismo de los microorganismos BNO vuelve a la normalidad.

4.2.3.2.2 Modelo de Monod

Al igual que con el modelo de Haldane, la cinética de Monod debe representar la variación de concentración de nitrito producto de la actividad de los microorganismos BAO y BNO.

$$\frac{dC_{NO_2^-}}{dt} = \text{producción de } NO_2^- - \text{consumo de } NO_2^-$$

$$\frac{dC_{NO_2^-}}{dt} = \frac{\mu_{AOB}}{Y_{BAOB/NH_4^+}} \cdot X_{AOB} - \frac{\mu_{NOB}}{Y_{BNOB/NO_2^-}} \cdot X_{NOB}$$

$$\frac{dX_{NOB}}{dt} = \mu_{NOB} X_{NOB}$$

$$\mu_{AOB} = \mu_{max\ AOB} \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_{SAOB} + C_{N-NH_4^+}} \cdot \frac{C'}{K'_{AOB} + C'}$$

$$\mu_{NOB} = \mu_{max\ NOB} \frac{C_{N-NO_2^-}}{K_{SNOB} + C_{N-NO_2^-}} \cdot \frac{C'}{K'_{NOB} + C'}$$

Teniendo en cuenta que tanto Y_{BAOB/NH_4^+} como Y_{BAOB/NO_2^-} es conocido y el sistema se encuentra saturado en oxígeno, es decir, el término que corresponde a la disponibilidad de oxígeno se puede despreciar, se obtiene:

$$\frac{dC_{NO_2^-}}{dt} = \frac{\mu_{max AOB}}{Y_{BAOB/NH_4^+}} \cdot \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_{sAOB} + C_{N-NH_4^+}} \cdot X_{AOB} - \frac{\mu_{max NOB}}{Y_{BAOB/NO_2^-}} \cdot \frac{C_{N-NO_2^-}}{K_{sNOB} + C_{N-NO_2^-}} \cdot X_{NOB}$$

Ecuación 4-9

$$\frac{dX_{NOB}}{dt} = \mu_{max NOB} \frac{C_{N-NO_2^-}}{K_{sNOB} + C_{N-NO_2^-}} \cdot X_{NOB}$$

Ecuación 4-10

Una vez establecidas las ecuaciones diferenciales, se ingresan valores iniciales para los parámetros $\mu_{max NOB}$; K_{sNOB} ; K_{iNOB} y se realiza la simulación mediante el método numérico Runge-Kutta. Luego se ajustan los parámetros de manera de minimizar la función objetivo (F_o). Con ello se obtienen los siguientes valores: $\mu_{max NOB} = 0,116 d^{-1}$; $K_{sNOB} = 8,87 mg/L$; $F_o = 0,274$.

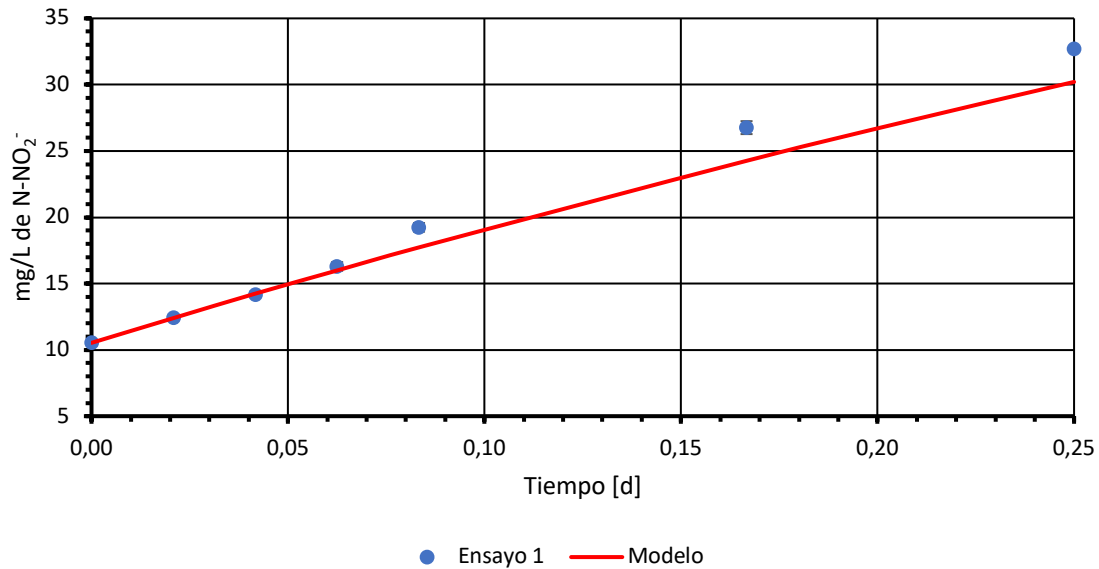


Figura 4-27 Ajuste del modelo de Monod BNO respecto al Experimento n°1.

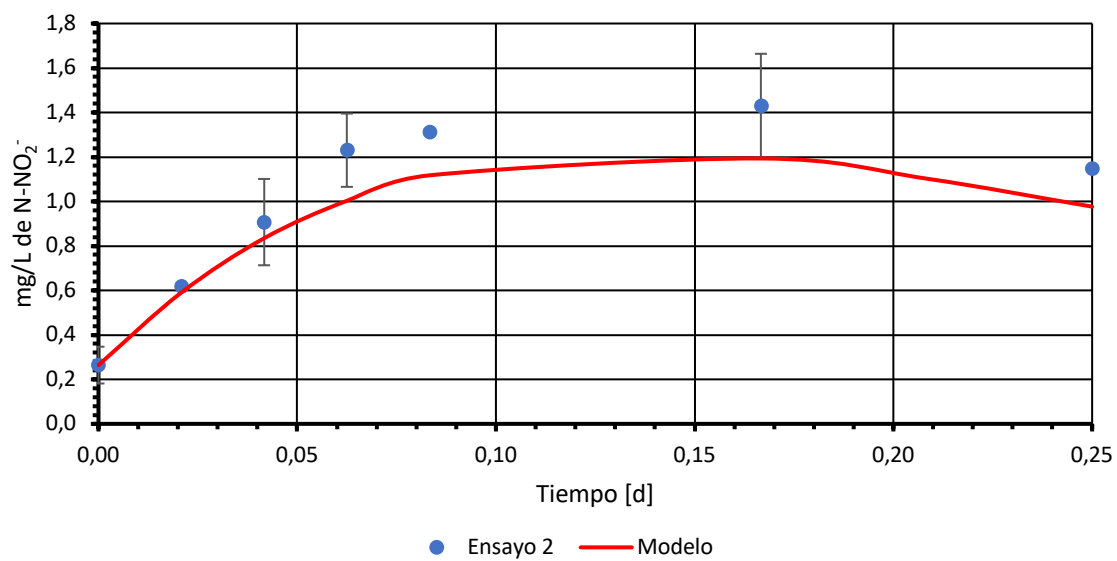


Figura 4-28 Ajuste del modelo de Monod BNO respecto al Experimento n°2.

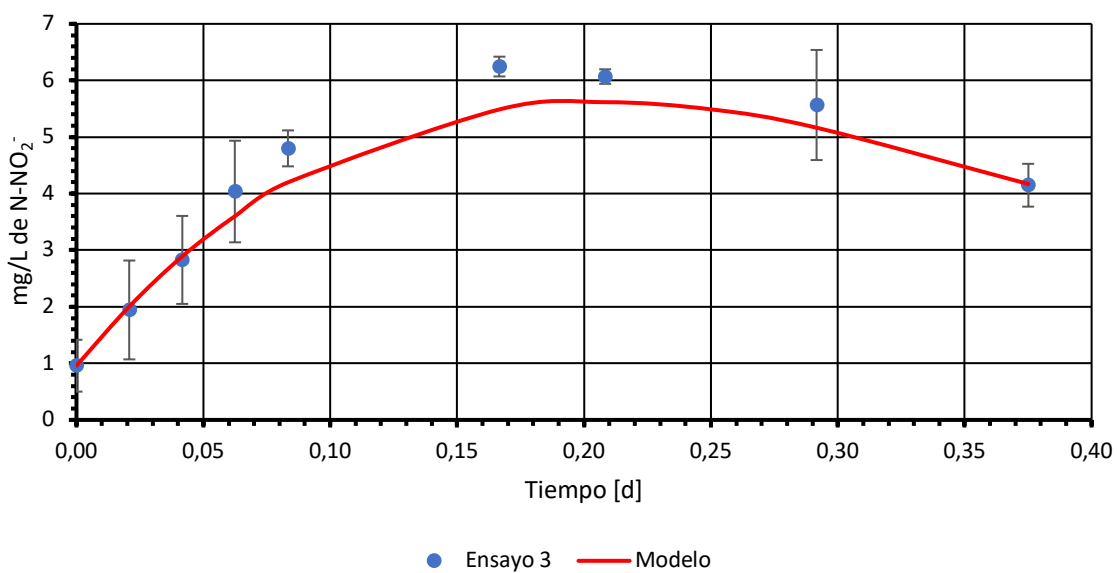


Figura 4-29 Ajuste del modelo de Monod BNO respecto al Experimento n°3.

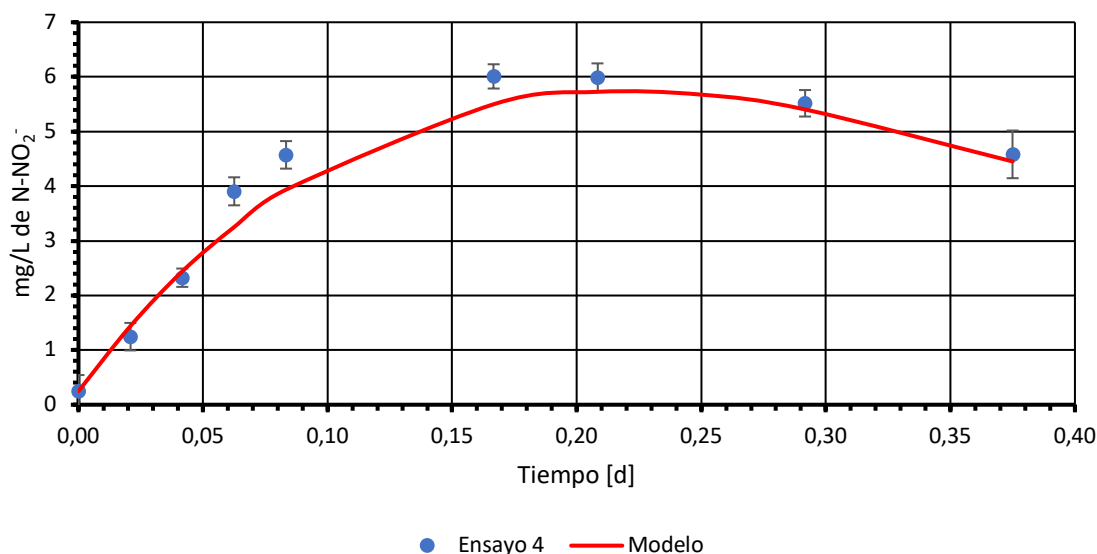


Figura 4-30 Ajuste del modelo de Monod BNO respecto al Experimento n°4.

Queda en evidencia que el ajuste del modelo cinético de Monod no es bueno. El error (proporcional) que se observa en el barrido n° 3 es considerable, además, los parámetros que se obtienen distan mucho de la literatura, en la cual se postulan valores para $\mu_{max\ NOB}$ siempre mayores a los de $\mu_{max\ AOB}$. Esto no sucede al ajustar el modelo de acuerdo con la cinética de Monod, pero sí al ajustarlo de acuerdo con la cinética de Haldane.

A continuación, se exponen los valores de coeficientes de determinación y coeficientes de determinación ajustado (o corregido) para los ajustes en base a los modelos seleccionados:

Tabla 4-3 Coeficientes de determinación (general y ajustado) de los modelos. Fuente: .

Tipo de microorganismo	Modelo cinético ajustado	n° de parámetros	Coeficiente de determinación	Coeficiente de determinación ajustado
BAO	Monod	2	0,999	0,999
BNO	Haldane	3	0,994	0,993

Bajo el complemento desde el punto de vista de los coeficientes de determinación, y en base a que los coeficientes de determinación generales son muy similares a los coeficientes de determinación ajustados para ambos casos es que se puede asegurar que no hay sobreparametrización en ninguno de los casos y los ajustes son robustos.

4.2.3.3 Análisis y Comparación de Parámetros de los Microorganismos Nitrificantes.

A continuación, se realiza una comparación de las velocidades máximas obtenidos mediante los mejores ajustes y los valores dispuestos en la literatura (Wiesmann, 1994).

