

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Eliminación conjunta de nitrógeno y metano  
disuelto de biorreactores anaerobios mediante  
el empleo de un biorreactor híbrido con  
biomasa en suspensión y biopelículas

MÁSTER EN ENXEÑARÍA AMBIENTAL  
ESCOLA TÉCNICA SUPERIOR DE ENXEÑARÍA

**María Nieves Carballo Costa**

Santiago de Compostela, Febrero 2016



**Juan Manuel Garrido Fernández**, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela,

**INFORMA**

Que la alumna M<sup>ª</sup> Nieves Carballo Costa realizó bajo su dirección el trabajo titulado “Eliminación conjunta de nitrógeno y metano disuelto de biorreactores anaerobios mediante el empleo de un biorreactor híbrido con biomasa en suspensión y en biopelículas” el cual presenta como Trabajo Fin de Máster para la obtención del título de Máster Universitario en Ingeniería Ambiental por la Universidad de Santiago de Compostela.

Santiago de Compostela, 17 de febrero de 2016

El tutor:

La alumna:

Juan Manuel Garrido Fernández

M<sup>ª</sup> Nieves Carballo Costa



# ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
NOMENCLATURA .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1.Tratamiento anaerobio metanogénico .....	13
1.1.1.Reactores UASB.....	14
1.2.Post-tratamiento de reactores anaerobios metanogénicos UASB .....	17
1.2.1 Eliminación de nitrógeno .....	18
1.2.2. Eliminación de metano.....	24
2. OBJETIVOS .....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1.Equipo experimental .....	37
3.2.Condiciones operacionales .....	42
3.3.Métodos analíticos.....	44
3.3.1.Fase líquida.....	44
3.3.2.Fase sólida .....	54
3.3.3.Fase gaseosa.....	58
3.4.Cálculos y balances.....	60
3.4.1.Eliminación de DQO .....	60
3.4.2.Eliminación de metano .....	61
3.4.3.Eliminación de nitrógeno .....	62
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
4.1. Arranque y optimización del sistema .....	67
4.2. Eliminación de DQO .....	71
4.3. Eliminación de metano.....	73
4.4. Eliminación de nitrógeno .....	76
4.5.Estudios de sedimentabilidad de lodos.....	79
5. CONCLUSIONES .....	85
6. BIBLIOGRAFÍA.....	89

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Géneros bacterianos de amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes. Fuente: Metcalf&Eddy (2004) .....	19
<b>Tabla 3.1.</b> Toma de muestra, análisis a realizar y frecuencia para SIAL. ....	44
<b>Tabla 4.1.</b> Relaciones molares experimentales. ....	75
<b>Tabla 4.2.</b> Relaciones molares teóricas para procesos de desnitrificación con metano. ....	75
<b>Tabla 4.3.</b> Valores de IVL y VSL del sistema. ....	79

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Etapas, reacciones y microorganismos involucrados en AMO-D. Fuente: Modin <i>et al.</i> (2007) .....	26
<b>Figura 1.2.</b> Ruta de oxidación de metano por bacteria metanótrofas. Fuente: Modin <i>et al.</i> (2007) .....	26
<b>Figura 1.3.</b> Interacciones observadas entre poblaciones bacterianas en biorreactores alimentados con metano en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno. Fuente: Haroon <i>et al.</i> (2013) .....	29
<b>Figura 3.1.</b> Planta piloto experimental: 1) Reactor UASB; 2) Biorreactor híbrido. ....	37
<b>Figura 3.2.</b> Configuración del biorreactor híbrido: 1) Cámara anóxica; 2) Cámara aerobia; 3) Decantador. ....	38
<b>Figura 3.3.</b> Soportes para el desarrollo de biopelículas presentes en la cámara anóxica (Levapor®) (izquierda) y en la cámara aerobia (Biochips®) (derecha). ....	39
<b>Figura 3.4.</b> Corrientes involucradas en el reactor híbrido: 1) Efluente del reactor metanogénico UASB; 2-3) Recirculación cámaras aerobia-anóxica; 4-5) Recirculación lodos decantador; 6) Efluente biorreactor híbrido. ....	40
<b>Figura 3.5.</b> Sistemas de agitación en cámaras reactor híbrido: 1) Agitador IKA; 2) Conducciones entrada aire desde la soplante y sonda de nivel en decantador (3). ....	41
<b>Figura 3.6.</b> Ritter MilliGascounter®. ....	59
<b>Figura 3.7.</b> Botella Pyrex y jeringa para toma muestra fase gaseosa. ....	60
<b>Figura 4.1.</b> Imagen de fango ascendente en el decantador del sistema. ....	68
<b>Figura 4.2.</b> Cambio disposición de la recirculación de lodos del sistema: 1) Original; 2) Nueva. ....	69
<b>Figura 4.3.</b> Imagen de fango ascendente en decantador. ....	70
<b>Figura 4.4.</b> Imagen del biorreactor con el agitador instalado en el decantador. ....	70
<b>Figura 4.5.</b> Porcentajes de eliminación de DQOT del reactor metanogénico y del sistema global. ....	72
<b>Figura 4.6.</b> Porcentajes de eliminación de metano en la cámara anóxica. ....	73
<b>Figura 4.7.</b> Tasas de eliminación volumétricas y específicas de metano. ....	74
<b>Figura 4.8.</b> Eliminación de NT en el sistema. ....	76
<b>Figura 4.9.</b> Concentración de $N-NO_2^-$ y $N-NO_3^-$ en la cámara aerobia. ....	77
<b>Figura 4.10.</b> Tasas volumétricas de eliminación de especies de amonio, nitrito y nitrato en la cámara anóxica. ....	78
<b>Figura 4.11.</b> Gráfica de la VSL de un lodo con buenas características de sedimentación. ....	80

<b>Figura 4.12.</b> Gráfica de la VSL de un lodo con malas características de sedimentación. ....	80
<b>Figura 4.13.</b> Concentración de SSTLM y SSVLM en la cámara aerobia. ....	81
<b>Figura 4.14.</b> Comparativa de calidad del sobrenadante en ensayo de IVL. ....	82
<b>Figura 4.15.</b> Imágenes de biomasa de cámara aerobia a 10X. ....	82
<b>Figura 4.16.</b> Imágenes de la biomasa de la cámara aerobia mediante microscopía óptica 40X. ....	83
<b>Figura 4.17.</b> Evolución de la concentración de SST en el efluente del sistema. ....	84

## **NOMENCLATURA**

AF: Filtro anaerobio (del inglés, *Anaerobic Filter*)

AGV: Ácidos Grasos Volátiles

AMO-D: Oxidación aerobia de metano asociada a desnitrificación (del inglés *Aerobic Methane Oxidation coupled to Denitrification*)

Anammox: Oxidación anaerobia de amonio (del inglés *Anaerobic Ammonium Oxidation*)

AnMO-D: Oxidación anaerobia de metano asociada a desnitrificación (del inglés *Anaerobic Methane Oxidation coupled to Denitrification*)

AnMBR: Reactor biológico anaerobio de membrana (del inglés *Anaerobic Membrane Biorreactors*)

BAO: Bacterias Amonio Oxidantes

BNO: Bacterias Nitrito Oxidantes

CI: Carbono Inorgánico

COT: Carbono Orgánico Total

CT: Carbono Total

DBO: Demanda Bioquímica de Oxígeno

DQO: Demanda Química de Oxígeno

DQOT: Demanda Química de Oxígeno Total

DQOS: Demanda Química de Oxígeno Soluble

EGSB: Reactor de Lecho Expandido (del inglés *Expanded Granular Sludge Bed*)

Eh: Potencial redox

FAS: Sulfato Amónico Ferroso (del inglés *Ferrous Ammonium Sulphate*)

FID: Detector de ionización de llama (del inglés *Flame Ionization Detector*)

FISH: Hibridación fluorescente in situ (del inglés *Fluorescence in situ hybridization*)

F/M: Relación alimentación-microorganismos (del inglés *Feed/Microorganisms*)

GEI: Gases Efecto Invernadero

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión (del inglés *High Pressure Liquid Chromatography*)

LM: Licor de mezcla

N-DAMO: Oxidación anaerobia de metano dependiente de nitrito (del inglés *Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation*)

NDIR: Detector Infrarrojo No Dispersivo (del inglés *Non Dispersive Infrared Analyzer*)

NED: N-(1-naftil)-etilendiamina

OD: Oxígeno disuelto

PLC: Control Lógico Programado (del inglés *Programmable Logic Controller*)

PDS: Polidimetilsiloxano

SD: Sólidos Disueltos

SST: Sólidos en Suspensión Totales

SSTLM: Sólidos en Suspensión Totales Licor de Mezcla

SSV: Sólidos en Suspensión Volátiles

SSVLM: Sólidos en Suspensión Volátiles Licor de Mezcla

ST: Sólidos Totales

SV: Sólidos Volátiles

UASB: Reactor de manto de lodos (del inglés *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

TRC: Tiempo de Residencia Celular

TRH: Tiempo de Residencia Hidráulico

UV: Ultravioleta

VCO: Velocidad de Carga Orgánica

## **1. INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Tratamiento anaerobio metanogénico

Se puede definir la digestión anaerobia metanogénica como el proceso de transformación biológico de la materia orgánica en biogás, formado principalmente por CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Metcalf&Eddy, 1995).

La conversión anaerobia de la materia orgánica es llevada a cabo por un consorcio bacteriano encargado de transformar una mezcla compleja de sustratos en metano gas a través de una serie de compuestos intermedios (Speece, 1996).

La reacción tiene lugar en cuatro etapas en serie: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Inicialmente, los compuestos orgánicos complejos de alto peso molecular tales como polisacáridos o proteínas son hidrolizados a compuestos orgánicos más simples que, a continuación, son fermentados a ácidos grasos volátiles (AGV) por bacterias facultativas y anaerobias estrictas denominadas bacterias formadoras de ácidos. Los ácidos grasos volátiles de más de 2 átomos de carbono son transformados en la siguiente fase en ácido acético e hidrógeno gas. Finalmente, el ácido acético y el hidrógeno son transformados en metano y dióxido de carbono por organismos metanogénicos del grupo *Archaea* (Speece, 1996; Metcalf&Eddy, 1995).

El uso de procesos anaerobios metanogénicos está muy extendido tanto en el tratamiento de aguas residuales urbanas como industriales. Este tipo de tecnología se utiliza ampliamente en países con climas tropicales o cálidos para el tratamiento de aguas residuales urbanas, a temperatura ambiente, o para el tratamiento de aguas residuales industriales con alta concentración de materia orgánica aunque operando normalmente el biorreactor a temperaturas de uno 35-37 °C en sistemas anaerobios mesófilos o 55-60° C en sistemas anaerobios termófilos (Garrido Fernández *et al.*, 2013).

Entre las tecnologías de tratamiento anaerobio desarrolladas en las últimas décadas se pueden destacar el filtro anaerobio (AF, del inglés *Anaerobic Filter*), los reactores de mantos de lodos (UASB, del inglés *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) y los reactores de lecho expandido (EGSB, del inglés *Expanded Granular Sludge Bed*) (Speece, 1996). De entre estas tecnologías solamente la de reactores UASB ha tenido cierto éxito para el tratamiento de aguas residuales urbanas debido a su simplicidad y facilidad de operación (Garrido *et al.*, 2013).

El tratamiento anaerobio de aguas residuales, en muchos casos seguidos de unidades de post-tratamiento aerobio, fue considerado como una alternativa al tratamiento convencional

de aguas residuales utilizadas históricamente, tales como sistemas de lodos activos o lagunas aireadas (Chernicacho *et al.*, 2015).

### **1.1.1. Reactores UASB**

El interés en tecnologías de tratamiento anaerobias de aguas residuales de alta carga mediante reactores de tipo UASB ha ido en aumento desde su introducción a mediados de la década de los 80 (Lettinga *et al.*, 1980).

Aunque inicialmente los reactores UASB se utilizaban principalmente en el tratamiento de aguas residuales de alta carga, a día de hoy, la tecnología UASB ofrece una manera simple y eficaz de reducir la presencia de contaminantes orgánicos de aguas residuales urbanas en regiones cálidas o tropicales del planeta tales como India, Pakistán, China, Colombia, Brasil, Indonesia o Egipto, en las que el agua residual presenta una temperatura mayor de 20° C a lo largo de todo el año (Hulshoff *et al.*, 1998).

Recientemente, un estudio llevado a cabo en América Latina (Noyola *et al.*, 2012) ha identificado a los reactores metanogénicos UASB como la tercera tecnología de tratamiento de este tipo de aguas por número de instalaciones y la cuarta por capacidad de tratamiento en esta región.