Tabla 4-4 Comparación de Valores de Parámetros Ajustados v/s Valores de Parámetros según literatura.

Tipo de Microorganismo	Modelo Cinético Ajustado	Parámetro	Valores Según Ajuste	Valores de Literatura
BAO	Monod	$\mu_{max\ AOB}$	0,791 [d ⁻¹]	0,77 [d ⁻¹]
BNO	Haldane	$\mu_{max\ NOB}$	0,822 [d ⁻¹]	1,08 [d ⁻¹]

Como se puede apreciar, para el caso de los microorganismos BAO, los valores son muy similares, y para ambos tipos de microorganismos se obtienen valores del mismo orden de magnitud.

4.2.4 Ensayos de Desnitrificación

Se realizaron dos experimentos de desnitrificación, en los cuales se extrajo 50 mL de volumen del reactor SND-SBR para cada barrido, los cuales fueron diluidos a razón de 1:3 en vasos precipitados. Luego a cada vaso se le agrega una cantidad inicial de KNO₃, NH₄⁺ y NaHCO₃ en cantidad estequiométrica en función de la ecuación 2-5, 1 gramo de azufre elemental en forma de pastilla y K₂HPO₄/KH₂PO₄ (a modo de solución tampón). Los vasos se sellan para mantener el ambiente anóxico y se agitan a 70 r.p.m. Luego, al igual que para los experimentos de nitrificación, se toman muestras cada cierto tiempo. En este caso, se mide el pH de manera de mantenerlo controlado según las mismas condiciones de operación del sistema SND-SBR. Además, para cada muestra se mide la concentración de nitratos y sulfatos, de manera de evidenciar de forma empírica la relación de consumo y producción que hay entre estos dos compuestos.

Se puede observar que a medida que el nitrato se va consumiendo, va aumentando la concentración de sulfatos. El barrido de desnitrificación n°1 (Figura 4-30) se realizó con una concentración inicial de 430 mg/L de N-NO₃⁻, mientras que el barrido de desnitrificación n°2 (Figura 4-31) se realizó con una concentración inicial de 189 mg/L de N-NO₃⁻.

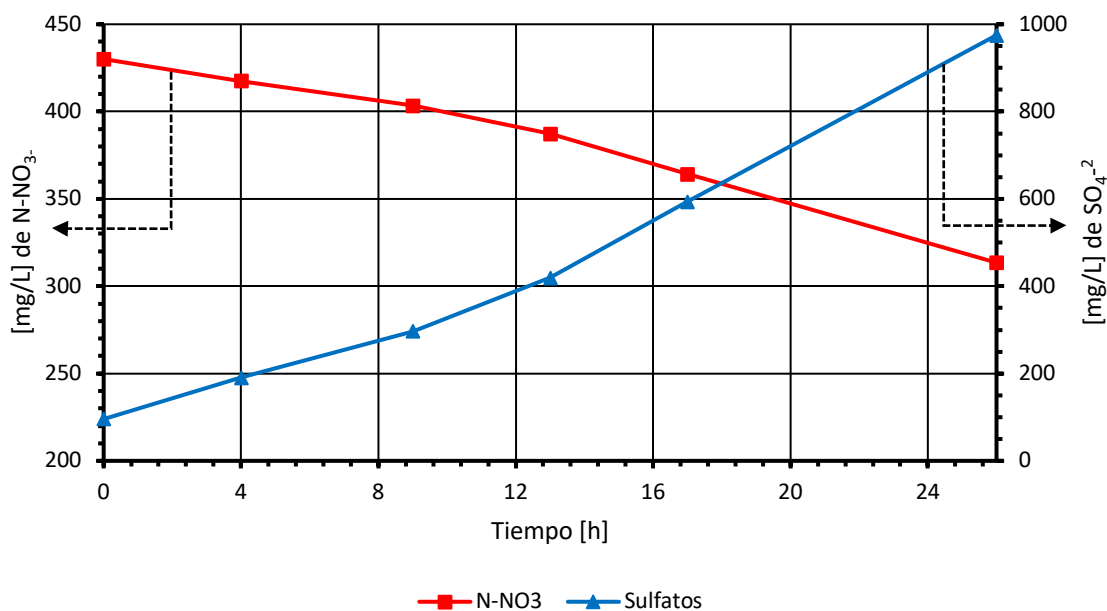


Figura 4-31 Experimento de Desnitrificación n°1.

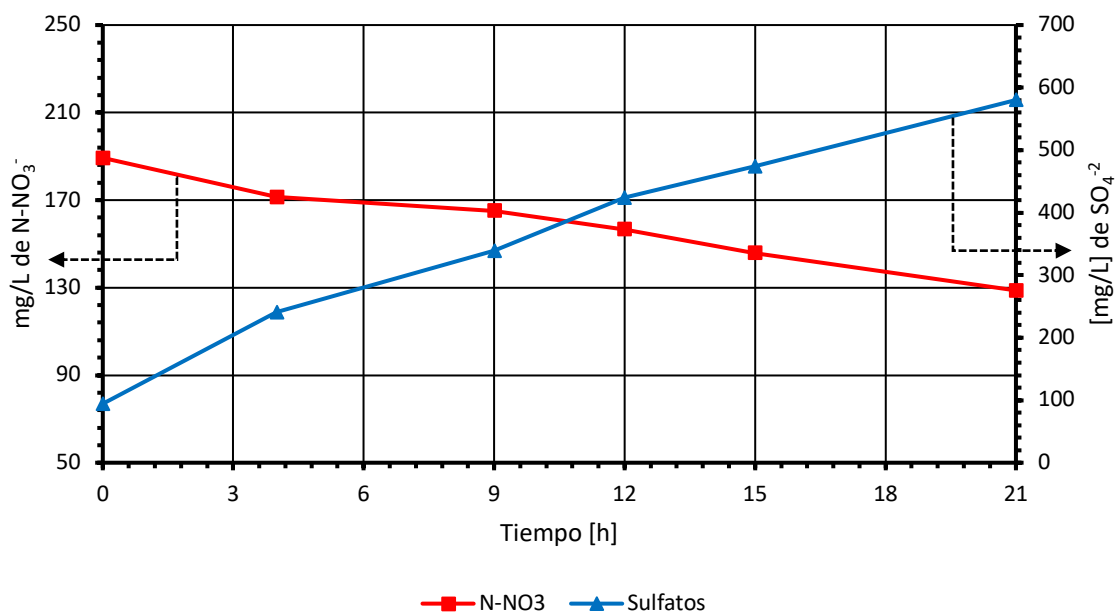


Figura 4-32 Experimento de Desnitrificación n°2. .

Es importante notar que los microorganismos desnitrificantes lograron remover 116 mg/L de N-NO_3^- en 26 horas (barrido n°1) mientras que los microorganismos amonio oxidantes lograron oxidar 117 mg/L N-NH_4^+ en 6 horas y a una concentración de biomasa menor, por lo tanto, queda demostrado que la etapa limitante en la remoción de nitrógeno en este sistema SND-SBR es la desnitrificación autótrofa.

4.2.4.1 Modelación de la cinética de Microorganismos Desnitrificantes.

Para la cinética de desnitrificación, se intentará ajustar el modelo descrito por la Ecuación 2-16, donde la tasa de consumo de nitrato es proporcional a la raíz de la concentración de este. Se tomó como un supuesto válido que la desnitrificación ocurre en la superficie de la pastilla de azufre, por lo que se genera una biopelícula que, mediante dos etapas, utiliza el azufre como dador de electrones para llevar a cabo la remoción de nitrógeno.

El proceso que se lleva a cabo en la desnitrificación consiste en degradar las pastillas de azufre para así facilitar el actuar de los microorganismos desnitrificantes. Durante los ensayos se pudo apreciar que las pastillas de azufre se pulverizaban y disminuían su tamaño. Disminuir el tamaño de las pastillas tiene relación con aumentar el área de contacto que tienen los microorganismos por unidad de volumen (área específica). Entonces, una mayor área específica se traduce en mayor actividad microbiana, es decir una constante cinética mayor. Lo anterior tiene sustento en base al estudio de Kostytsia y Espósito (2018), en el cual concluyeron que aumentar el área superficial específica, el cual es el parámetro clave para la hidrólisis microbiana de compuestos insolubles ya que se relaciona con el número de bacterias adheridas en su superficie.

La reacción de desnitrificación definida mediante la Ecuación 2-5 ocurre en la biopelícula que se forma alrededor de la pastilla del azufre. Como las investigaciones de Claus y Kutzner (1985), Batchelor y Lawrence (1987) informaron que la constante de saturación de Monod (K_s) para la desnitrificación autotrófica era baja, la reacción intrínseca dentro de la biopelícula puede tomarse como orden cero. Dado que la penetración del sustrato en los poros de la biopelícula es menos que completamente efectiva, una reacción de orden cero en la biopelícula se convierte en una reacción de orden medio en la superficie del *biofilm*.

Por lo tanto, la velocidad de reacción viene dada por la ecuación:

$$-\frac{dC}{dt} = k_{1/2} v C^{1/2}$$

Ecuación 4-11

En donde $k_{1/2} v$ es la constante de reacción de orden un medio por unidad de volumen d reactor. Luego se realiza una integración desde un $t_0 = 0$ y un C_0 (conocido para cada barrido) hasta un t y C cualquiera y se obtiene la siguiente ecuación lineal.

$$C_e^{1/2} = C_0^{1/2} - \frac{1}{2} k_{1/2} v t$$

Ecuación 4-12

Se grafica $C_{N-NO_3}^{1/2}$ en función del tiempo y se ajusta la ecuación de la recta, donde el parámetro $k_{1/2v}$ se obtiene al minimizar la suma de los errores al cuadrado mediante la herramienta Solver del software Excel. Los resultados del ajuste son los siguientes:

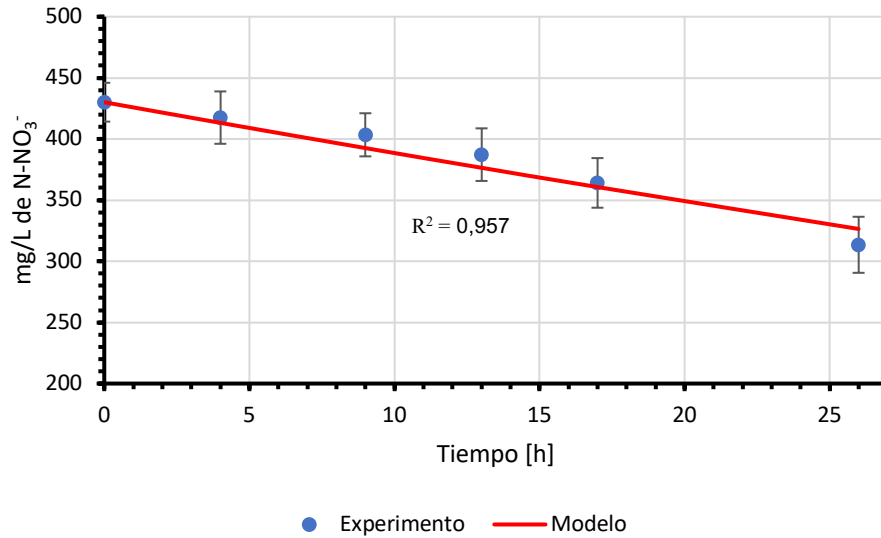


Figura 4-33 Ajuste del modelo de orden $1/2$ para Desnitrificación para Experimento n°1.

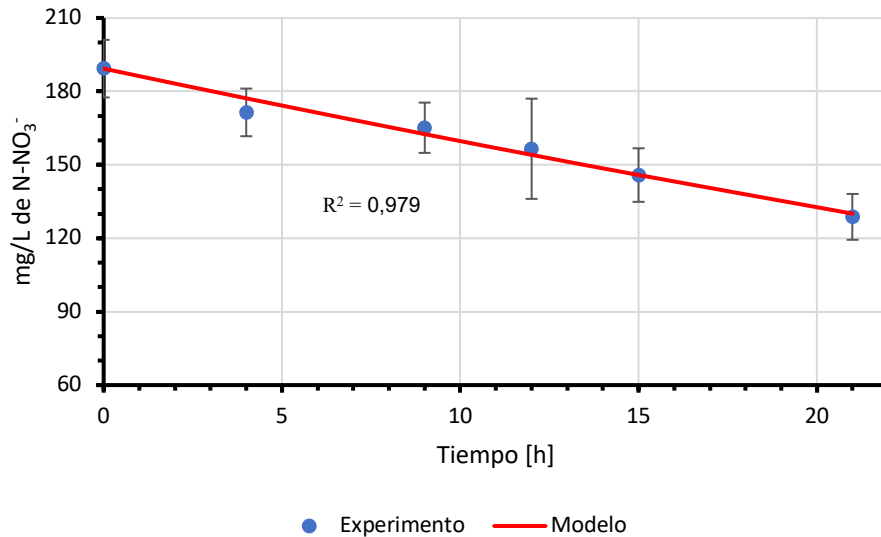


Figura 4-34 Ajuste del modelo de orden $1/2$ para Desnitrificación para Experimento n°2.