#### **1.1.1.1. Ventajas de los sistemas anaerobios**

Las tecnologías de tratamiento anaerobio incluyen entre sus principales ventajas su capacidad de eliminación de altas cargas de materia orgánica, la producción de biogás así como una baja producción de lodos en comparación con los sistemas de tratamiento aerobios convencionales (Rajeshwari *et al.*, 2000; van Lier *et al.*, 2001; van Lier, 2008).

La baja tasa de crecimiento microbiano característica de los procesos anaerobios se traduce en una producción de lodo entre 6 y 8 veces menor que la generada en un proceso aerobio (Metcalf&Eddy, 2004). Este hecho es importante desde el punto de vista económico, puesto que la gestión de lodos representa uno de los principales costes en el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, durante la inoculación de los primeros reactores anaerobios a gran escala, esta característica supuso un gran inconveniente puesto que dificultaba el aumento de la concentración de biomasa retenida en este tipo de reactores, directamente relacionada con la capacidad de tratamiento del sistema (Speece, 1996). A día de hoy, para reducir el tiempo de arranque de los reactores anaerobios se suelen inocular los nuevos reactores con biomasa procedente de otros reactores similares.

Otra ventaja importante de la lenta tasa de crecimiento de la biomasa es que esta puede sobrevivir durante períodos de tiempo largos (meses) sin ser alimentada, debido a los bajos requerimientos tanto de macro (N, P, S) como de micronutrientes (Fe, Zn, etc) de los microorganismos.

Para alcanzar altas tasas de eliminación de materia orgánica en aguas residuales mediante el empleo de este tipo de tratamiento, es de vital importancia mantener la biomasa anaerobia de lento crecimiento en el interior del sistema. Por este motivo, se deben desvincular el tiempo de residencia hidráulico (TRH) y el tiempo de residencia celular (TRC) del sistema evitando de esta manera la pérdida de biomasa. Entre las diferentes estrategias de conservación de biomasa empleada en los tratamientos anaerobios cabe destacar el empleo de biomasa granular, como ocurre en el caso de los sistemas UASB mencionados anteriormente, o de diferentes sistemas con membranas como puede ser el caso de los reactores biológicos anaerobios de membrana (AnMBR, del inglés *Anaerobic Membrane Reactor*), entre otros.

El biogás producido puede ser utilizado como fuente de energía alternativa para la generación de electricidad o recuperación de energía en forma de calor y electricidad, rebajando la demanda externa de estos suministros en la planta de tratamiento.

Los procesos de tratamiento anaerobio, al operar con altas concentraciones de biomasa, son más compactos que los sistemas aerobios tradicionales y son capaces de soportar mayores velocidades de carga orgánica (VCO).

Las plantas de tratamiento de reactor UASB seguido de tratamiento biológico aerobio permiten un ahorro de gastos de capital y de operación de entre el 20-50% y de más del 50%, respectivamente, respecto a una planta de lodos activos convencional y de operación (von Sperling and Chenicharo, 2005; Chernicharo, 2006). La reducción de costes de operación se debe principalmente a la ausencia de aireación en los tratamientos anaerobios.

#### **1.1.1.2. Desventajas de los sistemas anaerobios**

Aunque la aplicación de las tecnologías anaerobias de tratamiento de aguas residuales se ha expandido significativamente en las últimas décadas, éstas presentan algunas desventajas tales como problemas de olor debidos principalmente a la presencia de compuestos reducidos de azufre, sensibilidad y variabilidad ante cambios físicos y químicos (pH y temperatura entre otros) o la necesidad de largos períodos de tiempo para la puesta en marcha del reactor.

Los principales problemas que presentan los efluentes de los reactores metanogénicos de tipo UASB que operan a temperaturas de 20º C son:

- Presencia de importantes cantidades de metano. La concentración de metano disuelto en el efluente depende fundamentalmente de la temperatura y presión de operación. Además, ese valor es función de la concentración de demanda química de oxígeno (DQO) del influente y de la carga hidráulica aplicada.

- Presencia de nutrientes (N y P). Tan sólo una pequeña fracción es asimilada por los microorganismos para el crecimiento celular.
- Concentraciones de sólidos elevadas.

La presencia de metano disuelto en los efluentes de los reactores metanogénicos de tipo UASB constituye un problema ambiental importante en términos de emisiones de gases de efecto invernadero. El metano tiene un potencial de calentamiento global 28 veces superior al del dióxido de carbono (IPPC, 2013). En los países de clima tropical, se estima que los efluentes de reactores UASB que operan a 20°C y tratan aguas residuales urbanas con concentraciones de DQO < 1000 mg·L<sup>-1</sup> contienen entre un 30-46% del metano total generado en el sistema anaerobio (Souza *et al.*, 2011) o incluso en cantidades superiores al 50% (Noyola *et al.*, 1988). Este metano disuelto se desorbe fácilmente de los efluentes cuando se descargan directamente en el ambiente o especialmente cuando reciben un post-tratamiento en un biorreactor aerobio, incrementando notablemente la emisión de gases de efecto invernadero asociados a la depuración de aguas residuales.

Dado que el metano representa un grave problema para el calentamiento global, Cakir y Stenstrom (2005) realizaron un estudio comparando la producción de gases de efecto invernadero (GEI) de tecnologías aerobias y anaerobias de tipo UASB en el tratamiento de aguas residuales urbanas a 20° C. Los resultados de dicho estudio revelan que las emisiones de GEI son mayores para los tratamientos anaerobios cuando se tratan influentes con concentraciones de DQO menores de 300 mg/L. Dicho trabajo indica, además, que las emisiones de metano disuelto en el efluente constituyen uno de los puntos débiles de la digestión anaerobia a baja temperatura, constituyendo uno de los puntos de mayor impacto medioambiental en el tratamiento anaerobio, especialmente en tratamientos en el rango mesófilo.

A parte de las desventajas citadas anteriormente, los reactores UASB presentan otros inconvenientes como son los problemas de acumulación de espuma dentro del separador de fases impidiendo la salida del biogás o presencia de organismos patógenos en el efluente del reactor.

### **1.2. Post-tratamiento de reactores anaerobios metanogénicos UASB**

Considerando las limitaciones intrínsecas asociadas a los sistemas anaerobios y las condiciones de vertido a los medios receptores, se ha hecho imperativo incluir sistemas de post-tratamiento de los efluentes de los reactores de tipo UASB.

De acuerdo a la legislación aplicable en cada región, el post-tratamiento debe garantizar la calidad del efluente final en términos de contenido de materia orgánica y nutrientes, así como mejorar la calidad microbiológica de dicha corriente de modo que no se provoquen daños ambientales en el medio receptor, no produzca riesgos para la salud pública y cumpla con las limitaciones impuestas en su reutilización en agricultura, de ser el caso.

Las opciones de post-tratamiento de los efluentes de UASB han sido ampliamente discutidas en la literatura siendo la combinación más utilizada la formada por sistemas de tratamiento anaerobio y post-tratamiento aerobio tales como UASB+Humedales, UASB+Filtros percoladores, UASB+Lodos activos, UASB+Unidad de flotación o UASB+Lagunas de estabilización (von Sperling and Chenicharo, 2005).

Como los valores límite de vertido de los compuestos presentes en los efluentes de las aguas tratadas se prevé que sean cada vez más restrictivos con el tiempo, se está haciendo especial énfasis en el estudio de tecnologías de post-tratamiento de los efluentes de los reactores UASB. Los esfuerzos se están centrando en : 1) eliminación simultánea de amonio y nitrato en reactores estructurados con aeración intermitente (Gadelha *et al.*, 2013); 2) eliminación simultánea de amonio y nitrato en reactores terciarios de lecho fijo aerobio-anóxicos utilizando el biogás como dador de electrones (Pantoja-Filho *et al.*, 2013); 3) uso de dadores de electrones presentes en las fases líquida y gaseosa de los reactores anaerobios para desnitrificación en reactores anaerobios-anóxicos acoplados a reactores de nitrificación (Morga-Sagastume *et al.*, 1994; Souza and Foresti, 2013; Okada and Foresti, 2013); 4) uso de nitrificación parcial a nitrito combinado con oxidación de amonio a nitrógeno gas, reacción conocida como Anammox (Sánchez Guillén *et al.*, 2014, 2015).

### 1.2.1. Eliminación de nitrógeno

La eliminación de nutrientes, principalmente N y P, de origen antropogénico en las aguas residuales es necesaria para evitar problemas de eutrofización y toxicidad en las aguas receptoras.

Los procesos biológicos son los más utilizados para llevar a cabo la eliminación de nutrientes debido a su menor coste en comparación con los fisicoquímicos. Sin embargo, en el caso del P, la eliminación biológica en combinación con la tecnología UASB es virtualmente imposible debido a la presencia de poca materia orgánica biodegradable en el efluente del reactor anaerobio metanogénico, de tal modo que, a día de hoy, este nutriente se elimina mediante precipitación química con sales de hierro y aluminio. (Chernicacho *et al.*, 2015).

El principal compuesto de nitrógeno presente en las aguas residuales es el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La selección de la mejor técnica de eliminación se basa a menudo en criterios de tipo económico aunque, en la práctica, está determinada por la concentración de N en la corriente de agua. Mulder (2003) diferenció tres rangos de concentración:

- a. Agua residual con concentración de amonio  $<100 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ , como puede ser el caso de aguas residuales urbanas. En este caso, los procesos biológicos de lodos activos son los más utilizados.
- b. Agua residual con concentraciones entre  $100\text{-}5000 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ , como es el caso del efluente de digestores anaerobios, para el cual, tras extensas investigaciones, se prefiere el tratamiento biológico. El principal criterio para la elección del proceso biológico en detrimento del fisicoquímico es el económico.
- c. Aguas con concentraciones de amonio superiores a  $5000 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ . En este rango de concentraciones los procesos fisicoquímicos son los únicos factibles técnica y económicamente. Los principales procesos para la eliminación de amonio en estos casos son stripping con aire, intercambio iónico o cloración. El stripping con aire es el más ampliamente utilizado debido a su elevada eficiencia y simple operación.

A continuación, se muestran las principales vías de eliminación biológica de nitrógeno existentes:

#### 1.2.1.1. Nitrificación-desnitrificación

Los procesos de nitrificación-desnitrificación están basados en una secuencia de condiciones aerobia y anóxica. En una primera etapa, el amonio se oxida a nitrato en presencia

de oxígeno para, en una segunda etapa, ser reducido a nitrógeno gas en condiciones anóxicas por bacterias heterótrofas durante el proceso de desnitrificación.

- **Nitrificación**

Nitrificación es el término que se utiliza para describir el proceso biológico de dos etapas en el cual el amonio es oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato. En las condiciones habituales de operación (temperaturas y TRC inferiores a 25° C y 25 días, respectivamente), la oxidación de amonio es la etapa limitante del proceso.

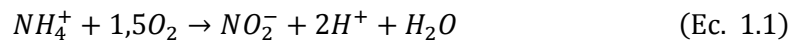
La nitrificación es un proceso aerobio concertado realizado por microorganismos quimiolitautotróficos pertenecientes al filo *Proteobacteria*. Como se ha mencionado anteriormente, la nitrificación consta de dos etapas llevadas a cabo por dos grupos de bacterias diferenciadas: las bacterias amonio-oxidantes (BAO) responsables de la oxidación de amonio a nitrito y las bacterias nitrito-oxidantes (BNO), que llevan a cabo la oxidación de nitrito a nitrato. Estos microorganismos de respiración aerobia estricta, obtienen la energía de los compuestos reducidos de nitrógeno (amonio y nitrito, respectivamente) y usan como fuente de carbono el CO<sub>2</sub> disuelto en el agua.

Según los primeros ensayos sobre nitrificación llevados a cabo por Winogradsky (1891), los géneros de bacterias BAO y BNO dominantes en el tratamiento de aguas residuales son respectivamente *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, si bien según Daims (2000), las bacterias nitrito oxidantes del género *Nitrospira* y no *Nitrobacter* serían las más comunes en plantas de tratamiento de aguas a escala real, en reactores a escala de laboratorio e incluso en muestras ambientales. En la **Tabla 1.1** se recogen otros géneros de BAO y BNO capaces de obtener energía del amonio y del nitrito.

**Tabla 1.1.** Géneros bacterianos de amonio-oxidantes y nitrito-oxidantes. Fuente: Metcalf&Eddy (2004)

BAO	BNO
<i>Nitrosococcus</i>	<i>Nitrosococcus</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrospira</i>
<i>Nitrosorobrio</i>	<i>Nitroeystis</i>

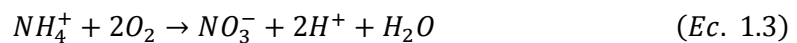
Las BAO son los microorganismos encargados de oxidar el amonio a nitrito a través de un producto intermedio, la hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ). Las bacterias oxidan el amonio a hidroxilamina mediante la enzima amonio mono-reductasa y a continuación, convierten la hidroxilamina en nitrito mediante la enzima hidroxilamina óxido-reductasa. La reacción bioquímica global de oxidación de amonio a nitrito se muestra en la **ecuación 1.1**:



En la segunda etapa del proceso de nitrificación, las BNO oxidan el nitrito a nitrato mediante la enzima nitrito óxido-reductasa (**Ecuación 1.2**).