Para corroborar que una cinética de orden medio es la que mejor representa el comportamiento de los microorganismos desnitrificantes, es que se realizan ajustes con cinéticas de orden 0 y orden 1.

Una cinética de orden 1 es descrita por la ecuación diferencial:

$$\frac{dC_{N-NO_3^-}}{dt} = -k_1 \cdot C_{N-NO_3^-}$$

Integrando y despejando se tiene:

$$C_{N-NO_3^-} = C_{N-NO_3^-_0} \cdot e^{-k_1 \cdot t}$$

Ecuación 4-13

En donde:

$C_{N-NO_3^-}$ = Concentración de nitrato en un tiempo t.

$C_{N-NO_3^-_0}$ = Concentración de nitrato al comienzo del experimento.

k_1 = Constante cinética de primer orden.

Entonces, se grafica $C_{N-NO_3^-}$ en función del tiempo y se ajusta la ecuación 4-13, donde el parámetro k_1 se obtiene al minimizar la suma de los errores al cuadrado mediante la herramienta Solver del software Excel. Los resultados del ajuste son los siguientes:

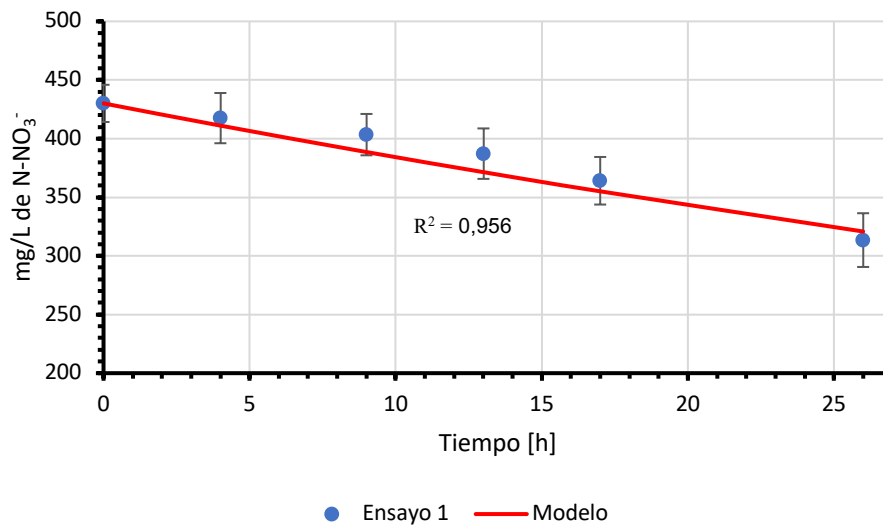


Figura 4-35 Ajuste del modelo de orden 1 para Desnitrificación para Experimento n°1.

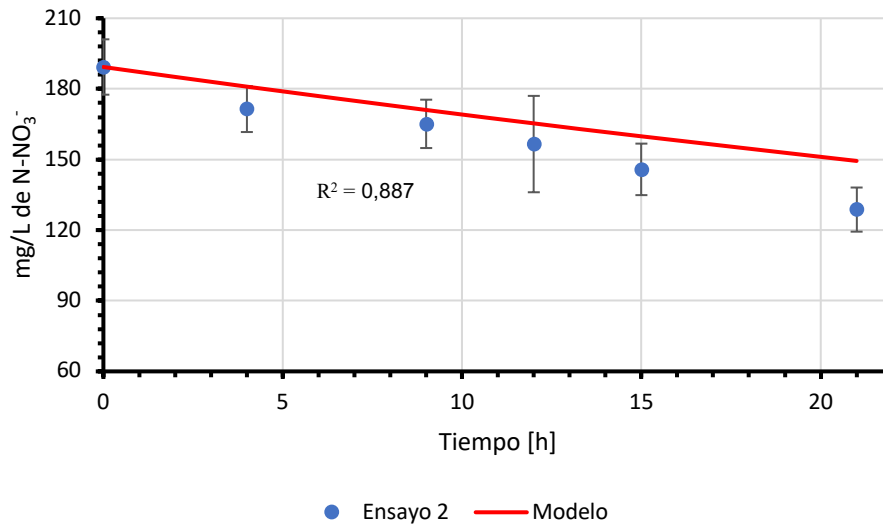


Figura 4-36 Ajuste del modelo de orden 1 para Desnitrificación para Experimento n°2.

Una cinética de orden 0 se describe por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dC_{N-NO_3^-}}{dt} = -k_0$$

Integrando y despejando se tiene:

$$C_{N-NO_3^-} = C_{N-NO_3^-}_0 - k_0 \cdot t$$

Ecuación 4-14

En donde:

$C_{N-NO_3^-}$ = Concentración de nitrato en un tiempo t .

$C_{N-NO_3^-}_0$ = Concentración de nitrato al comienzo del experimento.

k_0 = Constante cinética de orden 0.

Entonces, se grafica $C_{N-NO_3^-}$ en función del tiempo y se ajusta la ecuación 4-14, donde el parámetro k_0 se obtiene al minimizar la suma de los errores al cuadrado mediante la herramienta Solver del software Excel. Los resultados del ajuste son los siguientes:

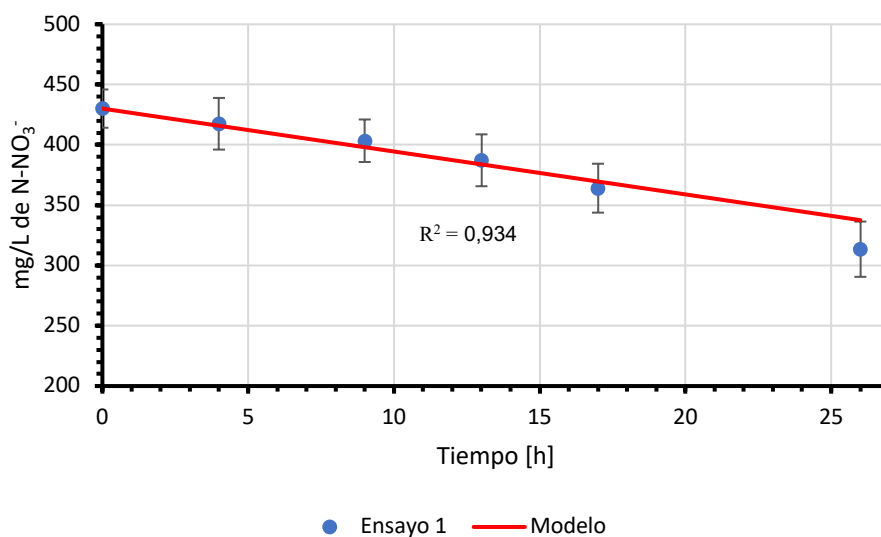


Figura 4-37 Ajuste del modelo de orden 0 para Desnitrificación para Experimento n°1.

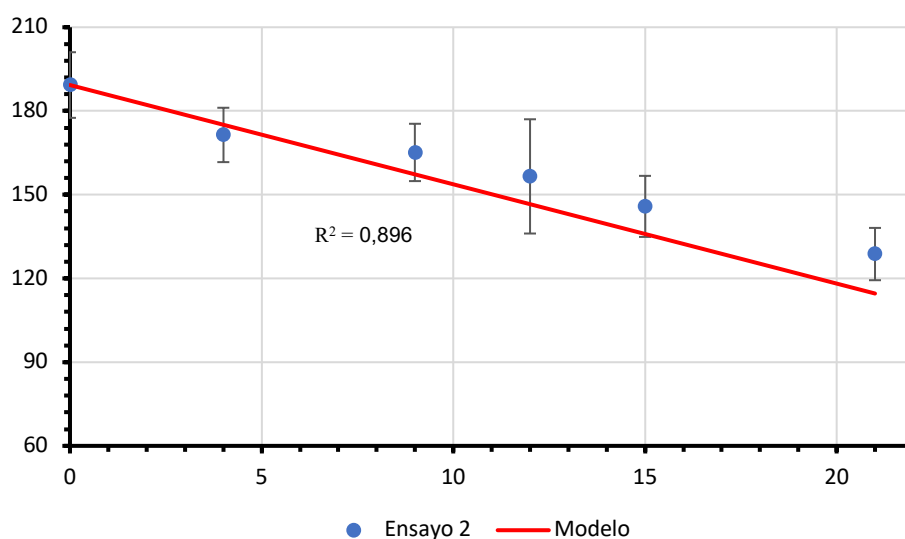


Figura 4-38 Ajuste del modelo de orden 0 para Desnitrificación para Experimento n°2.

A continuación, en la Tabla 4-4, se muestran los valores de los parámetros para cada orden de reacción, además se incluye el coeficiente de determinación (R^2) y la suma de los errores cuadrados (F_0). En base a estos últimos dos se decide qué modelo cinético es el mejor, aquel con menor error y un mayor coeficiente de determinación será el que mejor representa a los microorganismos desnitrificantes.

Tabla 4-5 Resultado de los Ajustes de las cinéticas de Desnitrificación.

Orden Del Modelo Cinético	Valor de la Constante Cinética	F ₀	R ² Experimento 1	R ² Experimento 2
Orden 1	$k_1 = 0,0112 \text{ h}^{-1}$	1472,2	0,956	0,887
Orden 0	$k_0 = 3,5575 \text{ h}^{-1}$	1125,6	0,934	0,896
Orden ½	$k_{1/2 \text{ } v} = 0,2054 \text{ mg}^{1/2}/\text{L}^{1/2}/\text{h}$	478,6	0,957	0,979

Si bien, todos los órdenes de reacción tienen un buen ajuste con respecto al experimento 1 de desnitrificación, solo el de orden ½ tiene un coeficiente de determinación superior a 0,9 con respecto al experimento 2 de desnitrificación. Además, el orden de reacción ½ es el que presenta un menor error con respecto a la suma cuadrática de errores. Es por consiguiente que se concluye que la cinética de desnitrificación es de orden ½ y la constante cinética $k_{1/2 \text{ } v}$ tiene un valor de 0,2054 mg^{1/2}/L^{1/2}/h.

4.3 Relación entre modelos cinéticos y el comportamiento operacional del Reactor.

A continuación, teniendo como referencia los parámetros cinéticos obtenidos anteriormente tanto para los microorganismos nitrificantes (BAO, BNO) como desnitrificantes autótrofos, es necesario hacer un paralelismo y verificar si los parámetros encontrados son representativos del comportamiento operacional del sistema SND-SBR para la etapa posterior a la puesta en marcha, es decir, durante la operación con alimentación de composición fija. Teniendo en cuenta la duración de los ciclos y sub-ciclos del sistema:

- El ciclo, obviando la sedimentación y la descarga, ha sido dividido en tres sub-ciclos.
- Cada sub-ciclo comienza con una alimentación que corresponde a un tercio del total del afluente.
- Cada sub-ciclo se compone de una alimentación anóxica y etapas de reacción aerobia y anóxica.
- Terminada la etapa de alimentación, comienza la primera etapa anóxica que continúa por 8 horas, haciendo un total de 9 horas de una vez iniciado el ciclo.
- Luego sigue la primera etapa aerobia, la cual posee una duración de 8 horas.
- A continuación, se vuelve a alternar el tipo de reacción, creando condiciones anóxicas por una duración de 6 horas.

- Finalmente se realiza una ultima etapa de aireación de una hora de duración, completando el sub-ciclo de 24 horas.

Para verificar si las cinéticas determinadas son características del sistema, se van a seleccionar tres ciclos cualesquiera, pertenecientes a la etapa de alimentación con composición fija (posterior a la puesta en marcha). En la Tabla 4-5 se especifica la cantidad de nitrógeno amoniacal que entra al sistema y las concentraciones del remanente del ciclo anterior (volumen muerto que queda después de la descarga) de los ciclos seleccionados en la figura 4-39.

Tabla 4-6 Condiciones iniciales para llevar a cabo la simulación teórica de un ciclo de operación del sistema.