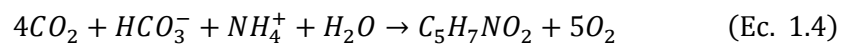


Entonces, la reacción de nitrificación global vendría dada por la **ecuación 1.3**:



De las **ecuaciones 1.1, 1.2 y 1.3** se puede concluir que: 1) la oxidación de amonio a nitrito consume mayor cantidad de oxígeno que la oxidación de nitrito a nitrato ya que, en la primera etapa se necesitan 3,16 g  $\text{O}_2$  para oxidar 1 g  $\text{N-NH}_4^+$  a nitrito mientras que en la segunda etapa se necesitan 1,11 g  $\text{O}_2$  para oxidar 1 g  $\text{N-NO}_2^-$  a nitrato; 2) la nitrificación es un proceso acidificante puesto que por cada mol de amonio oxidado se generan dos protones.

En este sentido, la alcalinidad presente en el agua residual debe ser suficiente para mantener el pH en el rango óptimo (7,0-7,5) para realizar la nitrificación, debido a que se consumen 7,14 g  $\text{CaCO}_3$  por 1 g  $\text{N-NH}_4^+$  oxidado a  $\text{N-NO}_2^-$  (Metcalf and Eddy, 2003). Además se debe tener en cuenta el consumo de  $\text{CO}_2$  por parte de las bacterias para síntesis celular (**Ec. 1.4**) que también produce un impacto sobre el equilibrio del ácido carbónico.



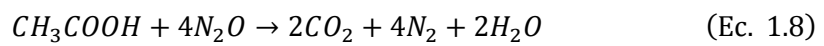
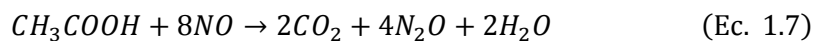
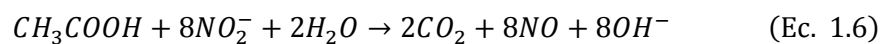
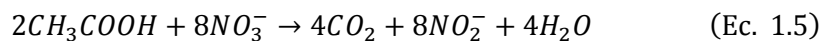
donde  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$  es la fórmula química utilizada para representar biomasa formada.

- **Desnitrificación heterótrofa convencional**

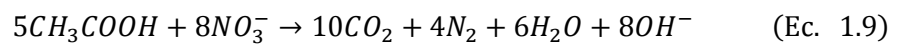
En el proceso de desnitrificación, el nitrato y/o el nitrito presente en el agua residual son reducidos a nitrógeno gas en condiciones anóxicas por acción de microorganismos heterótrofos. El proceso necesita de una fuente de carbono orgánica que actúe como dador de electrones, mientras que las especies oxidadas de nitrógeno actúan como aceptores finales en la cadena de transporte de electrones.

En los procesos de eliminación heterótrofa de nitrógeno, la fuente de carbono orgánico que puede servir como sustrato es típicamente: 1) la DQO biodegradable presente en el agua residual; 2) la DQO biodegradable producida durante la muerte o decaimiento celular; 3) una fuente de carbono exógena, normalmente metanol (CH<sub>3</sub>OH) o ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH). La selección de la fuente de carbono depende de la disponibilidad en el agua residual y del coste económico. La adición de fuentes de carbono externas supondrían un importante coste económico adicional.

La reducción del nitrato a nitrógeno molecular tiene lugar en etapas sucesivas por acción de diferentes enzimas y en ellas se producen como productos intermedios nitrito, óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). A continuación, se muestran las diferentes etapas (**Ec. 1.5 a 1.8**) del proceso de desnitrificación utilizando en este caso ácido acético como fuente de carbono (Vázquez-Padín, 2009).



La reacción estequiométrica global del proceso viene dada por la **ecuación 1.9**:



Con esta reacción queda patente que el proceso de desnitrificación produce un incremento del pH debido a la formación de hidrogeniones (OH<sup>-</sup>). Por cada mol de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reducido se genera un equivalente de alcalinidad o lo que es lo mismo, 3,57 g de alcalinidad (expresado como CaCO<sub>3</sub>) por g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reducido a N<sub>2</sub>. Este ascenso de alcalinidad del proceso de desnitrificación se ve compensado con el descenso debido a la nitrificación cuando el proceso se lleva a cabo de manera conjunta.

El rendimiento del proceso de desnitrificación está íntimamente ligado con la relación C:N (g DQO·g<sup>-1</sup>N), esto es, la relación entre la concentración de materia orgánica biodegradable y nitrógeno en el influente. De este modo, Helmer-Madhok *et al.* (2002) expusieron que para aguas residuales con una relación C:N inferior a 2,5 es necesario adicionar una fuente externa de materia orgánica para completar el proceso de desnitrificación mientras que con una relación C:N superior a 4, la tasa de desnitrificación aumenta en un factor de 1,5 a 1,7.

- **Aplicación con sistemas anaerobios UASB**

Cuando se pretende eliminar nitrógeno, la aplicación de procesos convencionales de nitrificación-desnitrificación son muy utilizados para complementar a los reactores UASB. El proceso no se aplica directamente sobre el efluente del reactor anaerobio, pues éste posee una baja relación C:N de modo que sería necesaria la adición de una fuente de carbono para que la desnitrificación fuese eficiente. En estos casos, se trata una parte del agua residual bruta (entre el 50-70%) en el reactor anaerobio y el resto de dicha corriente se introduce directamente al tratamiento biológico complementario de eliminación de nitrógeno, con el objetivo de que exista suficiente materia orgánica disponible para la etapa de desnitrificación (Chernicharo *et al.*, 2015).

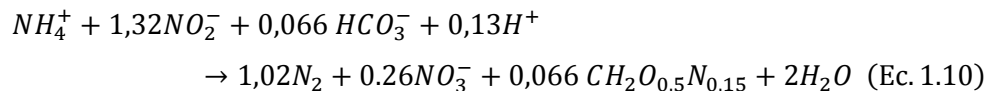
### 1.2.1.2. Oxidación anaerobia de amonio

Otra posibilidad para eliminar amonio de aguas residuales con bajas relaciones C:N consiste en la eliminación autótrofa de nitrógeno mediante el proceso Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation).

Durante mucho tiempo se pensó que la oxidación de amonio sólo podía tener lugar de forma aerobia. Broda (1977) predijo, usando cálculos termodinámicos, la existencia de bacterias quimiolitautótrofas capaces de oxidar amonio usando nitrito como aceptor de electrones. Esta predicción fue confirmada experimentalmente dos décadas después por Mulder *et al.*, (1995) en una planta piloto de desnitrificación en la cual se trataban aguas de una planta de producción de levaduras. Este nuevo sistema de desnitrificación fue patentado en 1992 (EP-0-327-184-A1) con el nombre de Anammox.

Las bacterias Anammox, pertenecientes al género *Planctomyces*, convierten el amonio directamente en nitrógeno gas en presencia de nitrito, el cual actúa como aceptor de electrones. La reacción tiene lugar en condiciones anóxicas empleando las bacterias el bicarbonato como fuente de carbono.

La **ecuación 1.10** (Strous *et al.*, 1998) muestra la estequiometría del proceso:



Como se puede en la reacción, la relación molar nitrito:amonio en el influente debe ser de 1,32 moles de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por mol de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. En muchos casos, para conseguir esta relación molar en las aguas residuales a tratar mediante el proceso Anammox es necesaria una etapa previa, de nitrificación parcial, en la cual BAO oxiden parcialmente el amonio a nitrito. Este proceso de

nitritación parcial previo puede llevarse a cabo en un único reactor de manera conjunta con el proceso Anammox o de manera independiente disponiendo dos reactores en serie.

Además en el proceso, se genera una pequeña cantidad de nitrato ( $0,26 \text{ moles NO}_3^- \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+_{\text{eliminado}}$ ) por oxidación de una parte del nitrito en condiciones anaerobias (Strous *et al.*, 1998) y un consumo de protones ( $0,13 \text{ moles H}^+ \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+_{\text{eliminado}}$ ) provocando un aumento de pH debida a la actividad de la biomasa.

Las bacterias Anammox se caracterizan por tener un crecimiento muy lento con tiempos de duplicación celular de 11 días (Strous *et al.*, 2002). Este lento crecimiento de las bacterias presenta ventajas como la reducción de la producción de lodos y por tanto, de los costes de gestión asociados. La principal desventaja son los largos tiempos necesarios y la dificultad de arranque de este tipo de reactores.

Los principales factores que afectan al desarrollo de los organismos Anammox son temperatura, pH, concentración de oxígeno, velocidad de agitación, concentraciones de amonio, nitrito y nitrato y concentración de materia orgánica. La temperatura óptima del proceso se encuentra entre 37-43° C (Strous *et al.*, 1999b); el rango de pH activo se encuentra entre 6,7-8,3 (Jetten *et al.*, 1999; Egli *et al.*, 2001) y la velocidad de agitación debe mantenerse entre 60 y 180 rpm.

La presencia de oxígeno y de nitrito produce la inhibición de las bacterias Anammox. Concentraciones de oxígeno superiores al 0,5% del oxígeno disuelto de saturación producen la inhibición de la biomasa (Strous *et al.*, 1997) si bien esta inhibición es reversible al restablecer las condiciones anaerobias en el interior del reactor. En cuanto a la inhibición por nitrito, no existe consenso en la literatura en cuanto a los valores de concentración a partir de los cuales se produce. Por ejemplo, Straus *et al.*, (1999a) dan un valor de  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  como completamente inhibitorio mientras que Dapena-Mora *et al.*, (2007) indican que concentraciones de nitrito de  $350 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  corresponden sólo a un 50% de inhibición de la bacteria. En cualquier caso, hasta el momento lo que se tiene claro es que se debe mantener la concentración de nitrito en valores bajos para evitar la ruptura total del proceso ya que cuando el nitrito empieza a acumularse en el sistema se produce el fallo del reactor (Dapena-Mora *et al.*, 2004a).

Aunque se han encontrado varios organismos Anammox como *Candidatus "Brocardia Anammoxidans"*, *Candidatus "Kuenenia stuttgartiensis"*, *Candidatus "Scalindua sorokinii"*, *Candidatus "Scalindua brodae"*, *Candidatus "Scalindua wagneri"*, *Candidatus "Brocardia fulgida"* y *Candidatus "Anammoxoglobus propionicus"*, los estudios de enriquecimiento u operación de procesos Anammox se han llevado a cabo con *C. "Brocardia"* o *C. "Kuenenia"*.

Por lo que se ha expuesto hasta el momento, la eliminación autótrofa de nitrógeno de efluentes de reactores anaerobios mediante el proceso Anammox presenta una serie de ventajas frente al proceso convencional de nitrificación-desnitrificación entre las que se destacan: 1) aumento de la capacidad de eliminación de nitrógeno de la planta; 2) reducción de la cantidad de lodos producidos ya que la productividad de la biomasa autótrofa (nitrificante y Anammox) es menor que la heterótrofa (desnitrificante); 3) reducción de la contribución a los gases de efecto invernadero; 4) reducción de las necesidades de aporte de oxígeno respecto a la nitrificación convencional y, por tanto, menor consumo energético; 5) eliminación de costes asociados al consumo de fuentes de carbono externas.

### **1.2.2. Eliminación de metano**

El metano tiene un potencial de calentamiento global 28 veces superior al del dióxido de carbono (IPPC, 2013). Ante la problemática de tipo ambiental que esto constituye se pueden plantear dos opciones: 1) No tratar los efluentes de los reactores anaerobios metanogénicos y dejar que el metano se desorba contribuyendo al calentamiento global; 2) Utilizar tecnologías para separar y/o eliminar el metano disuelto en dichas corrientes.

Descartando la primera de las opciones, irresponsable desde el punto de vista ambiental, dentro de los procesos de eliminación de metano se puede destacar por su simplicidad la desorción. En este sentido, Cookney *et al.*, (2012) obtuvieron eficacias de recuperación de metano del 72 % en efluentes de reactores UASB utilizando contactores de membrana de polidimetilsiloxano (PMDS) en los cuales la desorción tiene lugar mediante nitrógeno gas. Asimismo, Cookney *et al.*, (2016) realizaron estudios sobre estas mismas corrientes utilizando membranas de fibra hueca no porosa. Por lo general, la desorción está acoplada a procesos de incineración (Scheutz *et al.*, 2009) o biofiltración (Park *et al.*, 2009), presentando ambas opciones desventajas: necesidad de un sistema de combustión en el cual emplear la corriente de gas y bajas eficacias del sistema, respectivamente.