Número del ciclo de operación.	N-NH ₄ ⁺ en la alimentación [mg/L]	N-NO ₃ ⁻ al final del ciclo anterior [mg/L]	N-NO ₂ ⁻ al final del ciclo anterior [mg/L]	N-NH ₄ ⁺ al final del ciclo anterior [mg/L]
30	111,72	70,90	0,050	0,350
34	111,72	80,67	0,024	0,337
42	100,55	85,59	0,550	0,339

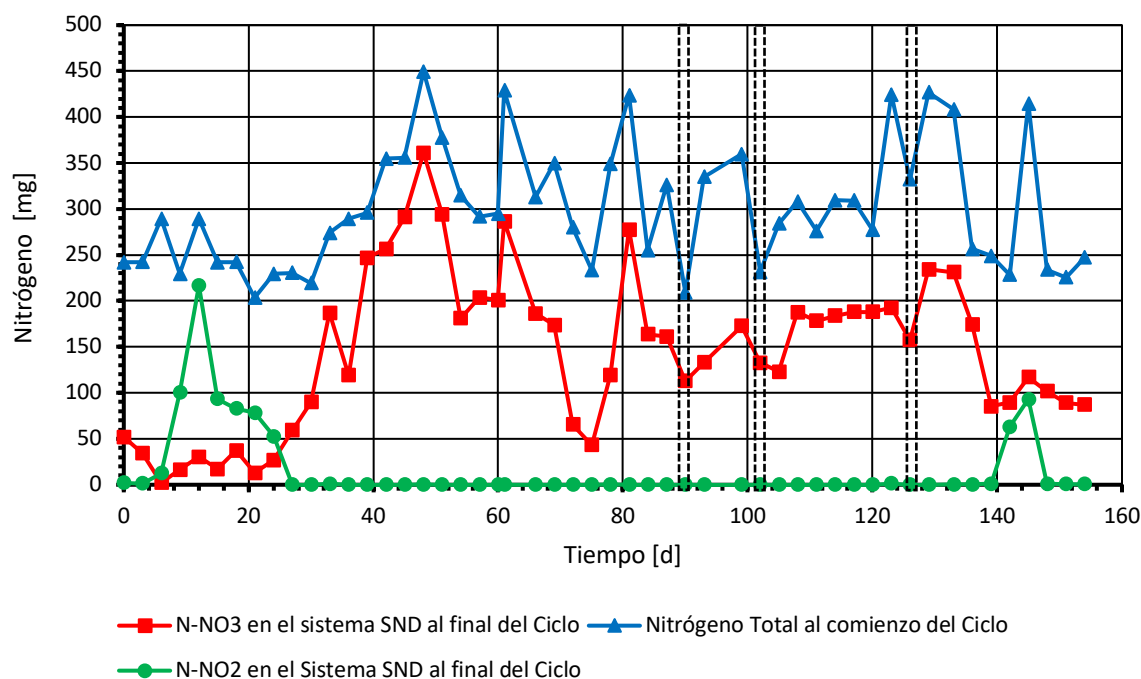


Figura 4-39 Ubicación de los ciclos seleccionados dentro del trabajo experimental y operación del reactor.

La simulación se realiza con un Runge-Kutta de orden 4 para los procesos aerobios según los parámetros resultante del ajuste de modelos a los experimentos de nitrificación. Para la desnitrificación la simulación se hace en base a la Ecuación 4-12. Además, para efectos de cálculo, se consideró que la alimentación es de duración infinitesimal, de manera que es instantánea. En la Figura 4-40, Figura 4-41 y Figura 4-42 se puede observar el comportamiento teórico del reactor SND-SBR para los ciclos 30, 34 y 42 respectivamente.

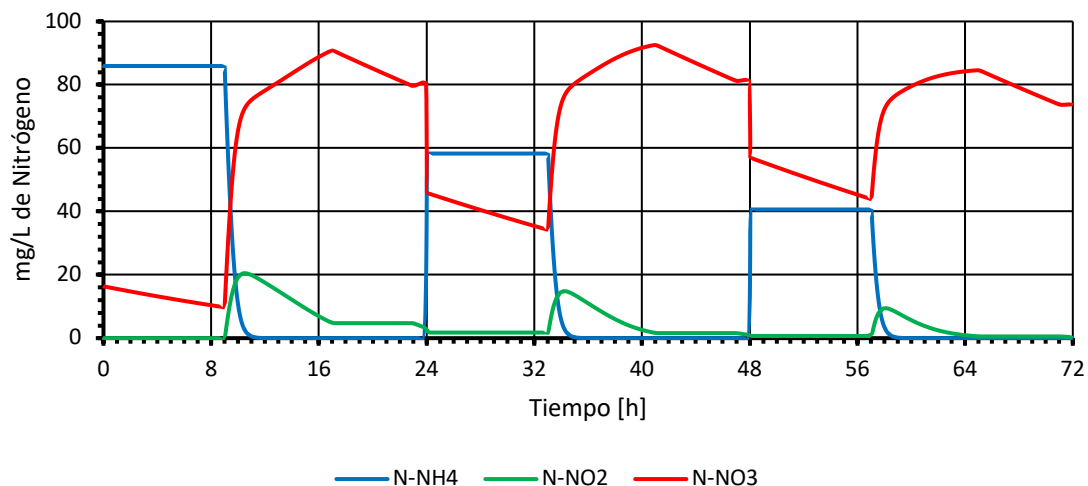


Figura 4-40 Comportamiento Teórico de Sistema SND-SBR para el Ciclo 30.

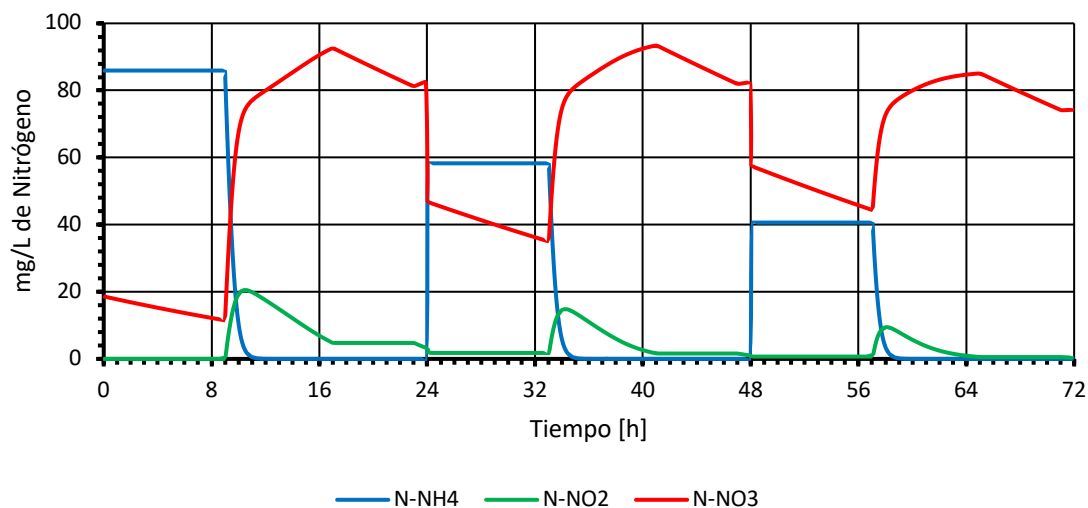


Figura 4-41 Comportamiento Teórico de Sistema SND-SBR para el Ciclo 34.

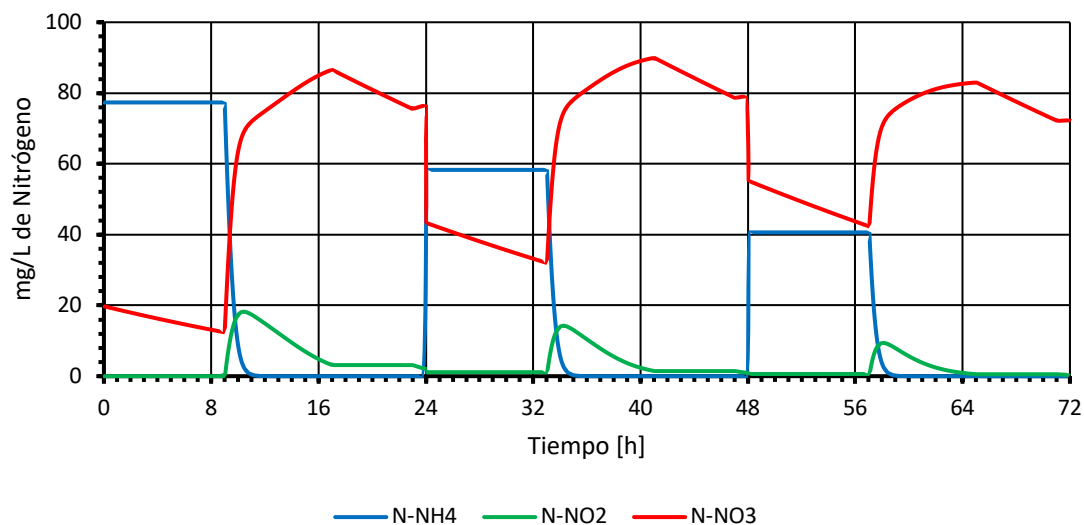


Figura 4-42 Comportamiento Teórico de Sistema SND-SBR para el Ciclo 40.

Cuando las concentraciones de N-NH_4^+ y N-NO_2^- son constantes, corresponde a una etapa anóxica, donde el N-NO_3^- se va consumiendo (desnitrificación) durante 9 horas. Luego, la concentración de N-NH_4^+ cae rápidamente, mientras que las de N-NO_2^- y N-NO_3^- aumentan, esto sucede al comenzar la etapa de reacciones aerobias (nitrificación) durante 8 horas. La concentración de nitrito aumenta hasta que se acaba la disponibilidad de amonio, para luego comenzar a disminuir, mientras que la de nitrato sigue aumentando, pero ahora a una tasa menor. A continuación, la concentración de nitrito en el sistema se mantiene igual mientras que la de nitrato disminuye, eso sucede en el segundo periodo de reacción anaerobia de 6 horas. Es importante mencionar que, si bien la forma de la curva de degradación de nitrato es similar a una recta, es en verdad el ajuste de la velocidad de orden medio (Ecuación 4-12). Hacia el final del primer sub-ciclo hay una última etapa de reacción aerobia donde hay una pequeña disminución de la concentración de nitrito y un aumento del nitrato. Hasta ese punto, van 24 horas de ciclo. Luego se repite el mismo comportamiento. Cabe destacar que la concentración de nitrato y nitrito disminuyen de golpe debido al ingreso del segundo tercio de alimentación (que contiene solo amonio). Además, la nueva concentración de amonio es diferente a la del primer sub-ciclo porque existe un volumen anterior que sirve para diluir la alimentación (la primera concentración de comienzo de sub-ciclo de amonio era superior a los 80 mg/L de N-NH_4^+ para los ciclos 30 y 34, y cercano a 80 mg/L de N-NH_4^+ para el ciclo 42) mientras que para el segundo tercio de alimentación la concentración es aproximadamente 60 mg/L de N-NH_4^+). Misma situación sucede a las 48 horas, disminuye

la concentración de nitrato y nitrito, y la concentración de amonio no alcanza valores de concentración tan altos como al comienzo del ciclo. Al final del ciclo ya no hay presencia de amonio ni de nitrito, lo cual concuerda con el trabajo realizado en laboratorio, donde, a excepción de casos especiales, el reactor no acumulaba nitrito ni amonio. A continuación, en la Tabla 4-6, se muestra la cantidad de nitrógeno removido teóricamente en cada ciclo y se comparan eficiencias teóricas y experimentales:

Tabla 4-7 Remoción de nitrógeno y eficiencias en cada ciclo.

Ciclo	mg de nitrógeno al comienzo del ciclo	mg de N-NO₃⁻ removido teóricamente	Eficiencia teórica del ciclo.	Eficiencia experimental del ciclo
30	237,58	104,21	43,86 %	50,54 ± 7,54 %
34	239,57	105,23	43,92 %	42,69 ± 4,60 %
42	218,21	103,07	47,23 %	52,67 ± 9,73%

Teniendo en cuenta la cantidad de nitrógeno que entra al sistema en forma de N-NH₄⁺, en dos de tres casos, la eficiencia experimental es mayor a la eficiencia teórica. La eficiencia teórica oscila entre 43,86% y 47,23%. El hecho de que la eficiencia del ciclo 34 sea ligeramente mayor a la del 30 se debe a que la concentración de nitrato en el volumen remanente del ciclo anterior es mayor, por ende, el sistema tiene más nitrógeno en forma de nitrato que remover.

Finalmente, se puede observar en las Figuras 40, 41 y 42 que la etapa limitante es la desnitrificación, donde el nitrato se consume a una velocidad mucho menor a la que el amonio y el nitrito se oxidan. Para mejorar la eficiencia de desnitrificación existen dos modificaciones a las condiciones de operación del sistema que permitirían remover una mayor cantidad de nitrógeno. La primera modificación consiste en aumentar la duración del sub-ciclo (fijado en 24 horas), y dentro del sub-ciclo, extender la etapa de desnitrificación hasta que alcance niveles de remoción mayores a los actuales. El problema de efectuar esta modificación en el sistema es que, al estar en el mismo reactor microorganismos nitrificantes y desnitrificantes, es posible que la extensión de la etapa anaerobia en el sistema va a tener efectos negativos en la comunidad nitrificante (decaimiento endógeno).

La segunda modificación consiste en aumentar el área específica donde ocurre la desnitrificación, es decir, disminuir el tamaño de las lentejas de azufre. El inconveniente de

esta opción es que existe un tamaño crítico para que la pastilla no flote. Pastillas muy pequeñas tienden a flotar, lo cual no permite que entren en contacto con la biomasa del sistema.

5 Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones.

Teniendo en cuenta los objetivos fijados, la metodología aplicada y los resultados obtenidos, es posible establecer, en la presente tesis, las siguientes conclusiones:

- La eficiencia promedio de la nitrificación autótrofa lograda es de 99,85%. Para la configuración del sistema, se decidió operar de manera de generar la oxidación total del amonio y evitar acumular nitrito.
- La eficiencia promedio de la desnitrificación autótrofa lograda es de 44,9%, es decir, no supera el 50%. Esto se debe a que el período de la etapa anóxica en el reactor no es lo suficientemente largo y/o que las pastillas de azufre son muy grandes y por ende tienen una baja área específica.
- Se decidió no acumular nitrito ya que bajo las condiciones de operación del sistema (pH de 7,39 y temperatura de 31°C) se genera ácido nítrico, el cual es tóxico para los microorganismos que llevan a cabo la desnitrificación.
- Para obtener mayores tasas de remoción de nitrógeno fue necesario evitar la acumulación de nitrito en el sistema SND-SBR y optar por una estrategia de operación donde exista nitrificación total, ya que bajo las condiciones de operación del sistema (pH de 7,39 y temperatura de 31°C) hay presencia de ácido nitroso. De esta manera se evita la posibilidad de inhibición producto de la formación de ácido nitroso en el reactor, el cual inclusive a concentraciones muy bajas tiene efectos nocivos para el metabolismo de los microorganismos que participan en la desnitrificación.
- Mediante microscopio se observó que las bacterias son capaces de adherirse a las pastillas de azufre generando una biopelícula en donde se lleva a cabo el proceso de desnitrificación, lo cual abre la posibilidad de utilizar azufre como soporte microbiano. .
- El tiempo de puesta en marcha fue de 75 días, en los cuales se ajustó la estrategia de alimentación y sus composición progresivamente, además de los tiempos anóxicos y de aireación. Finalmente, se logró estabilizar la biomasa dentro del reactor, equiparando la biomasa lavada durante la sedimentación y descarga con el aumento de esta producto del metabolismo intrínseco del sistema SND-SBR, teniendo como consecuencia un proceso estacionario con respecto al balance de biomasa del sistema, con una concentración dentro del reactor de SSV de 2g/L aproximadamente.

- La estrategia de alimentación *step-feed* permite disminuir los efectos de inhibición por sustrato, esto debido a que va dosificando la VCN a lo largo de la operación, y cada subalimentación entra al sistema a concentraciones menores que la anterior, lo que permite que la actividad microbiana dentro del reactor se realice con mayor facilidad y no se encuentre sobresaturada.
- En base a los experimentos de nitrificación realizados en laboratorio y mediante el ajuste de modelos cinéticos para representar el comportamiento microbiano en función de los datos obtenidos, se llegó a la conclusión de que el modelo cinético que mejor describe la actividad metabólica de los microorganismos amonio-oxidantes (BAO) es el modelo cinético de Monod, esto debido a que se suprime la especie inhibitoria al ejercer un control de pH en los experimentos, mientras que para los microorganismos nitrito-oxidantes, el modelo que mejor se ajusta es el de Haldane, el cual incluye un término de inhibición por sustrato, que tiene directa relación con el nitrito y la posibilidad de formar ácido nitroso.
- En muchos casos, la cinética de Monod se puede representar como una reacción de primer orden o como una reacción de orden cero, dependiendo del valor de la constante de saturación de Monod (K_s). Para los experimentos de desnitrificación, y de acuerdo con la investigación de Batchelor y Lawrence (1978), la penetración del sustrato en los poros de la biopelícula que se genera alrededor de la pastilla de azufre es menos que completamente efectiva. Esto implica que una reacción de orden cero en la biopelícula se convierte en una reacción de orden medio en la superficie de la biopelícula. Por ende, se ajustó un modelo de orden medio, donde el perfil de concentración es una línea recta en una gráfica de $C^{1/2}$ versus tiempo.
- Las cinéticas obtenidas mediante el uso de pequeños reactores para describir el proceso de nitrificación/desnitrificación simultánea son representativas del sistema en general, lo cual significa que fue posible encontrar parámetros al reducir en vez de escalar el experimento. Cabe destacar que esto necesita ser verificado para la puesta en marcha de un reactor de tamaño piloto e industrial.

5.2 Recomendaciones.

De acuerdo con las observaciones indicadas en el presente estudio, son establecidas las siguientes recomendaciones:

- Se recomienda para estudios posteriores cambiar la composición de la alimentación (RIL sintético) de manera de tener C/N (donde C corresponde a carbón inorgánico) superiores a 5 para ambos tipos de alimentación (nitrificante y desnitrificante) de manera de verificar si el tiempo de puesta en marcha para el sistema es menor que el de este trabajo investigativo.
- Es necesario tanto a escala de laboratorio como de piloto la implementación de un sistema de monitoreo de pH/ORP online para la optimización de la distribución de las etapas y tiempos del ciclo y sub-ciclos. Identificando cambios en los perfiles de pH y de ORP es posible establecer tiempos óptimos para así aumentar la remoción de nitrógeno.
- Se recomienda para futuros trabajos de investigación evaluar el comportamiento del sistema al variar el flujo de aire y por ende la variable de oxígeno disuelto (fundamental para la nitrificación). Igual de importante es la variable de temperatura, que afecta a la solubilidad del oxígeno en el sistema.
- Se recomienda para futuras investigaciones evaluar el comportamiento del reactor al implementar cualesquiera de las dos modificaciones propuestas anteriormente para mejorar la eficiencia del proceso de desnitrificación, estas son: aumento del tiempo anóxico, y del sub-ciclo en general, dentro del ciclo; utilizar pastillas de azufre más pequeñas evitando la flotabilidad de estas, o quizá implementar un método que permita solubilizar el azufre en el reactor.

6 Referencias

- Aesoy, A., Bentzen, G., y Odegaard, H. (1998). The effect of sulphide and organic matter on the nitrification activity in a biofilm process. *Water Science y Technology*.
- Al-Ghusain, I. (1995). Use of pH as Control Parameter for Aerobic/Anoxic Sludge Digestion. *Journal of Environmental Engineering*, 225-235.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, L. Clesceri, A. Greenberg, A. Eaton. M. Franson. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 20th.
- Anthonsen, A., Loefer, R., Prakasam, T., y Srinath, E. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Water Pollution Control Federation*, 835-852.
- Bathchelor, B., y Lawrence, A. (1978). A kinetic model for autotrophic denitrification using elemental sulfur. *Water Research*, 1075-1084.
- Beistain-Cardoso, R., Gómez, J., y Méndez-Pampín, R. (2010). The behavior of nitrifying sludge in presence of sulfur compounds using a floating biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 8593–8598.
- Beristain-Cardoso, R. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S by nitrification/denitrification: a review. *Environ. Sci. Biotechnol*, 325–342.
- Beristain-Cardoso, R., y Gomez, J. (2013). Sequential nitrification-denitrification process for nitrogenous and phenolic compounds removal in the same bioreactor. *Bioresource Technology*, 220–225.
- Cortés, A. (2013). Remoción de Compuestos Nitrogenados Presentes en Purines a través de Nitrificación-Desnitrificación Simultánea en un Reactor Secuencial Batch utilizando Zeolita como soporte y Estrategia *step-feed*. Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María.
- Darbi, A., y Viraraghavan, T. (2003). A Kinetic Model for Autotrophic Denitrification using Sulphur: Limestone Reactors. *Water Qual. Res*, Volume 38, No.1, 183-192.
- de S De Souza Moraes, B., Orrú, J., de Andrade, C., y Fonseca, D. (2014). Shortcut Nitrification-Denitrification Coupled With Sulfide Oxidation In A Single Reactor. *Journal of oJ Microbial y Biochemical Technology*.
- Fujinuma, I. (1975). Problems of Pig Waste Disposal. National Institute of Animal Industry, Animal Feeding and Management Division.
- Glass, C., y Silverstein, J. (1997). Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Environment Research*, 69(6), 1086-1093.
- He, S., Wang, B., y Gang, X. (2009). Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 704–710.
- Herráez, Á. (2019). Biomodel. Universidad de Alcalá. Obtenido de Metabolismo del Nitrógeno.: <http://biomodel.uah.es/metab/nitrogeno.htm>
- INIA. (2005). Recomendaciones Técnicas para la Gestión Ambiental en el Manejo de Purines de la Explotación Porcina. Ministerio del Medio Ambiente.
- Jaramillo, F. (2018). Advanced strategies to improve nitrification process in sequencing batch reactors - A review. *Journal of Environmental Management*, 154-164.
- Jorgensen, T. (2003). Ammonia Removal from Wastewater by Ion Exchange in the Presence of Organic Contaminants. *Water Research* 37, 1723–1728.

- Jorquera, H., y Gelmi, C. (2018). Métodos numéricos aplicados a la Ingeniería, Casos de estudio en ingeniería de procesos usando MATLAB. Capítulo 4.
- Koenig, A., y Liu, L. (2001). Kinetic Model of Autotrophic Denitrification in Sulphur Packed-Bed Reactors. *Water Resources* Vol. 35, No. 8, 1969–1978.
- Kostrysia, A., y Esposito, G. (2018). Elemental sulfur-based autotrophic denitrification and denitritation: microbially catalyzed sulfur hydrolysis and nitrogen conversions. *Journal of Environmental Management* 211, 313-322.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación Biológica de Nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 1-4.
- Mery, C. (2011). Tesis: Eliminación biológica de compuestos nitrogenados utilizando un reactor de lecho fluidizado con zeolita como soporte. Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María.
- Metcalf y Eddy. (2014). *Wastewater Engineering. Treatment and Resource Recovery*. New York: McGraw-Hill Education.
- Oh, S., Kim, K., Choi, H., Cho, J., y Kim, I. (2000). Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulfur bacteria. *Water Science and Technology*, 59-62.
- Palomares, A. (2013). Contaminación del Agua por Nitratos y Técnicas para su Tratamiento. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pirsing, A., Kalterbach, G., y Wiesmann, U. (1996). On-line monitoring and modelling based process control of high rate nitrification -lab scale experimental results. *Bioprocess Engineering* 15, 181-188.
- Pons, J., Regada, I., y Fuentes, E. (2016). La contaminación por purines: detección y tratamiento de los nitratos. Departamento de Química, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Poo, K. (2006). Full-cyclic control strategy of SBR for nitrogen removal in strong wastewater using common sensors. *Water Science y Technology* Vol 53 No 4–5 pp., 151–160.
- Puig, S. (2005). On-line Oxygen Uptake Rate as a new tool for monitoring and controlling the SBR process. *European Symposium on Computer Aided Process Engineering*, 1291-1296.
- Puig, S. (2008). Operation and Control of SBR Processes for Enhanced Biological Nutrient Removal from Wastewater. Girona, España.
- Ren-Cun, J., Guang-feng, Y., Jin-Jin, Y., y Ping., Z. (2012). The Inhibition of the Anammox Process: A Review. *The Chemical Engineering Journal* 197, 67-79.
- Richard, T. (1996). *Cornell Composting, Science and Engineering*. Obtenido de Ammonia Odors: <http://compost.css.cornell.edu/odors/ammonia.html>
- Rittmann, B., y McCarty, P. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. Columbus, OH: McGraw-Hill.
- Wang, L., y Shammas, N. (2010). Sequencing Batch Reactor Technology. *Environmental Biotechnology*, 721-747.
- Wiesmann, U. (1994). *Biological Nitrogen Removal from Wastewater*. Berlín: Technische Universität Berlin.
- Y. Aoi, Y. S. (2005). Single-stage autotrophic nitrogen-removal process using a composite matrix immobilizing nitrifying and sulfur-denitrifying bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 124-130.

Anexos

A. Procedimientos de Análisis

A continuación, se detallan los protocolos de trabajo para la determinación de compuestos nitrogenados, sulfatos y sólidos suspendidos volátiles.