Mediante la aplicación de estos procesos sólo se elimina metano del efluente del UASB, pero no nitrógeno. Es entonces cuando se plantea la necesidad de estudiar la viabilidad técnica y económica de los procesos biológicos de eliminación de metano en fase líquida, en los cuales tiene lugar la eliminación de ambas especies de manera conjunta.

#### **1.2.2.1. Eliminación biológica de metano en fase líquida**

Generalmente para llevar a cabo la eliminación de nitrógeno en aguas residuales se utilizan procesos de nitrificación-desnitrificación. En ocasiones, cuando la relación C:N es muy baja, como es el caso de los efluentes de los reactores UASB, es necesario añadir una fuente de

carbono externa (metanol, etanol, acetato, azúcares) para que tenga lugar la desnitrificación, encareciendo el proceso.

Los reactores anaerobios son capaces de eliminar grandes fracciones de DQO pero no de nitrógeno. Para aguas residuales urbanas, la fracción de DQO presente en el efluente del reactor UASB, excluyendo el metano disuelto, disponible para procesos de desnitrificación, es pequeña si se requiere de la eliminación de grandes cantidades de nitrógeno. Por este motivo, el metano presente en el efluente de reactores metanogénicos puede ser usado como dador de electrones barato para la desnitrificación.

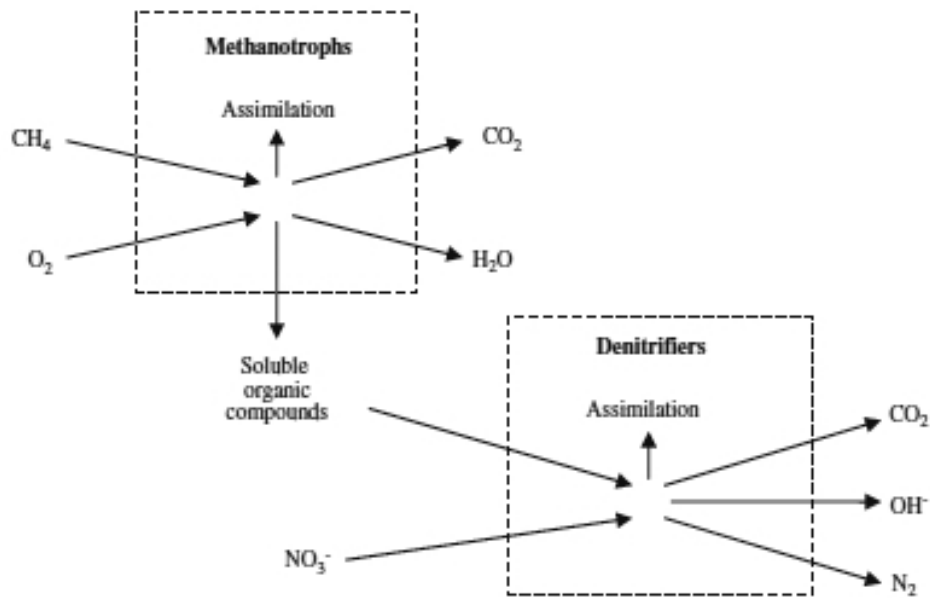
Davies (1973), Sollo *et al.* (1976) y Werner y Kayser (1976), pensaron en el uso de metano como fuente de carbono para llevar a cabo la desnitrificación. Este compuesto se encuentra disuelto en grandes cantidades en el efluente de reactores UASB de modo que su uso como fuente de carbono para la desnitrificación resolvería, al mismo tiempo, la problemática asociada a su contribución a los gases de efecto invernadero y al vertido de corrientes con altas cargas de nitrógeno.

Según Modin *et al.* (2007) las vías conocidas, desde el punto de vista microbiológico para llevar a cabo la oxidación de metano unido a desnitrificación son dos:

#### **1.2.2.2.1. Oxidación aerobia de metano**

El proceso de oxidación aerobia de metano acoplada a desnitrificación (AMO-D, del inglés Aerobic Methane Oxidation coupled to Denitrification) es llevado a cabo por bacterias metanótrofas, bacterias aerobias estrictas capaces de usar metano como fuente de carbono y energía. Estas bacterias son ubicuas en la naturaleza pudiendo encontrarse en muestras de sedimentos, ríos y océanos entre otros.

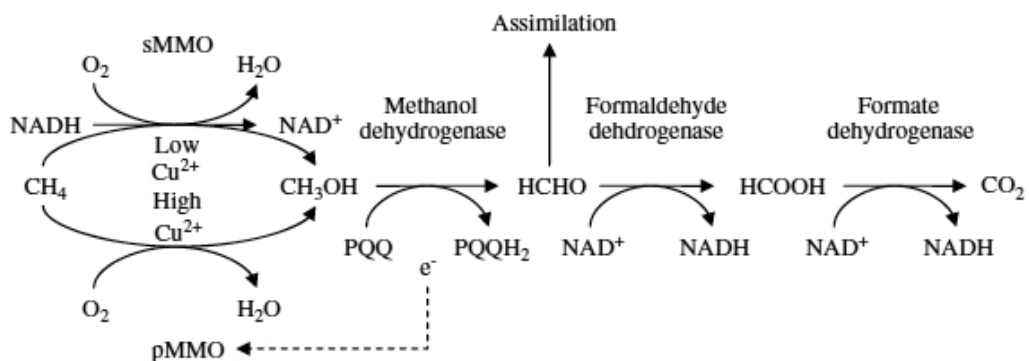
La reacción global de desnitrificación acoplada a oxidación aerobia de metano consta de dos etapas (**Figura 1.1**):



**Figura 1.1.** Etapas, reacciones y microorganismos involucrados en AMO-D. Fuente: Modin *et al.* (2007)

1. Oxidación aerobia de metano por bacterias metanótrofas. Las bacterias metanótrofas oxidan el metano utilizando el oxígeno como aceptor de electrones. Durante este proceso de oxidación, se generan compuestos orgánicos solubles tales como metanol, citrato, acetato, proteínas o carbohidratos que serán utilizadas como dadores de electrones por las bacterias desnitrificantes heterótrofas convencionales.

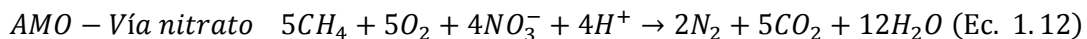
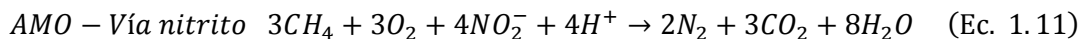
La ruta de oxidación de metano más común de las metanótrofas se muestra en la **Figura 1.2:**



**Figura 1.2.** Ruta de oxidación de metano por bacteria metanótrofas. Fuente: Modin *et al.* (2007)

2. Desnitrificación usando las formas oxidadas del metano como dadores de electrones de las especies oxidadas de nitrógeno, nitrito o nitrato.

La estequiometría global se indica en las **ecuaciones 1.11** (deducida teóricamente para este trabajo) y **1.12** (Modin *et al.*, 2007):



La asociación entre bacterias metanótrofas y desnitrificantes usando metano como fuente de carbono fue demostrada por primera vez por Rhee y Fuhs (1978), tras realizar un experimento en el cual aislaron dos bacterias aerobias: *Methylomonas* (metanótrofa) y *Vibrio extorquens* (bacteria metanol-usuaria) y una desnitrificante (*Pseudomonas stutzeri*). Tras realizar el experimento, llegaron a la conclusión de que las desnitrificantes eran capaces de reducir nitrato usando como fuentes de carbono los productos de la oxidación del metano.

El principal parámetro que afecta al control de este proceso es el oxígeno disuelto. Varios autores observaron que cuando el suministro de oxígeno cesa se produce una parada en el proceso de desnitrificación y justifican esto por la incapacidad de las bacterias metanótrofas de oxidar metano y liberar sustancias válidas como fuentes de carbono en la desnitrificación.

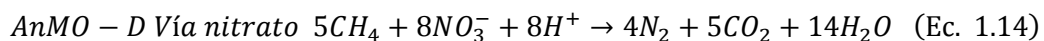
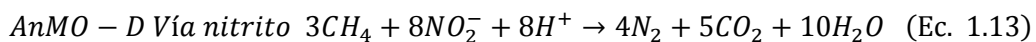
El efecto de la concentración de nitrito y amonio sobre el proceso fue estudiada por Waki *et al.*, (2002). Se observó que estos compuestos si bien no inhiben la actividad AMO-D ralentizan la oxidación de metano bajo determinadas condiciones. A bajas temperaturas (10°C) se puede inhibir el proceso.

Recientemente Kits *et al.* (2015) han demostrado que además del proceso conocido de desnitrificación aerobia con metano, existe una bacteria aerobia metanótrofa, *Methylomonas denitrificans FJG1*, capaz de producir desnitrificación parcial con oxidación de metano, bajo condiciones hipóxicas, liberando como producto final óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), gas con un elevado potencial de calentamiento global, 298 veces mayor que el CO<sub>2</sub> (IPCC, 2013).

#### 1.2.2.2. Oxidación anaerobia de metano

Raghoebarsing *et al.* (2006) demostraron que existe un consorcio microbiano, enriquecido a partir de sedimentos anóxicos, que posibilita de forma simultánea la oxidación anaerobia de metano junto con la desnitrificación. Este consorcio está formado posiblemente por dos microorganismos, arqueas y bacterias pertenecientes al filo NC10 (Kampman *et al.*, 2012), pero todavía no es conocido el mecanismo por el cual transcurre la reacción.

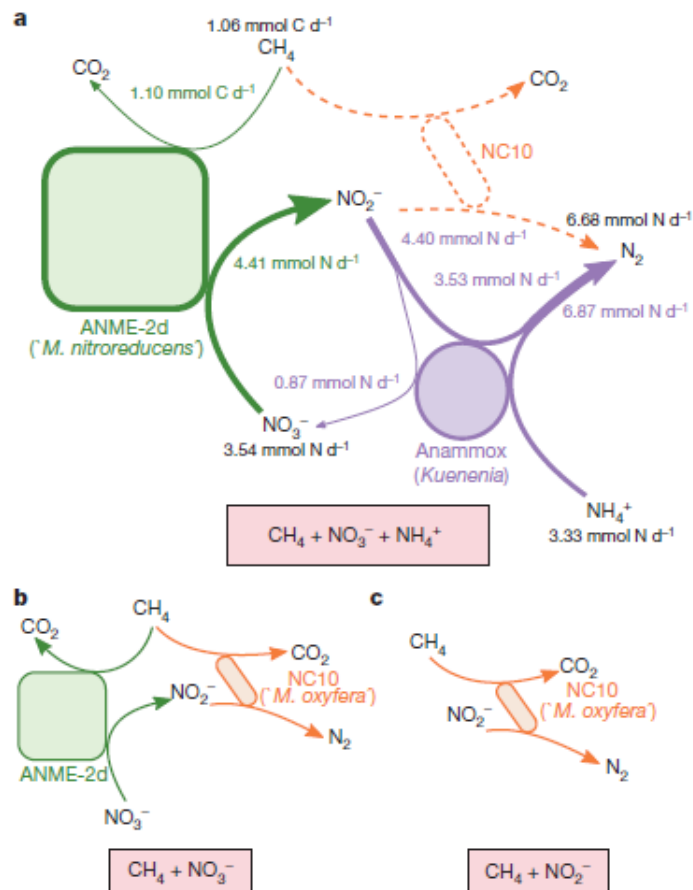
Según Raghoebarsing *et al.* (2006), las reacciones estequiométricas de AnMO-D (del inglés, *Anaerobic Methane Oxidation coupled to Denitrification*) vía nitrito y nitrato son las dadas por las **ecuaciones 1.13 y 1.14**:



Como se puede apreciar en las reacciones estequiométricas (**Ec. 1.13 y Ec. 1.14**), es necesario llevar a cabo una nitrificación previa del nitrógeno amoniacal, parcial o total, para lo que se necesitará un reactor independiente de aquel en el que tenga lugar el proceso de desnitrificación.

El valor de la entalpía libre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ) para la desnitrificación vía nitrato tiene un valor de  $-765 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{CH}_4$  mientras que para la vía nitrito es de  $-928 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{CH}_4$ , siendo esta vía la más favorable termodinámicamente. Desde el punto de vista cinético, Raghoebasing *et al.*, (2006) determinaron que la vía nitrito es la más favorable puesto que, en condiciones anaerobias, el crecimiento de microorganismos consumidores de nitrito era mayor, dado que éste se consumía en mayor medida que el nitrato.