A.1 Método espectrofotométrico uv-vis para determinación: nitratos.

A.1.1 Principios.

Este método se basa en la técnica con luz ultravioleta, donde se mide la absorbancia del nitrato a 200 nm la cual es adecuada para aguas que no presentan una carga orgánica elevada, es decir su contenido de materia orgánica es bajo.

La curva de calibrado verifica la Ley Lambert-Beer hasta 1 mgN/L. La medida de 220 nm hace posible una rápida determinación del nitrato, dado que la materia orgánica no absorbe a tal magnitud y el nitrato no lo hace a 275 nm por lo que se puede utilizar una segunda medida a 275 nm para corregir el valor de nitrato. La corrección puede variar dependiendo de los distintos tipos de aguas, por ello, se agrega 1 mL de ácido clorhídrico 1 N para eliminar posibles interferencias. Se recomienda el análisis de inmediato de las muestras de lo contrario congelar no más allá de 4 días.

A.1.2 Equipos y materiales.

- Espectrofotómetro ultravioleta UV-VIS para trabajar 200 a 300 nm.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Solución patrón NO₃. (Merck art.1.19811.0500)
- Material de uso común en laboratorio.

A.1.3 Reactivos y soluciones.

- Agua exenta de nitrato: Utilizar agua destilada o re-destilada, desionizada de la máxima pureza posible para preparar todas las soluciones y diluciones.
- Solución Stock de Nitratos: Pipetear 1 mL de la solución patrón de NO₃⁻ (1000 mg/L), y se aforan a 100 mL (esta solución tiene una concentración 10 mg/L). Preparar en el momento. En caso de no contar con la solución patrón se debe secar nitrato de potasio KNO₃ en horno a 105 °C durante 24 horas, de los cuales se disuelven 0,7218 g en agua y se diluye a 1L. Esta solución tiene una concentración de 1,00 mL = 100 microgramos de

N-NO_3^- . Preservar agregando 2 mL de cloroformo CHCl_3 . La solución es estable al menos durante seis meses.

- Solución intermedia de Nitratos: Tomar 100 mL de la solución madre de nitratos y se diluyen a 1L de agua destilada, $1,00 \text{ mL} = 10 \text{ microgramos de } \text{N-NO}_3^-$, se conserva con 2 mL de cloroformo. Con esta solución se prepara la curva de calibración.
- Solución HCl 1 N: Se prepara a partir de 83 mL HCl concentrado llevándose a volumen de 1 L almacenándolo en una botella ámbar para posteriormente estandarizarlo con carbonato de sodio como patrón primario, previamente secado en estufa durante 1 hora a $206\text{-}270^\circ\text{C}$. Realizar procedimiento bajo campana.

A.1.4 Procedimiento.

- Tratamiento de la muestra: Sobre 50 mL de muestra, filtrada de ser necesario, añadir 1 mL de HCl 1N y mezclar bien, en caso de que las muestras no se encuentren dentro de la curva es necesario considerar dilución. La conservación de la muestra no se recomienda, en caso de ser necesario no debe exceder las 48 horas de tomada, de ser necesario congelar no más allá de dos días.
- Preparación curva de calibración: Preparar estándares del calibrado de nitrato en el rango de 0 a 7 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ agregando mediante bureta volúmenes conocidos de la solución intermedia de nitratos. Se trata a los patrones de la misma manera que las muestras.
- Medida espectrofotométrica: Leer a 220 nm frente a blanco de agua destilada y a 275 nm para obtener los interferentes debidos a materia orgánica disuelta.

A.1.5 Cálculo.

Directamente de la curva de calibración, se debe considerar dilución en caso de ser necesario.

A.1.6 Referencia.

Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 20th Edition, Method 4500 NO_3^- - B Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method.

A.2 Determinación de nitritos por método espectrofotométrico.

A.2.1 Principio.

Se fundamenta en la base de la formación de un colorante azoico púrpura rojizo (compuesto azo), el cual se desarrolla en un pH ácido por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con N-(1-Naftil)- etilendiamina dihidriclorada (diclorhidrato de NED).

El rango de aplicación de este método va desde los 10 a 1000 $\mu\text{g/L}$. El sistema de color obedece la ley de Lambert-Beer hasta 180 $\mu\text{g/L}$ con 1 cm de paso de luz a 543 nm.

Las muestras pueden colectarse en frascos de plástico o vidrio, no agregar preservantes ácidos, analizar dentro de un plazo máximo de 48 horas para prevenir la conversión, por medio de bacterias, de nitrito a nitrato. Refrigerar a 4°C, de lo contrario congelar no más allá de 1-2 días.

A.2.2 Equipos y materiales.

- Espectrofotómetro ultravioleta UV-VIS para trabajar entre 500-600 nm.
- Celda de 1 cm de diámetro (se pueden utilizar celdas plásticas).
- Material de vidrio de uso habitual en laboratorio.

A.2.3 Reactivos y soluciones.

- Agua exenta de nitrito.
- Ácido fosfórico (Sigma Aldrich art. 100317).
- Sulfanilamida (Merck art. 100731).
- Permanganato de potasio (Merck art. 105084).
- N-(1-Naftil)- etilendiamina dihidriclorada (Merck art. 106237).
- Patrón Nitrito (Merck art. 106549).

A.2.4 Procedimiento.

- Preparación del reactivo: Disolver 100 mL ácido fosfórico al 85% en 800 ml de agua destilada y 10 gramos de sulfanilamida, luego de disolver completamente agregar 1 gramo de N-(1-Naftil)- etilendiamina dihidriclorada, aforar a 1 litro en botella ámbar. Refrigerar.
- Solución stock de nitrito: Pipetear 0,1 mL de la solución patrón de NO_2^- (1000 mg/L), y se aforan a 500 mL (esta solución tiene una concentración 200 $\mu\text{g/L}$). Preparar en el momento.
- En caso de no contar con solución patrón, se deben disolver 1,232 gramos de NaNO_2 (1mL=250 μg), previamente secado a 105 °C, por una hora al menos y enfriar en desecador (20 minutos) y ser retrovalorado con permanganato de potasio. Aforar a 1000 mL.
- Tratamiento de la muestra: Filtrar para eliminar cualquier sólido suspendido con un filtro de membrana (filtro pirinola) de 0,45 μm , en caso de ser necesario. Tomar 50 mL de

muestra de agua y se agregan 2 mL de reactivo de color (reactivo de NED), dejar actuar por 10 minutos. Medir la absorbancia a 543 nm de la muestra y de los estándares.

A.2.5 Cálculo.

Directamente de la curva de calibración realizada, se debe contar dilución en caso de ser necesario.

A.2.6 Referencia.

Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 20th Edition, method 4500-NO₂- Colorimetric Method.

A.3 Determinación amonio método fenol.

A.3.1 Principio.

Se basa en la formación de un compuesto azul intenso, indofenol, el cual es proporcional a la cantidad de amonio presente en la muestra, este se forma por la reacción del amonio en presencia de hipoclorito y fenol con citrato alcalino como catalizador.

Si el sulfuro de hidrógeno está presente en la muestra, se remueve acidificando la muestra hasta pH 3, agregando pequeñas cantidades de HCl diluido y aireando vigorosamente. La recta de calibración es lineal hasta los 0,6 mg/L.

La conservación y almacenamiento de las muestras se realiza en envases de vidrio o polipropileno, se obtienen mejores resultados analizando muestras frescas, si estas va a ser analizadas dentro de 24 horas refrigerar a 4°C, de lo contrario congelar a -20°C. Su duración de este modo se extiende hasta por 28 días.

A.3.2 Equipos y materiales.

- Espectrofotómetro ultravioleta UV-VIS para trabajar entre 600-700 nm con celdas de paso óptico de 1 cm.
- Material de vidrio usado en laboratorio.
- Celda plástica de 1 cm de paso de luz.

A.3.3 Reactivos y soluciones.

- Solución patrón NH₄⁺ (1000 mg/L).
- Solución de fenol liquificado (90%): A diez gramos de fenol, agregar 1 mL de agua destilada, medir 11,1 mL de la solución anteriormente preparada y agregar a matraz

aforado de 100 mL, aforar con etanol al 95 %. Llevar a cabo el procedimiento con precaución y bajo campana. Mantener refrigerado.

- Nitropusato de sodio (0,5 % m/v): Pesar 0,5 gramos del reactivo y aforar a 100 mL con agua destilada, almacenar en botella ámbar. Refrigerar durante máximo 1 mes.
- Citrato alcalino: En un vaso precipitado de 1000 mL se agregan 200 gramos de citrato sodio y 10 gramos de hidróxido de sodio más 500 mL de agua destilada, agitar, aforar a un litro. Almacenar en botella ámbar.
- Hipoclorito de sodio solución comercial al 5 %.
- Solución oxidante: Se mezclan 100 mL de citrato alcalino y 25 mL de hipoclorito de sodio. Preparar diariamente.

A.3.4 Procedimiento.

- Curva de calibración: Pipetear 1 mL de la solución patrón de NH_4 , aforar a 100 mL con agua destilada esta solución tiene una concentración de 10 mg/L.
- Calcular los volúmenes para realizar la curva de calibración entre 0 y 0,6 mg/L. A 25 ml de muestra, diluida o no, previamente filtrada de ser necesario, agregar en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, en el orden correspondiente: 1 mL de fenoliquificado, 1mL nitropusido de sodio y 2,5 mL solución oxidante.
- Tapar con parafilm o papel aluminio y dejar reposar por al menos 1 hora en luz tenue y entre 22 a 27°C, el color es estable por 24 horas.
- Realizar la medida espectrofotométrica a 635 nm, realizar un barrido de ondas para comprobar longitud de onda más alta. Estándares y muestras se tratan de la misma manera.

A.3.5 Cálculo.

Medir directamente de la recta de calibración realizada, considerar factor de dilución de ser necesario.

A.3.6 Referencia.

Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 20th Edition, 4500-NH₃. Phenate Method (F).

A.4 Método turbidimétrico modificado para sulfatos.

A.4.1 Principios

El ion sulfato precipita en medio ácido con cloruro de bario formando cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme, tal cantidad es proporcional a la concentración de sulfatos presentes en la muestra y la absorbancia luminosa de la suspensión. Puede ser medido espectrofotométricamente a 420 nm, siendo la concentración de sulfatos determinada respecto a una curva de calibración.

Este método nos permite determinar hasta una concentración de 40 mg/L de sulfatos, en caso de presentar una concentración mayor es necesario diluir. Las muestras pueden colectarse en frascos de plástico o vidrio. Dado que ciertas bacterias pueden reducir el sulfato a sulfuro, especialmente en muestras contaminadas, almacenar a temperatura máxima de 6°C por un período máximo de 28 días.

A.4.2 Equipos y Materiales

- Material común de vidrio de uso en laboratorio, ejemplos volumétricos, vasos de precipitado.
- Espectrofotómetro ultravioleta UV-VIS para trabajar a 420nm con celdas de paso óptico de 1 cm.

A.4.3 Reactivos y soluciones

- Solución trazable de sulfatos (P.A. Merck).
- Cloruro de bario dihidratado (P.A. Merck).
- Solución acondicionadora para sulfato: Es utilizada como forma de acondicionamiento al proporcionar un método de suspensión para los iones sulfatos al ser leídos en el espectrofotómetro, es de vital importancia ya que al no usarla precipitaría todo el analito al momento de la adición del cloruro de bario. Su preparación debe ser en orden agregando a un vaso precipitado de un litro y mezclando después de cada adición: 300 mL de agua destilada, 30 mL ácido clorhídrico concentrado, 100 mL de alcohol isopropílico y 75 gramos de cloruro de sodio, finalmente añadir 50 mL de glicerol medidos en probeta, mezclar todo y llevar a volumen final de 500 mL con agua destilada, esta solución es estable durante seis meses en frasco ámbar a temperatura ambiente.

A.4.4 Procedimiento.

- Preparación de la curva de calibración: Se utiliza el método de adiciones estándar para la curva de calibración, de esta manera se agregan volúmenes crecientes de solución trazable de sulfatos mediante bureta a matraces aforados de 100 mL para obtener al menos seis calibraciones que van desde los 0 mg/L a 40mg/L. A continuación, se transfieren estos patrones a vasos precipitados de 100 mL y se adicionan 2,5 mL de solución acondicionadora y se agita en cada vaso mediante varilla de vidrio, luego se adiciona una pequeña cantidad de cristales de cloruro de bario y se agita nuevamente hasta la disolución de los cristales. Una medida crítica de este método es que debe ser leído antes de cinco minutos en espectrofotómetro a 420 nm en celda de 1 cm de paso óptico. Finalmente, se crea la curva de calibración.
- No es necesario realizar una curva de calibración cada vez que se realice una medición, pero si se debe comprobar la validez de la existente, para ello se prepara un patrón de 20 mg/L de la solución trazable de sulfatos y se lee como muestra normal si el resultado es coincidente en rango del 10% se considera que la curva es válida y es posible realizar la medición de las muestras, de no ser así se debe repetir el patrón o construir una nueva curva de calibración.

A.4.5 Cálculos.

La concentración puede ser leída directamente en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración, hay que considerar dilución y corregir.

A.4.6 Referencia

Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 20th Edition, Method 4500-SO₄²⁻ (E). Turbidimetric Method.

A.5 Determinación Sólidos Suspendidos Totales.

A.5.1 Procedimiento

Preparación del disco de fibra de vidrio:

- Colocar el disco en el aparato de filtración, aplicar vacío y lavar con tres porciones sucesivas de 20 ml de agua destilada.
- Continuar la succión para remover totalmente el agua, y descartar el agua de lavado.
- Sacar con pinzas el filtro del aparato de filtración y colocarlo sobre una placa Petri o acero inoxidable que servirá como soporte. Secar en estufa a 103 °C – 105°C, durante una hora.

- Enfriar en desecador y pesar. Registrar masa B.

Selección del filtro y tamaño de muestra:

- El volumen de muestra debe ser tal, que el residuo seco obtenido tenga una masa entre 2,5 mg y 200 mg
- Si el tiempo utilizado en la filtración es mayor a 10 min, es necesario aumentar el diámetro del filtro o disminuir el volumen de muestra a tomar.

Procedimiento de análisis:

- Colocar el filtro preparado de acuerdo con en el aparato de filtración y aplicar vacío.
- Humedecer el filtro con una pequeña porción de agua destilada.
- Filtrar un volumen medido (v) de muestra homogeneizada a través del filtro de fibra de vidrio.
- Lavar con tres porciones sucesivas de 10 ml de agua destilada y continuar la succión por aproximadamente 3 min después que la filtración se ha completado.
- Sacar con pinzas el filtro del aparato de filtración y colocarlo sobre la placa Petri o de acero inoxidable.
- Secar el filtro por una hora en la estufa a 103 °C– 105°C.
- Enfriar en desecador y pesar. Registrar masa A.

A.5.2 Cálculos.

$$SST \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{A - B}{v} \cdot 1000$$

Dónde:

SST = Sólidos suspendidos totales (mg/L)

A = masa del filtro más residuo seco.

B = masa del filtro.

v = volumen de muestra utilizado.

A.6 Determinación Sólidos Suspendidos Volátiles.

A.6.1 Procedimiento

- Doblar cuidadosamente el papel filtro obtenido en la determinación de Sólidos Suspendidos Totales (SST) y colocarlo en un crisol previamente tarado.
- Poner el crisol en la mufla por una hora a 550 °C

- Dejar en el desecador y pesar cuando se encuentre frío.

A.6.2 Cálculos.

$$SSV \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{m_{SST} - (T_{CM} - T_C)}{v_m} \cdot 1000$$

Dónde:

m_{SST} = masa del papel filtro obtenido de SST.

T_{CM} = Tara del crisol más la muestra calcinada.

T_C = Tara crisol.

v_m = Volumen de muestra.

B. Imágenes de Microscopio

A continuación, se exhiben imágenes tomadas con microscopio que sirven para entender la distribución de microorganismos dentro del sistema.



Figura B-0-1 Cúmulos microbianos suspendidos extraídos del Reactor SBR-SND. (20x Aumento).

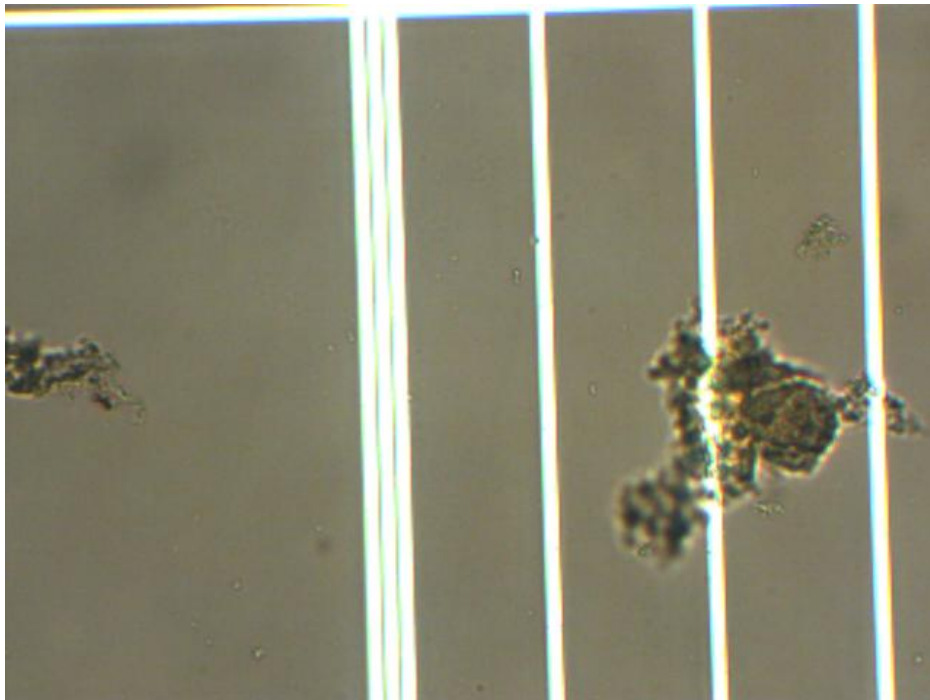


Figura B-0-2 Aglomeración de microorganismos suspendidos. (40x Aumento).

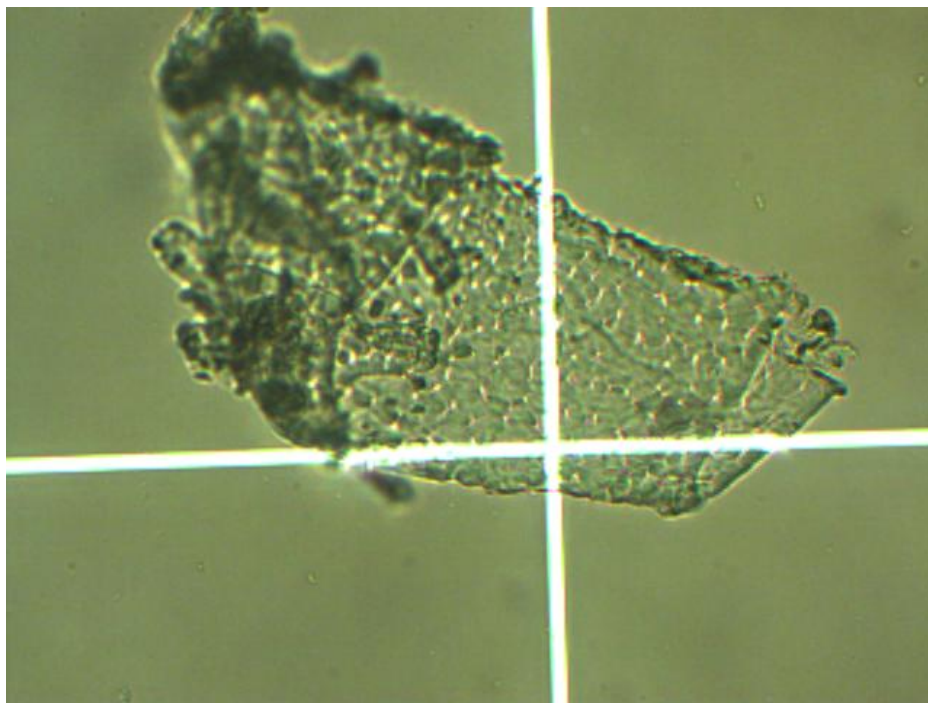


Figura B-0-3 Biofilm que producen los microorganismos desnitrificantes del sistema SND-SBR. (40x Aumento).

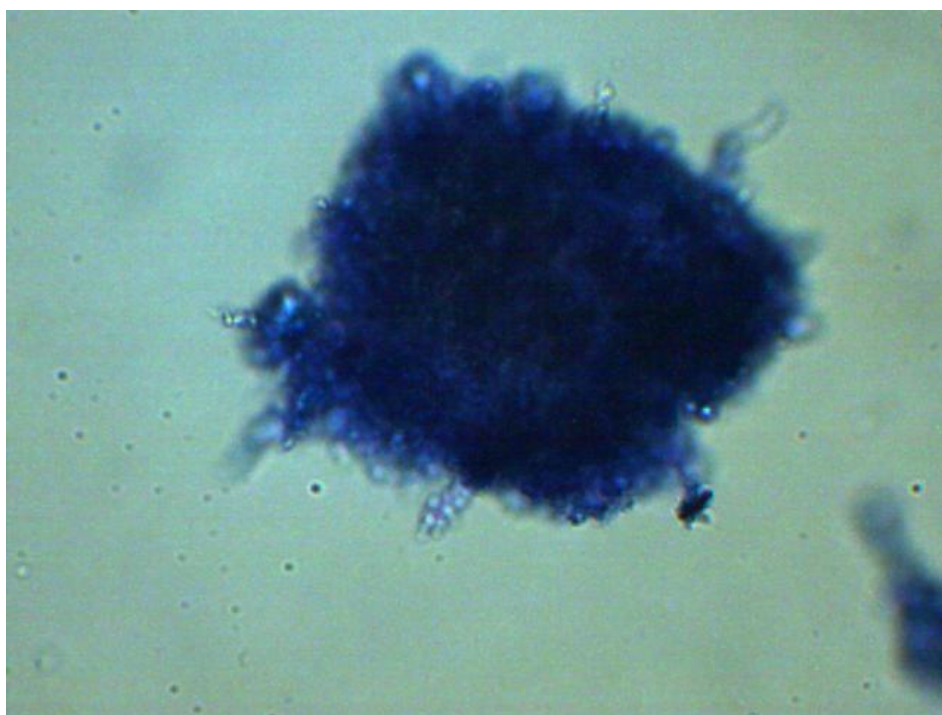


Figura B-0-4 Cúmulo de microorganismos bajo tinción. Se aprecian levaduras. (40x Aumento).

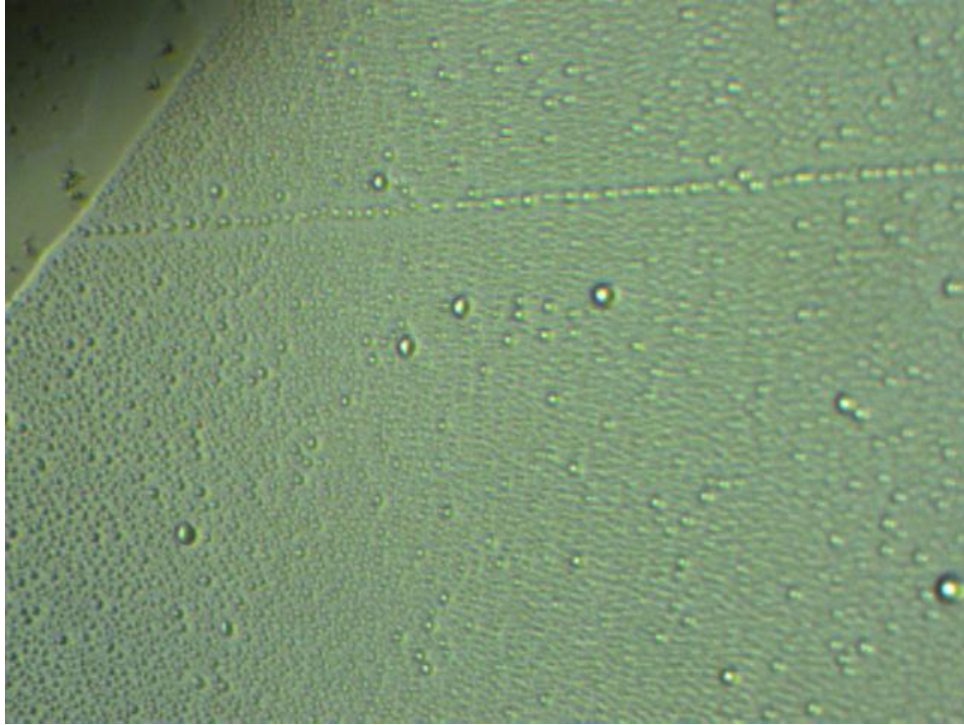


Figura B-0-5 Microorganismos (se identifican levaduras) adheridos a la pastilla de azufre. (40x Aumento).