La desnitrificación acoplada a la oxidación anaerobia de metano vía nitrito (**Ec. 1.13**) es llevada a cabo por las bacterias oxidantes anaerobias de metano dependientes de nitrito (N-DAMO del inglés, *Nitrite-Dependent Anaerobic Methane Oxidation*) también conocidas como *Candidatus "Methylomirabilis oxyfera" (M. oxyfera)* pertenecientes como se dijo anteriormente al filo NC 10. (**Figura 1.4, c**). Esta bacteria es de lento crecimiento siendo su tasa de duplicación celular del orden de semanas, lo que dificulta su cultivo. Además, experimentos realizados por Hu *et al.* (2014), indican que la concentración de nitrito en los reactores de cultivo de esta bacteria debe ser controlada y mantenerse baja, alrededor de los  $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , valor óptimo de concentración de nitrito obtenido para experimentos en batch anteriores (He *et al.*, 2013).



**Figura 1.3.** Interacciones observadas entre poblaciones bacterianas en biorreactores alimentados con metano en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno. Fuente: Haroon *et al.* (2013)

Por otro lado, los microorganismos responsables de la desnitrificación acoplada a la oxidación anaerobia de metano vía nitrato (**Ec. 1.14**) son las arqueas *Candidatus "Methanoperedens nitroreducens"* (*M. nitroreducens*), capaces de reducir el nitrato a nitrito que, en ausencia de amonio en el medio, es usado por la *M. oxyfera* como dador de electrones para oxidar al metano (**Figura 1.3, b**).

Sin embargo, cuando el reactor es alimentado con amonio, el nitrito formado por la *M. nitroreducens* es usado como aceptor de electrones para la oxidación anaerobia de amonio a nitrógeno gas mediante la acción de la población Anammox, *Kuenenia*. (**Figura 1.3, a**). Esta asociación es beneficiosa para ambos microorganismos pues en el proceso anammox se genera una pequeña cantidad de nitrato que restituye el consumido por la propia *Nitroreducens*. En ausencia de amonio, *M. oxyfera* no tiene que competir con *Kuenenia* y elimina metano mediante desnitrificación anaerobia. Cuando el nitrito es el único aceptor de electrones, *M. Nitroreducens* es incapaz de competir con *M. oxyfera* de tal modo que esta comunidad pasa a dominar el cultivo (Haroon *et al.*, 2013).

Además, estudios llevados a cabo indican que el proceso de desnitrificación acoplado a oxidación anaerobia de metano puede tener lugar en ausencia de la arquea, siendo la bacteria dominante, *M. oxyfera*, capaz de catalizar la oxidación de metano por sí misma (Ettwig *et al.*, 2008; Ettwig *et al.*, 2009).

## **2. OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

El presente trabajo fin de máster tiene dos objetivos principales:

1. Eliminación simultánea de nitrógeno y metano en el efluente de los reactores anaerobios metanogénicos de tipo UASB, aprovechando la capacidad donadora de electrones del metano.
2. Comprobación de la capacidad de sedimentación de los microorganismos desnitrificantes de lento crecimiento AMO y N-DAMO.

El estudio se lleva a cabo a escala piloto en un sistema integrado de reactor metanogénico y biorreactor híbrido de biomasa en suspensión y en biopelícula. Dicho sistema ha sido operado durante 99 días a temperatura ambiente tratando agua residual sintética con características de baja carga.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describen los principales materiales y métodos empleados durante la etapa experimental. Se detallan las referencias de los métodos analíticos así como el montaje de la planta piloto

#### 3.1. Equipo experimental

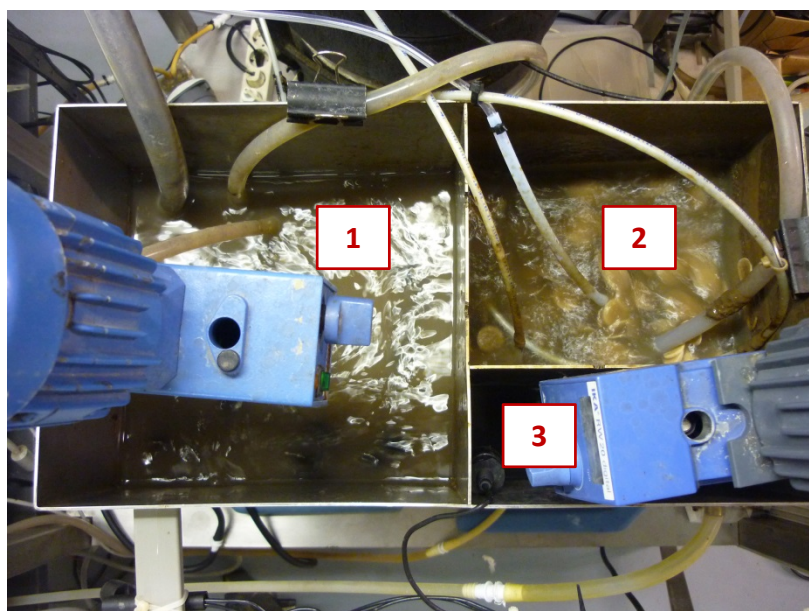
Se ha operado un biorreactor de 186 L (**Figura 3.1**) a temperatura ambiente (19,2-21,9°C) durante 99 días. El equipo experimental utilizado consta de dos reactores dispuestos en serie: un reactor anaerobio metanogénico de tipo UASB (120 L) y un biorreactor híbrido con biomasa en suspensión y biopelículas (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** Planta piloto experimental: 1) Reactor UASB; 2) Biorreactor híbrido.

El biorreactor híbrido está formado por tres cámaras: anóxica (36 L), aerobia (20 L) y decantador (10 L) (**Figura 3.2**). En el interior de la cámara anóxica tienen lugar los procesos de desnitrificación, esto es, la reducción de nitrito o nitrato a nitrógeno gas siendo utilizada la DQO residual y el metano disuelto del efluente del UASB como dadores de electrones. Mientras, en la cámara aerobia tiene lugar la oxidación de amonio a nitrito y nitrato, especies de nitrógeno

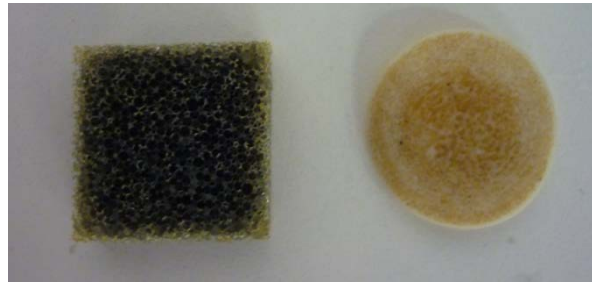
necesarias como aceptores de electrones en el proceso de desnitrificación, así como la oxidación de la materia orgánica presente en la corriente de salida del UASB no consumida en la cámara anóxica.



**Figura 3.2.** Configuración del biorreactor híbrido: 1) Cámara anóxica; 2) Cámara aerobia; 3) Decantador.

Las cámaras anóxica y aerobia son sistemas híbridos en los cuales la biomasa crece en suspensión e inmobilizada sobre soportes formando biopelículas. El uso de sistemas de biopelículas permite el tratamiento de efluentes de altas cargas en menores volúmenes de reactor, al mismo tiempo que favorece la retención de mayores cantidades de biomasa, lo cual es beneficioso en el caso de presencia de microorganismos de lento crecimiento como es el caso de las bacterias nitrificantes, anammox y metanogénicas. Los sistemas híbridos se han utilizado con éxito para aumentar la capacidad de nitrificación en procesos convencionales de lodos activos (Christensson and Welander, 2004)

La cámara anóxica contiene un total de 2500 unidades de soportes Levapor® (20x20x7mm) (**Figura 3.3**) correspondientes a un 20% del volumen efectivo, mientras que la cámara aerobia alberga un total de 3160 unidades de soportes Mutag-Biochip® ( $4,15 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$ ) (**Figura 3.3**) en una cantidad igual al 7% del volumen efectivo de dicha cámara.



**Figura 3.3.** Soportes para el desarrollo de biopelículas presentes en la cámara anóxica (Levapor®) (izquierda) y en la cámara aerobia (Biochips®) (derecha).

Los Biochip® son soportes de alta capacidad, de 1 mm de grosor y 23 mm de diámetro, con una gran superficie específica ( $2174 \text{ m}^2/\text{m}^3$  de volumen aparente). Su estructura, de pequeño espesor, permite que tanto el oxígeno como el sustrato puedan difundir a través de ambas caras del soporte a una profundidad de 0,5 mm, de tal modo que la biopelícula se mantiene activa.

Por otro lado, los soportes Levapor® están fabricados con espuma sintética e impregnados con hasta un 50% de carbón activo y se caracterizan por su elevada superficie de adsorción y porosidad. Estas propiedades hacen que sean fácilmente colonizados por los microorganismos, al mismo tiempo que permite la adsorción y encapsulamiento de sustancias que puedan inhibir el proceso. Su alta porosidad y superficie interna permite la estratificación de especies microbianas a medida que se avanza hacia el interior del soporte en función de la concentración de oxígeno disponible (formación de ambientes anóxicos en las zonas internas)

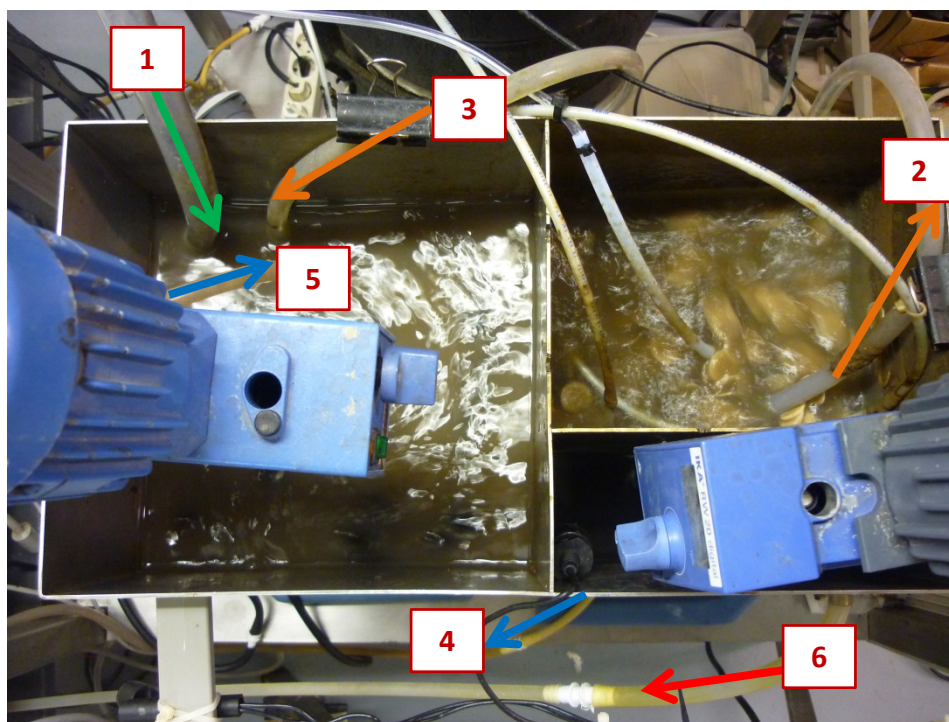
La superficie específica de los soportes Levapor® es de  $486 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , valor inferior a la de los soportes Biochip®. La elevada superficie específica del Biochip® permite obtener elevadas velocidades de reacción de los sustratos presentes.

Según un estudio previo realizado con los soportes (Henze, 2002), se observa que el desarrollo de microorganismos de lento crecimiento en biopelículas no está limitado por la transferencia de masa, es independiente de la superficie específica, existiendo sin embargo limitaciones debidos a la cinética y a la hidráulica.

El volumen de soportes introducidos en cada una de las cámaras no debe sobrepasar la capacidad de los sistemas de agitación para mantenerlos fluidizados. En todo momento, los soportes deben mantenerse en suspensión en el licor de mezcla (LM)

En la **Figura 3.4** se muestra una fotografía del biorreactor híbrido tomada durante la realización del experimento en la que se pueden observar las corrientes implicadas (entrada, salida y recirculaciones) así como las direcciones de los flujos de las mismas. Mencionar que

durante la fase experimental se han realizado cambios en la disposición de la salida de recirculación de lodos, correspondiendo la **Figura 3.4** a la disposición del sistema durante la fase final de experimento. En cualquier caso, las variaciones no afectaron en ningún caso al número de corrientes implicadas en el sistema.



**Figura 3.4.** Corrientes involucradas en el reactor híbrido: 1) Efluente del reactor metanogénico UASB; 2- 3) Recirculación cámaras aerobia-anóxica; 4-5) Recirculación lodos decantador; 6) Efluente biorreactor híbrido.