C. Estudio cinético

A continuación se muestran los datos experimentales obtenidos en los experimentos de nitrificación y de desnitrificación.

Tabla C-0-1 Resultados Experimentales de los Experimentos de Nitrificación.

tiempo [h]	0	0,5	1	1,5	2	4	5	6	7	9	10,5	12
X _{BAO1} mg/L	104,25	104,65	106,47	109,97	113,41	117,98		121,58				
X _{BAO2} mg/L	104,25	104,35	104,8	104,97	105,28	105,38		105,48				
X _{BAO3} mg/L	104,25	104,76	105,69	106,64	107,21	108,56	108,83		109,15	109,68		110,18
X _{BAO4} mg/L	104,25	105,17	106,65	107,98	109,22	109,76	110,32		110,98	111,27	112,42	
X _{BNO1} mg/L	29,79	30,05	30,43	31,10	31,74	32,21		33,91				
X _{BNO2} mg/L	29,79	29,80	29,86	29,93	29,99	30,06		30,14				
X _{BNO3} mg/L	29,79	29,85	30,15	30,35	30,58	30,77	30,89		31,11	31,39		31,65
X _{BNO4} mg/L	29,79	29,91	30,34	30,49	30,65	30,87	30,97		31,26	31,53	31,77	
NH ₄ ⁺ alto mg/L (1)	400,81	392,17	380,48	363,66	344,34	325,73		283,64				
NH ₄ ⁺ bajo mg/L (2)	11,1	10,47	8,79	6,96	5,37	3,54		1,83				
NH ₄ ⁺ medio mg/L (3)	50,02	47,65	38,94	32,81	26,41	20,93	18,08		13,26	8,53		6,07
NH ₄ ⁺ medio mg/L (4)	53,92	49,93	38,72	33,76	29,1	22,45	20,11		13,21	7,57	5,79	
NO ₂ ⁻ alto mg/L (1)	10,53	12,43	14,18	16,29	19,24	26,76		32,68				
NO ₂ ⁻ bajo mg/L (2)	0,26	0,62	0,91	1,09	1,23	1,39		1,15				
NO ₂ ⁻ medio mg/L (3)	0,96	1,94	2,83	4,04	4,8	6,15	6,07		5,57	4,15		
NO ₂ ⁻ medio mg/L (4)	0,25	1,25	2,32	3,91	4,57	6,01	5,99		5,52	4,58		

Tabla C-2 Resultados Experimentales Experimentos de Desnitrificación.

tiempo [h]	0	4	9	12	13	15	17	21	26
N-NO ₃ ⁻ Barrido 1 mg/L	430,06	417,49	403,42		387,2		364,08		313,48
Sulfatos Barrido 1 mg/L	95,61	190,42	296,59		418,92		593,29		975,00
N-NO ₃ ⁻ Barrido 2 mg/L	189,3	171,41	165,14	156,56		145,81		128,73	
Sulfatos Barrido 2 mg/L	94,28	240,48	338,7	423,73		474,16		580,13	

D. Método numérico de Runge-Kutta

A continuación, se plantean el conjunto de fórmulas para llevar el método genérico iterativo, con ecuaciones diferenciales explícitas e implícitas, lo que permite la resolución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales. El sistema para la oxidación del amonio es el siguiente:

$$\frac{dC_{N-NH_4^+}}{dt} = -\frac{\mu_{AOB}}{Y_{\frac{B_{AOB}}{NH_4^+}}} \cdot X_{AOB} = P(C_{N-NH_4^+}, X_{AOB}, t)$$

$$\frac{dX_{AOB}}{dt} = \mu_{AOB} X_{AOB} = Q(C_{N-NH_4^+}, X_{AOB}, t)$$

Las concentraciones iniciales (condiciones iniciales) son conocidas:

$$C_{N-NH_4^+}(t = 0) = C_{N-NH_4^+} \text{ inicial}$$

$$X_{AOB}(t = 0) = X_{AOB} \text{ inicial}$$

Para una cinética de tipo Monod:

$$\mu_{AOB} = \mu_{\max_{AOB}} \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_{S_{AOB}} + C_{N-NH_4^+}} = f(C_{N-NH_4^+}, K_{S_{AOB}}, \mu_{\max_{AOB}})$$

Y para una cinética de tipo Haldane:

$$\mu_{AOB} = \mu_{\max_{AOB}} \frac{C_{N-NH_4^+}}{K_{S_{AOB}} + C_{N-NH_4^+} + \frac{C_{N-NH_4^+}^2}{K_{i_{AOB}}}} = f(C_{N-NH_4^+}, K_{S_{AOB}}, K_{i_{AOB}}, \mu_{\max})$$

La siguiente iteración viene dada por:

$$t_{i+1} = t_i + h ; h \text{ es la magnitud del paso}$$

$$h = \frac{t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}}}{n} ; n = \text{número de iteraciones}$$

$$C_{N-NH_4^+ i+1} = C_{N-NH_4^+ i} + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \cdot h$$

$$X_{AOB i+1} = X_{AOB i} + \frac{1}{6}(k_{a1} + 2k_{a2} + 2k_{a3} + k_{a4}) \cdot h$$

En donde:

$$k_1 = P(C_{N-NH_4^+ i}, X_{AOB i}, t_i)$$

$$k_{a1} = Q(C_{N-NH_4^+ i}, X_{AOB i}, t_i)$$

$$k_2 = P(C_{N-NH_4^+ i} + \frac{1}{2}k_1 \cdot h, X_{AOB i} + \frac{1}{2}k_{a1} \cdot h, t_i + \frac{h}{2})$$

$$\begin{aligned}
k_{a2} &= Q(C_{N-NH_4^+} + \frac{1}{2}k_{a1} \cdot h, X_{AOB_i} + \frac{1}{2}k_{a1} \cdot h, t_i + \frac{h}{2}) \\
k_3 &= P(C_{N-NH_4^+} + \frac{1}{2}k_2 \cdot h, X_{AOB_i} + \frac{1}{2}k_2 \cdot h, t_i + \frac{h}{2}) \\
k_{a3} &= Q(C_{N-NH_4^+} + \frac{1}{2}k_{a2} \cdot h, X_{AOB_i} + \frac{1}{2}k_{a2} \cdot h, t_i + \frac{h}{2}) \\
k_4 &= P(C_{N-NH_4^+} + k_3 \cdot h, X_{AOB_i} + k_3 \cdot h, t_i + h) \\
k_{a4} &= Q(C_{N-NH_4^+} + k_{a3} \cdot h, X_{AOB_i} + k_{a3} \cdot h, t_i + h)
\end{aligned}$$

Para la oxidación de nitrito el procedimiento es el mismo, solo que las funciones que describen el sistema de ecuaciones diferenciales, P y Q , son distintas:

$$\begin{aligned}
\frac{dC_{N-NO_2^-}}{dt} &= \frac{\mu_{AOB}}{Y_{\frac{BAOB}{NH_4^+}}} \cdot X_{AOB} - \frac{\mu_{NOB}}{Y_{\frac{BNOB}{NO_2^-}}} \cdot X_{NOB} = P(C_{N-NO_2^-}, X_{NOB}, t) \\
\frac{dX_{NOB}}{dt} &= \mu_{NOB} X_{NOB} = Q(C_{N-NO_2^-}, X_{NOB}, t)
\end{aligned}$$

Notar que el primer termino de P , correspondiente a la oxidación de amonio, es conocido mediante las iteraciones anteriores, por ende, solo el término de consumo de nitrito es desconocido. Las concentraciones iniciales (condiciones iniciales) también son conocidas:

$$C_{N-NO_2^-}(t = 0) = C_{N-NO_2^-} \text{ inicial}$$

$$X_{NOB}(t = 0) = X_{NOB} \text{ inicial}$$

Luego, siguiendo la misma metodología que para la oxidación de amonio, es posible obtener la resolución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales.

E. Balance de Materia: Nitrógeno en el sistema.

Tabla E-1 Balance de Materia con respecto al nitrógeno.

Nº de Ciclo	Tiempo [d]	Volumen del reactor [L]	N-NH ₄ ⁺ en alimentación [mg]	N total al inicio del ciclo [mg]	N-NH ₄ ⁺ al final del ciclo [mg]	N-NO ₃ ⁻ al final del ciclo [mg]	N-NO ₂ ⁻ al final del ciclo [mg]	N total al final del ciclo [mg]
1	0	2,35	177,33	230,26	116,93	51,98	2,22	54,21
2	3	2,27	177,33	309,93	103,81	34,20	1,46	35,66
3	6	2,35	177,33	244,84	68,08	1,96	12,55	14,51
4	9	2,35	177,33	200,26	46,01	16,18	100,27	116,45
5	12	2,35	177,33	230,26	38,30	30,21	216,74	246,95
6	15	2,39	177,33	309,93	3,57	17,09	93,31	110,41
7	18	2,21	177,33	244,84	2,95	37,21	82,76	119,97
8	21	1,98	212,80	200,26	0,95	12,78	78,45	91,24
9	24	2,29	212,80	202,07	4,07	26,67	52,57	79,24
10	27	2,16	212,80	231,05	3,43	59,01	0,13	59,14
11	30	2,29	255,36	230,15	11,08	89,66	0,12	89,78
12	33	2,16	255,36	224,99	1,90	186,94	0,96	187,91
13	36	2,37	255,36	275,45	3,84	119,14	0,16	119,30
14	39	2,45	255,36	294,09	0,94	246,76	0,11	246,87
15	42	2,39	255,36	280,00	1,09	256,44	0,12	256,56
16	45	2,27	255,36	355,90	0,89	291,05	0,02	291,06
17	48	2,45	255,36	357,25	0,90	361,05	0,29	361,33
18	51	2,43	212,80	364,54	0,74	294,23	0,04	294,27
19	54	2,16	212,80	378,47	1,05	181,12	0,12	181,23
20	57	2,14	212,80	315,30	0,78	203,71	0,05	203,76
21	60	2,16	212,80	292,08	0,77	200,99	0,05	201,04
22	61	2,20	212,80	295,22	0,68	286,56	0,00	286,56
23	66	2,18	212,80	295,97	0,69	186,39	0,03	186,42
24	69	2,20	212,80	313,09	1,23	173,54	0,14	173,69
25	72	2,21	212,80	292,01	0,37	65,49	0,06	65,55
26	75	2,31	212,80	290,25	0,63	43,31	0,08	43,39
27	78	2,06	223,44	263,76	0,57	119,24	0,27	119,51
28	81	2,48	223,44	252,10	1,19	277,33	0,11	277,44
29	84	2,31	223,44	269,00	0,81	163,78	0,12	163,89
30	87	2,16	223,44	307,57	0,51	161,31	0,03	161,34

Nº de Ciclo	Tiempo [d]	Volumen del reactor [L]	N-NH ₄ ⁺ en alimentación [mg]	N total al inicio del ciclo [mg]	N-NH ₄ ⁺ al final del ciclo [mg]	N-NO ₃ ⁻ al final del ciclo [mg]	N-NO ₂ ⁻ al final del ciclo [mg]	N total al final del ciclo [mg]
31	90	2,16	223,44	310,14	0,62	112,76	0,01	112,77
32	93	2,31	223,44	299,45	7,19	133,11	0,14	133,25
33	99	2,14	223,44	304,28	0,81	172,63	0,05	172,68
34	102	2,10	223,44	294,26	0,71	132,58	0,02	132,59
35	105	2,10	223,44	296,11	0,76	122,78	0,02	122,79
36	108	2,10	234,61	306,95	0,45	187,56	0,02	187,58
37	111	2,14	223,44	298,33	0,54	178,35	0,02	178,37
38	114	2,20	212,27	270,89	0,40	183,68	0,02	183,69
39	117	2,25	223,44	308,87	0,44	187,85	0,02	187,87
40	120	2,25	245,78	310,11	0,38	187,85	0,02	187,87
41	123	2,25	223,44	311,13	2,53	192,58	1,24	193,82
42	126	2,12	201,10	274,43	0,72	157,26	0,01	157,27
43	129	2,29	223,44	273,80	0,43	234,25	0,03	234,29
44	133	2,27	212,27	310,84	3,15	231,25	0,26	231,51
45	136	2,12	223,44	303,76	1,69	174,48	0,24	174,73
46	139	2,12	212,27	320,04	0,72	85,44	1,01	86,45
47	142	2,27	245,78	316,73	1,15	89,36	63,07	152,44
48	145	2,25	201,10	267,88	1,10	116,94	92,83	209,77
49	148	2,21	245,78	273,47	13,61	101,79	0,87	102,66
50	151	2,21	223,44	318,61	6,08	89,06	0,73	89,79
51	154	2,21	201,10	276,14	9,55	87,00	0,71	87,71