El influente sintético del sistema entra al reactor anaerobio de tipo UASB en el cual se produce la etapa metanogénica. A continuación, el efluente del reactor UASB pasa a la cámara anóxica y de ésta, a la cámara aerobia a través de unos orificios realizados en la lámina de separación entre ambas cámaras. Posteriormente, una parte del licor de mezcla de la cámara aerobia avanza hacia el decantador en el que tiene lugar la sedimentación de la biomasa, obteniéndose de este modo un efluente libre de sólidos.

Como se observa en la **Figura 3.4**, existen dos recirculaciones en el sistema:

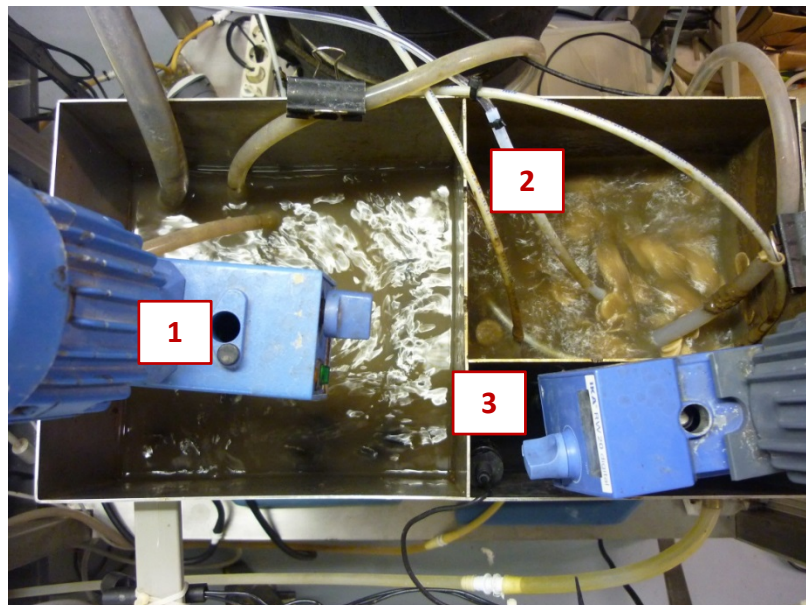
1) Recirculación de la cámara aerobia a la anóxica (recirculación interna): El objetivo de esta corriente es transportar biomasa y los aceptores de electrones necesarios para el proceso de desnitrificación de una a otra cámara. Además, se introducen pequeñas cantidades de oxígeno en la cámara anóxica que pueden afectar al proceso.

2) Recirculación de lodos desde el decantador a la cámara anóxica (recirculación externa): Su finalidad es recuperar la biomasa que sedimenta en el decantador.

La cámara anóxica dispone de un agitador mecánico IKA (**Figura 3.5, 1**) cuyo objetivo es mantener la biomasa y los soportes Levapor® en suspensión, así como conseguir condiciones de mezcla completa en su interior. Por su parte, la agitación en la cámara aerobia es de tipo neumática proporcionada por conducciones (**Figura 3.5, 2**) que introducen aire impulsado por una soplante. El aire además de agitar el licor de mezcla de la cámara, tiene una segunda función, mantener la concentración de oxígeno en los niveles adecuados para el desarrollo de la biomasa y la oxidación del amonio presente en el licor de mezcla.

El sistema consta de un total de 4 bombas peristálticas Masterflex Coleparmer L/S de caudal variable que se encargan de impulsar las corrientes de concentrado de leche, alimentación, recirculación cámara aerobia-anóxica y recirculación de lodos. Además, se ha instalado un sensor de nivel (**Figura 3.5, 3**) en el decantador para evitar desbordes debidos a la obstrucción del paso de la cámara anóxica a la aerobia por gránulos de biomasa del UASB o por agregados de lodo procedente del decantador.

Todas las bombas, excepto la de concentrado, el sensor de nivel y el contador de volumen de biogás (Ritter®) producido por el reactor metanogénico están controladas por un PLC micrologix–Allen Bradley. Cuando el sensor detecta durante un período de tiempo un aumento de nivel del líquido en el decantador, envía una señal al PLC que inmediatamente produce la parada total del alimentación del sistema.



**Figura 3.5.** Sistemas de agitación en cámaras reactor híbrido: 1) Agitador IKA; 2) Conducciones entrada aire desde la soplante y sonda de nivel en decantador (3).

Los resultados que se muestran en el presente documento se han obtenido trabajando con una relación de recirculación  $R$  (**Ec. 3.1**) igual a 3. En estudios previos (Silva-Teira *et al.*, 2015),

se ha constatado que para  $R=3$  se obtienen los mejores resultados de eliminación de metano y nitrógeno total en el sistema.

$$R = \frac{\sum(Q_r)_i}{Q_f} = \frac{Q_{ra} + Q_{rs}}{Q_f} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde  $R$  es la relación de recirculación,  $Q_{ra}$  es el caudal volumétrico de la recirculación entre la cámara aerobia y la anóxica,  $Q_{rs}$  es el caudal volumétrico de la recirculación de lodos desde el decantador a la cámara anóxica y  $Q_f$  es el caudal volumétrico de alimentación del sistema.

La razón de recirculación es un parámetro que gobierna la entrada tanto de oxígeno como de aceptores de electrones (nitrito y nitrato) desde la cámara aerobia a la anóxica. Además, determina el tiempo de residencia hidráulico en cada uno de los compartimentos del biorreactor híbrido.

### 3.2. Condiciones operacionales

La planta experimental ha sido alimentada con un influente sintético de características similares a un agua residual urbana de baja carga, con concentraciones de DQO entre 605-1266 mg DQO·L<sup>-1</sup> con un valor puntual de 1680 mg DQO·L<sup>-1</sup> y nitrógeno total 36,2-67,0 mg N·L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Para simular este tipo de agua residual se utiliza un concentrado de leche, el cual se diluye con agua de servicio aplicando un factor de dilución tal que permita obtener una corriente con los requerimientos de DQO y nitrógeno del sistema. El concentrado se conserva en bolsas colapsables de 20 L refrigeradas a una temperatura de entre 5-10 °C.

La composición del concentrado de leche fue de: 375 mL·L<sup>-1</sup> de leche desnatada comercial, 37,5 g·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub>, 2,38 g·L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl y 1,25 mL·L<sup>-1</sup> de disolución de trazas. La composición media de la disolución de trazas fue en mg·L<sup>-1</sup>: 22,24 FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O; 2,97 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,59 CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O; 0,59 KI; 2,38 ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 2,97 CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O y 2,38 MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O.

Durante los 99 días de operación del sistema se ha trabajado a temperatura ambiente, oscilando ésta entre los 19,2-21,9 °C. El sistema ha sido alimentado con un caudal promedio de 68 L d<sup>-1</sup> durante el período de arranque del sistema y de 150 L·d<sup>-1</sup> a partir del día 14 de operación, momento en el cual se duplicó el caudal de alimentación tras comprobar que las eliminaciones de DQO y los porcentajes de metanización del sistema anaerobio se mantenían estables. El arranque del sistema se realiza con un caudal de alimentación y velocidad de carga orgánica (VCO) bajos para conseguir la aclimatación de la población microbiana del reactor anaerobio metanogénico a las características del influente. Valores elevados de VCO en el arranque del reactor pueden producir un desequilibrio entre las velocidades de formación y consumo de

ácidos intermedios en el reactor metanogénico que provocaría un descenso del pH del sistema y por tanto, la inhibición de la actividad microbiana.

La VCO referida al reactor UASB y al biorreactor híbrido ha alcanzado valores comprendidos entre 0,6-2,02 y 0,05-0,26 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente.

La concentración de oxígeno disuelto en la cámara anóxica ha oscilado entre 0,09-0,27 mg·L<sup>-1</sup>, mientras que en la cámara aerobia se mantuvo entre 1,27-6,00 mg·L<sup>-1</sup>. Las oscilaciones en el nivel de oxígeno en la cámara aerobia se pueden explicar por la variación en la concentración de biomasa allí presente y la sobrecarga en momentos puntuales de DQO y NH<sub>4</sub>.

En cuanto a los parámetros de diseño, los TRH del reactor UASB, del sistema de post-tratamiento del efluente UASB y el global del sistema durante la etapa de arranque fue de 42,1, 19,6 y 61,8 h, respectivamente. Una vez la alimentación del sistema se duplicó, los valores de los TRH se situaron en los siguientes intervalos: 16,0-20,2 h para el reactor UASB, 7,5-9,4 h para el caso del post-tratamiento y 23,5-29,6 para el sistema global.

En cuanto a la presencia de sólidos, en la cámara anóxica se alcanzaron valores entre 0,13-3,09 gSSVLM·L<sup>-1</sup>, mientras que en la cámara aerobia el valor osciló entre 0,09-2,94 gSSVLM·L<sup>-1</sup>. Como era de esperar, el valor de sólidos en ambas cámaras es semejante, dado que no existe ningún sistema de retención que las diferencie y se admite que ambas cámaras están perfectamente agitadas.

### 3.3. Métodos analíticos

La toma de muestras llevada a cabo en la planta piloto, los análisis efectuados y su frecuencia se recogen en la **Tabla 3.1**:

**Tabla 3.1.** Toma de muestra, análisis a realizar y frecuencia para SIAL.

ANÁLISIS	MUESTRAS					
	ALIMENTACIÓN	EFLUENTE UASB	CÁMARA ANÓXICA	CÁMARA AEROBIA	EFLUENTE	BIOGÁS
OD	-	-	5/s	5/s	-	-
Eh	-	-	5/s	-	-	-
T	-	-	5/s	5/s	-	-
pH	-	2/s	2/s	2/s	2/s	-
Producción biogás	-	-	-	-	-	5/s
Composición biogás	-	-	-	-	-	2/s
Metano disuelto	-	2/s	2/s	2/s	-	-
DQOT	2/s	2/s	-	-	2/s	-
DQOS	2/s	2/s	-	-	2/s	-
COT	-	-	-	-	2/s	-
AGV	-	2/s	2/s	-	-	-
ST/SV	-	-	2/s	2/s	2/s	-
SST/SSV	-	-	2/s	2/s	2/s	-
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-	2/s	2/s	-	2/s	-
N-NO <sub>2</sub>	-	-	2/s	-	2/s	-
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	-	2/s	-	2/s	-
IVL	-	-	-	2/s	-	-
VSL	-	-	-	2/s	-	-

A continuación, se describen los métodos analíticos utilizados en el presente trabajo para determinar los parámetros indicados en la **Tabla 3.1**.

#### 3.3.1. Fase líquida

##### 3.3.1.1. Parámetros físicos

Los factores ambientales como la temperatura, oxígeno disuelto, pH y potencial redox tienen un efecto muy importante en la selección, supervivencia y crecimiento de los microorganismos.

- **Temperatura y oxígeno disuelto**

La temperatura del agua residual es un parámetro de control muy importante debido a sus efectos en las reacciones químicas y en las velocidades de las mismas. Así mismo, es conocida la influencia de este parámetro sobre la solubilidad de los gases en agua, disminuyendo ésta a medida que aumenta la temperatura.

El oxígeno disuelto en medio acuoso es necesario para la respiración de los microorganismos aerobios, así como para otras formas de vida. Del mismo modo, su presencia inhibe el crecimiento y actividad de microorganismos anóxicos y anaerobios. Es por ello, que debe controlarse este parámetro en las diferentes partes del sistema para garantizar que se favorecen las condiciones de crecimiento de los microorganismos deseados.

La temperatura y la concentración de oxígeno disuelto en las cámaras anóxica y aerobia se miden utilizando un oxímetro HACH HQ 40. El calibrado del oxímetro se realiza a presión atmosférica y temperatura ambiente, antes de realizar las medidas.

- **Potencial redox**

El potencial redox (Eh) se mide con un medidor portátil de pH y potencial redox Crison pH 25 provisto de un electrodo de platino (50 55).

- **pH**

El pH es uno de los parámetros clave que deben ser medidos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, puesto que su control es importante para mantener la actividad biológica de los microorganismos involucrados en el proceso. El intervalo de pH adecuado para la adecuada proliferación de la vida biológica es bastante estrecho y crítico (típicamente de 6 a 9).

Las medidas de pH se han realizado utilizando para tal efecto un electrodo Crison U-455 conectado a un pHmetro/ionómetro Crison GLP 22. Antes de medir el pH de las muestras, se realiza una calibración del equipo a temperatura ambiente utilizando para ellos dos disoluciones tampón Crison de pH 4,0 y pH 7,02.

### **3.3.1.2. Parámetros químicos**

Para el análisis de las fracciones solubles presentes en el agua, las muestras se filtran previamente con filtros de membrana de nitrocelulosa (HA, Millipore) de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  para separar los sólidos en suspensión.

#### **3.3.1.2.1. Compuestos de carbono**

- **Demanda Química de Oxígeno**

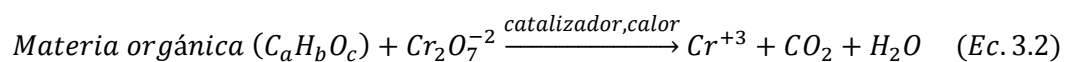
La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se define como la cantidad de un oxidante específico, expresado como masa de oxígeno equivalente ( $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ), necesaria para oxidar químicamente todos aquellos compuestos potencialmente oxidables presentes en una muestra dada.

La DQO de un agua residual suele ser mayor que su correspondiente Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), siendo el valor del cociente entre ambos parámetros indicativo de la biodegradabilidad de los compuestos presentes en un agua residual. En muchos tipos de aguas residuales es posible establecer una correlación entre los valores de la DBO y la DQO, pudiendo emplearse las medidas de la DQO para el funcionamiento y control de las plantas de tratamiento.

El empleo de la DQO se vio potenciado frente a la DBO dada su mayor fiabilidad y rapidez de determinación (3 horas frente a 5 días).

En el ensayo de DQO, se utiliza un agente químico fuertemente oxidante en medio ácido para la determinación del equivalente de oxígeno de la materia orgánica que puede oxidarse. El dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ) proporciona excelentes resultados en este sentido. El ensayo debe realizarse a elevadas temperaturas ( $150^\circ C$ ). Para facilitar la oxidación de determinados tipos de compuestos orgánicos es necesario utilizar un catalizador (sulfato de plata). Además, deben tomarse medidas para eliminar o enmascarar compuestos inorgánicos que pueden interferir en el ensayo.

La reacción principal utilizando dicromato como agente oxidante puede representarse de modo general por la siguiente ecuación esquemática (**Ec. 3.2**):



Al final de la oxidación se puede medir el ión dicromato ( $Cr_2O_7^{2-}$ ) en exceso o la cantidad de  $Cr^{+3}$  formado.

El equipo necesario para llevar a cabo el ensayo de DQO está formado por una placa calefactora Stuart Scientific, un agitador magnético Selecta HI190M y una bureta de 10 mL utilizando los dos últimos en la etapa de valoración. Asimismo son necesarios, tubos de digestión de vidrio Pyrex con tapones de rosca de baquelita y cinta de teflón. Esta última se coloca cubriendo la parte superior y la rosca del tubo de modo que se evite el ataque de la solución oxidante a la baquelita.

Para llevar a cabo la determinación son necesarios los siguientes reactivos:

- Disolución digestora concentrada (para aguas de entre 100-900 mg DQO·L<sup>-1</sup>). Se disuelven 10,216 g de disolución patrón de  $K_2Cr_2O_7$  y 33 g de  $HgSO_4$  en 500 mL de agua destilada y a continuación, se añaden 167 mL de  $H_2SO_4$  concentrado comercial para completar finalmente el volumen a 1L.

- Disolución digestora diluida (para aguas de entre 0 y 200 mg DQO·L<sup>-1</sup>). Se disuelven 2,44 g de disolución patrón de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y 17 g de HgSO<sub>4</sub> en 500 mL de agua destilada a los que se añaden 167 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado comercial. Esto se lleva a un volumen final de 1L.
- Disolución patrón de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,05 N. Se disuelven 1,2258 g de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, previamente secado a 105°C durante 2 horas, en 500 mL de agua destilada.
- Disolución catalítica. Se disuelven 10,7 g de Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 1L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se deja reposar la mezcla durante dos días.
- Disolución valorada de sulfato amónico ferroso (FAS, del inglés *Ferrous Ammonium Sulphate*) 0,035N. Esta disolución se utiliza en la valoración de muestras de agua con concentraciones de DQO comprendidas entre 100 y 900 mg DQO·L<sup>-1</sup>. Para prepararla se disuelven 13,72 g de Fe(NH<sub>4</sub>)(SO)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O en agua destilada, a los que se le añaden 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se completa la mezcla hasta 1L con agua destilada.
- Disolución valorada de FAS 0,016N. Esta disolución se utiliza en la valoración de muestras de agua con DQO con concentraciones comprendidas entre 0 y 200 mg DQO·L<sup>-1</sup>. Para su preparación se disuelven 6,28 g de Fe(NH<sub>4</sub>)(SO)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O en agua destilada, a los que se le añaden 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se completa la mezcla hasta 1L con agua destilada.
- Disolución indicadora de ferroína 1/40 N. Se disuelven 1,485 g de C<sub>18</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (fenontralina monohidrato) y 0,695 g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A continuación, se lleva la mezcla a un volumen final de 1L.

La Demanda Química de Oxígeno Total (DQOT) y la Demanda Química de Oxígeno Soluble (DQOS) se determinan siguiendo una variante del método 508 (A-B) del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA-AWWA-WPCF, 1998). La diferencia entre la DQOT y la DQOS estriba en que la primera se determina utilizando la muestra sin filtrar, mientras que para la determinación de la DQOS, la muestra se filtra a través de filtros de membrana de nitrocelulosa (HA, Millipore) de tamaño de poro de 45 µm.

El método anteriormente citado consta de 2 etapas diferenciadas: digestión y valoración, cuya metodología se detalla a continuación:

a) Se toman 2,5 mL de muestra y se introducen en un tubo de vidrio Pyrex de 10 mL. La muestra debe diluirse en el caso de que la DQO supere el límite máximo de medida de 900 mg DQO·L<sup>-1</sup>. Paralelamente, se prepara un blanco con 2,5 mL de agua destilada. Todas las operaciones que se describen a continuación se realizan con el blanco y con las muestras.

b) A continuación, se añaden 1,5 mL de la disolución digestora, diluida o concentrada, que se ajuste a la concentración de DQO de la muestra.

c) Por último, se añaden lentamente 3,5 mL de disolución catalítica, dejándola escurrir por la pared del tubo Pyrex, que se mantendrá inclinado, de forma que se separen dos capas o fases.

d) Se sellan los tubos con teflón y se cierran con el tapón de baquelita. Se homogeneiza el contenido del vial y se coloca en un bloque calefactor a 150°C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se retiran los tubos y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente.

e) Tras la digestión de las muestras, se lleva a cabo la valoración del dicromato residual con la disolución de FAS pertinente. Para ello, se pasa el contenido de los tubos a un matraz Erlenmeyer y se lava el tubo con 2/3 de agua destilada vaciando el contenido en el matraz. Se añade una gota de ferroína y se valora con la disolución de FAS correspondiente, previamente valorada. El punto final de la valoración se detecta mediante el viraje de azul a rojizo.

f) Las disoluciones de FAS han de valorarse con el objetivo de determinar su concentración. Para ello se añaden 3,5 mL de solución catalítica sobre 5 mL de agua destilada. Se deja enfriar la mezcla y se añaden 5 mL de la disolución patrón de dicromato potásico y una gota de indicador (ferroína). La valoración se realiza siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras.

La concentración de DQO se calcula mediante la **ecuación 3.3**:

$$DQO \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(B - A) \cdot N_{FAS} \cdot 8000}{2,5 (mL)} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

donde B es el volumen de FAS consumido en la valoración del blanco (mL), A es el volumen de FAS consumido en la valoración de la muestra analizada (mL),  $N_{FAS}$  es la normalidad de la solución de FAS valorada calculada mediante la **ecuación 3.4**:

$$N_{FAS} = V_{K_2Cr_2O_7} \cdot \frac{N_{K_2Cr_2O_7}}{V_{FAS}} \quad (\text{Ec. 3.4})$$

donde  $V_{K_2Cr_2O_7}$  es el volumen de dicromato potásico utilizado (5 mL),  $N_{K_2Cr_2O_7}$  es la normalidad del dicromato potásico (0,05) y  $V_{FAS}$  es el volumen consumido en la valoración de la solución del FAS (mL).

- **Carbono Orgánico Total**

El carbono orgánico de las aguas limpias y residuales corresponde a diversidad de compuestos orgánicos en varios estados de oxidación. Algunos de estos compuestos de carbono pueden ser sometidos a una oxidación posterior por procesos químicos o biológicos, de tal modo que la DQO y la DBO pueden utilizarse para caracterizar dichas fracciones. La presencia de carbono orgánico que no responda a los ensayos de DQO o DBO las hace inadecuadas para la determinación del carbono orgánico total.

El Carbono Orgánico Total (COT) es una medida directa del contenido de materia orgánica total del agua residual (APHA, 1999), especialmente indicada para el caso de pequeñas concentraciones de materia orgánica.

El COT es una expresión más conveniente y directa que la DQO o la DBO, pero no proporciona la misma clase de información. A diferencia de estas últimas, el COT es independiente del estado de oxidación de la materia orgánica y no mide otros elementos orgánicos, tales como el nitrógeno y el hidrógeno, o inorgánicos que puedan contribuir al requerimiento de oxígeno medido por DQO o DBO.

Normalmente, es posible establecer correlaciones empíricas entre los datos de COT y DQO para cada conjunto de condiciones de la matriz.

La determinación del COT es más rápida que la de DQO, pero requiere de un equipamiento más caro y complejo.

Para determinar la cantidad de carbono orgánico, las moléculas orgánicas deben romperse en unidades de carbono simples y ser convertidas en una forma molecular sencilla que pueda medirse de forma cuantitativa.

El COT se midió con un equipo Shimadzu TOC-L, capaz de analizar únicamente muestras filtradas, que se encuentra conectado a un inyector de muestras automático Shimadzu ASI-L. El valor del COT se calcula como la diferencia entre el Carbono Total (CT) y el Carbono Inorgánico (CI) de la muestra según se muestra en la **ecuación 3.5**.

$$COT = CT - CI \quad (\text{Ec. 3.5})$$

El analizador determina el CT a partir del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que se produce durante la combustión catalítica de la muestra a 680° C, empleando platino inmovilizado sobre esferas de alúmina como catalizador de la oxidación. El carbono inorgánico se obtiene a partir del CO<sub>2</sub> producido por reacción con ácido clorhídrico 1N a temperatura ambiente. El CO<sub>2</sub> se mide ópticamente, después de haberle eliminado la humedad y enfriado, en un detector infrarrojo no

dispersivo (NDIR, del inglés *Non Dispersive Infrared Analyzer*). El equipo utiliza aire de alta pureza como gas portador a  $150 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . El intervalo de detección del equipo es de  $0,5\text{-}1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

- **Ácidos grasos volátiles**

Los Ácidos Grasos Volátiles (AGV) son ácidos grasos de cadena carbonada formada por 6 o menos átomos de carbono, tales como acético, propiónico, i-butírico, n-butírico, i-valérico y n-valérico, los cuales son productos intermedios de la digestión anaerobia. La medida de ácidos grasos volátiles se utiliza como test de control del proceso de digestión anaerobia puesto que la acumulación de AGV indica un desequilibrio entre la cinética de los productores y consumidores de estos ácidos (Switzembaum *et al.*, 1990) sirviendo como indicador de la desestabilización del proceso.

Los AGV se determinan en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies CG 6850 serie II, equipado con un detector de ionización de llama (FID, del inglés *Flame Ionization Detector*) e inyector automático. El equipo consta de una columna capilar de fase estacionaria ZB-Wax plus-Zebron-Phenomenex de polietilenglicol de dimensiones  $30\text{m}\times 0,250\text{mm}\times 0,25\mu\text{m}$ . La columna del equipo tiene la siguiente rampa de temperatura:  $60^\circ\text{C} \rightarrow 15^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 130^\circ\text{C} \rightarrow 3^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 150^\circ\text{C} \rightarrow 10^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 180^\circ\text{C}/\text{min}(1 \text{ min}) \rightarrow 25^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 250^\circ\text{C}/\text{min} (3\text{min})$ . Por su parte, el inyector y el detector se encuentran a temperaturas de  $250$  y  $300^\circ\text{C}$ , respectivamente. Se utiliza nitrógeno como gas portador con un caudal de  $45 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , que se satura con ácido fórmico antes de su entrada en el inyector. Aire e hidrógeno se utilizan como gases auxiliares con caudales de  $400$  y  $40 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente.

Los AGV, después de ser separados en la columna cromatográfica en función de su peso molecular, se queman en una llama de  $\text{H}_2$ -aire y finalmente se miden en un detector de ionización de llama a  $300^\circ\text{C}$ . El límite de detección del equipo es de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para cada uno de los ácidos presentes.

### **3.3.1.2.2. Compuestos nitrogenados**

Las formas de nitrógeno de mayor interés en las aguas naturales y residuales son, por orden decreciente de su estado de oxidación, nitrato, nitrito, amoníaco y nitrógeno orgánico. Todas estas formas del nitrógeno, lo mismo que el nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ ), son intercambiables bioquímicamente y forman parte del ciclo del nitrógeno.

- **Nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**

Para la determinación de amonio comúnmente se emplea un electrodo selectivo o métodos espectrofotométricos como el método de Nessler o método del fenol-hipoclorito (APHA,1989) o el de Bower y Holm-Hansen (1980) que será el que se aplique en el presente trabajo.

El método está preparado para medir la concentración de muestras de entre 0-1 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>·L<sup>-1</sup>, por lo que se debe diluir la muestra si se sospecha que la concentración de la muestra sobrepasa este valor.

Para llevar a cabo la determinación son necesarios los siguientes reactivos:

- **Reactivo A:** Disolución de sodio nitroprusiato 0,28 g·L<sup>-1</sup> y sodio salicilato 440 g·L<sup>-1</sup> Este reactivo debe ser almacenado en botella de vidrio marrón en la nevera a 5º C y evitando la luz. La disolución oscurece con el tiempo pero es estable durante más de 3 meses.

- **Reactivo B:** Disolución alcalina de citrato: 18,5 g·L<sup>-1</sup> NaOH y 120 g·L<sup>-1</sup> de sodio citrato. Esta disolución es estable.

- **Reactivo C:** Disolución comercial de hipoclorito sódico. Mantener la botella cerrada en la nevera.

- **Reactivo D:** Disolución combinada de sodio hipoclorito y citrato. Se prepara en el momento de realizar el análisis. Se emplea 1 volumen de Reactivo C por cada 7 volúmenes de Reactivo B. Es estable durante 1 hora.

La determinación se lleva a cabo del siguiente modo: Se toman 5 mL de muestra diluida convenientemente de tal forma que la concentración de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se encuentre dentro del rango y se introducen en un tubo de ensayo plástico. Se añaden 600 µL de reactivo A y se mezcla con la ayuda de un vórtex. Se añade 1 mL de reactivo D (875 µL de reactivo B y 125 µL de reactivo C) y se agita de nuevo. Se cierra el tubo de ensayo y la mezcla obtenida se mantiene en la oscuridad durante al menos 2 horas (pero menos de 3). A continuación, se mide la absorbancia de la muestra a 640 nm en un espectrofotómetro Cecil 7200 serie 7000.

Para cuantificar la concentración de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se prepara una recta de calibrado con disoluciones patrón de NH<sub>4</sub>Cl en el rango de 0-1 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>·L<sup>-1</sup>. Esta recta de calibrado relaciona la concentración de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> con la absorbancia de la muestra a 640 nm.

- **Nitrito (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

La concentración de nitrito en las muestras se determina siguiendo el método 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-B descrito en Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA\_AWWA\_WPCF, 1998). El nitrito se determina por la formación de un colorante azo púrpura rojizo, producido a pH 2,0 a 2,5 por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorohidruro de N-(1-naftil)-etilendiamina (NED). El rango de aplicación del método para medidas espectrofotométricas es de 10 a 1000 µg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>·L<sup>-1</sup>.

Las disoluciones necesarias para llevar a cabo la determinación son:

- **Reactivo R1:** Sulfanilamida. Se disuelven 10 g de sulfanilamida cristalizada en 100 mL de HCl concentrado y 600 mL de agua destilada. Se deja enfriar la disolución y se lleva a un volumen final de 1L.
- **Reactivo R2:** diclorohidruro de NED. Se disuelven 0,5 g de diclorohidruro de NED en 500 mL de agua destilada.

Se introducen 5 mL de muestra convenientemente diluída, en un tubo de ensayo plástico y se le añaden 100 µL de cada una de las disoluciones de reactivo. Se agita, se cierra el tubo y se esperan 20 min para que se establezca el color. A continuación, se mide la absorbancia de la muestra a 543 nm en un espectrofotómetro Cecil 7200 serie 7000.

Para la cuantificación de la concentración de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>·L<sup>-1</sup>, se realiza una recta de calibrado con disoluciones patrón de NaNO<sub>2</sub> en concentraciones comprendidas en el intervalo 0-0,24 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>·L<sup>-1</sup>.

- **Nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)**

La concentración de nitrato en aguas residuales se determina siguiendo el método 4500-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-B descrito en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA\_AWWA\_WPCF, 1998). Se trata de un método espectrométrico ultravioleta selectivo que sólo se utiliza para analizar muestras con bajo contenido en materia orgánica.

La medida de la absorción ultravioleta (UV) a 220 nm hace posible la determinación rápida de nitrato. Dado que la materia orgánica disuelta puede absorber a 220 nm y el nitrato no lo hace a 275 nm, se puede utilizar una segunda medida a 275 nm para corregir el valor de nitrato. Esta corrección empírica supone la diferencia entre la absorbancia a 220 nm y el doble de la absorbancia a 275 nm (**Ec. 3.6**).

$$A_{NO_3^-} = A_{220} - 2 \cdot A_{275} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde  $A_{NO_3^-}$  es la absorbancia del N-NO<sub>3</sub>,  $A_{220}$  es la absorbancia de la muestra a 220 nm y  $A_{275}$  es la absorbancia de la muestra a 275 nm.

En este método se pueden producir interferencias por materia orgánica, surfactantes, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y Cr<sup>+6</sup>. También pueden interferir varios iones inorgánicos como clorito y clorato.

Para determinar la concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se toman 5 mL de muestra, diluida según sea necesario y se le añaden 100 µL de HCl 1N. Se añade además una cucharadita de H<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>S para eliminar las interferencias por nitrito. Se agita bien la muestra y se realiza la medida de la absorbancia a 220 y 275 nm en un espectrofotómetro Cecil 7200 serie 7000.

Para la cuantificación de la concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>·L<sup>-1</sup> se realiza una recta de calibrado con disoluciones patrón de KNO<sub>3</sub> en concentraciones comprendidas en el intervalo 0-1 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>·L<sup>-1</sup>.

Este método es válido para determinar la concentración de nitrato en muestras de agua con bajo contenido en materia orgánica. Si el valor de corrección supera el 10% de la lectura a 220 nm, no se debe utilizar este método, recurriendo en ese caso a la cromatografía iónica.

La cromatografía iónica es una variante de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC, del inglés *High Pressure Liquid Chromatography*). Es un método eficaz para la separación y determinación de iones, basado en el uso de resinas de intercambio iónico. Cuando una muestra iónica atraviesa estas columnas, los iones presentes sufren una separación debido a las diferentes retenciones que sufren al interactuar con la fase fija de la columna analítica. A continuación, se agrega un líquido de extracción iónica conocido como eluyente, el cual al traspasar la columna hace que los iones adsorbidos comiencen a separarse de ésta. El tiempo de elusión, o tiempo que tarda un ión en pasar a través de la columna varía para cada especie, lo cual indica que saldrán de la columna en momentos diferentes. En el extremo de la columna hay un detector que registra la señal obtenida respecto al tiempo de retención. El resultado son unos cromatogramas que representan tiempo vs voltaje, donde la posición de los máximos de los picos indica el ión presente (carácter cualitativo) mientras que su área y altura indican en qué cantidad se encuentra (carácter cuantitativo).

En este caso, la determinación de aniones se realiza en un cromatógrafo iónico 861 Advanced Compact IC. La muestra líquida se introduce en el sistema mediante un inyector 838 Advanced Sample Procesor, y atraviesa la columna de intercambio iónico Metrosep A Supp5-250/4 mm. El eluyente es una mezcla de carbonato 3,2 mMol-bicarbonato 1mMol. El equipo está dotado de un detector de conductividad que relaciona directamente la conductividad con la concentración de cada especie.

### 3.3.2. Fase sólida

#### 3.3.2.1. Determinación de sólidos

Los análisis de sólidos son importantes en el control de tratamiento biológico y físico de aguas residuales, y para evaluar el cumplimiento de las limitaciones que regulan su vertido.

Los sólidos contenidos en el agua pueden encontrarse en disolución o en suspensión. Asimismo, los sólidos pueden ser orgánicos e inorgánicos.

Sólidos totales (ST) es la expresión que se aplica a los residuos del material que quedan en un recipiente después de la evaporación de la muestra y su consecutivo secado en estufa a temperatura definida. Como se ha mencionado anteriormente, los sólidos totales incluyen los sólidos en suspensión, o sólidos retenidos por un filtro, y los sólidos disueltos (SD) que es la fracción de sólidos capaz de atravesar el filtro (**Ec. 3.7**).

$$ST = SS + SD \quad (\text{Ec. 3.7})$$

donde ST son los sólidos totales (mg/L), SS son los sólidos en suspensión (mg/L) y SD son los sólidos disueltos (mg/L).

Los sólidos volátiles (SV) y los sólidos en suspensión volátiles (SSV) son la fracción de ST y sólidos en suspensión totales (SST), respectivamente que se pierden por ignición durante un tiempo determinado y a una temperatura especificada. La determinación de sólido fijados (residuo de la muestra tras la ignición) y volátiles no distingue exactamente entre materia orgánica e inorgánica ya que la pérdida de peso por ignición no se limita al material orgánico, sino que incluye también pérdida por descomposición o volatilización de algunas sales minerales.

La determinación de SST es especialmente útil en el control de la operación de las plantas de tratamiento de aguas residuales debido a que ofrece información robusta sobre la cantidad de materia orgánica presente en la fracción sólida del agua residual, lodos activos o aguas residuales industriales.

La concentración de ST y SST se determinan siguiendo los métodos 2540-B y 2540-D descritos en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA\_AWWA\_WPCF, 1998). Mientras, los SV y SSV se determinan siguiendo el método 2540-E.

A continuación, se detallan los procedimientos a seguir:

- **Sólidos Totales**

a. Se introduce una cápsula de porcelana en la estufa durante una hora. A continuación, se deja enfriar en un desecador y se pesa.

NOTA: Si, a continuación, se van a medir sólidos volátiles la cápsula de porcelana debe introducirse en la mufla 550° C durante media hora y no en la estufa.

b. Se toman unos 10 mL de muestra bien mezclada y se introducen en la cápsula. Se puede cambiar el volumen de la muestra en función de la concentración esperada, debiendo estar el residuo seco entre 2,5 y 200 mg.

c. Se deja secar la cápsula hasta peso constante en estufa a 103-105° C.

d. Se pasa la cápsula a un desecador, se deja que enfríe el crisol y se pesa.

La concentración de sólidos totales se calcula aplicando la **ecuación 3.8**:

$$ST = \frac{(A - B) \cdot 1000}{V_{muestra} (mL)} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

donde ST es la concentración de sólidos totales (mg/L), A es el peso del residuo seco más la cápsula (mg), B es el peso de la cápsula vacía (mg) y  $V_{muestra}$  es el volumen de la muestra introducida en la cápsula (mL).

- **Sólidos Volátiles**

a. Se introduce la cápsula de porcelana en la cual se determinaron los sólidos totales a la mufla a 550° C durante media hora.

b. Se retira la cápsula de la mufla y se deja enfriar en un desecador antes de pesarla. La pérdida de masa producida tras la ignición corresponden a los sólidos volátiles.

La concentración de sólidos volátiles se calcula aplicando la **ecuación 3.9**:

$$SV = \frac{(A - C) \cdot 1000}{V_{muestra} (mL)} \quad (\text{Ec. 3.9})$$

donde SV es la concentración de sólidos volátiles (mg/L), A es el peso del residuo seco más la cápsula (mg), C es el peso de la cápsula tras la ignición (mg) y  $V_{muestra}$  es el volumen de la muestra introducida en la cápsula (mL).

- **Sólidos en Suspensión Totales**

a. Mantener un filtro en la estufa durante una hora. Si se van medir sobre este mismo filtro sólidos en suspensión volátiles, se mantendrá el filtro en una mufla a 550° C durante media hora.

b. En las determinaciones llevadas a cabo durante el presente trabajo, se utilizaron filtros de fibra de vidrio Whatman del modelo GF/C de 4,7 cm de diámetro.

c. Se retira el filtro, se deja enfriar en el desecador y se pesa.

d. Filtrar a vacío un volumen de muestra bien mezclada en cantidad tal que la masa de residuo seco se encuentre entre 2,5 y 200 mg.

e. Recoger el filtro con el residuo e introducirlo en la estufa a 103-105° C durante 2 horas hasta alcanzar peso constante.

f. Dejar enfriar en el desecador y pesar. El incremento de peso del filtro representa la masa de sólidos en suspensión totales.

La concentración de SST se calcula aplicando la **ecuación 3.10**:

$$SST = \frac{(A - B) \cdot 1000}{V_{filtrado} (mL)} \quad (\text{Ec. 3.10})$$

donde SST es la concentración de sólidos en suspensión totales del licor de mezcla (mg/L), A es el peso del filtro y el residuos seco (mg), B es el peso del filtro limpio (mg) y  $V_{filtrado}$  es el volumen de la muestra filtrado (mL).

- **Sólidos en Suspensión Volátiles**

a. Se introduce el filtro con el residuo seco en la mufla a 550° C durante media hora.

b. Se retira el filtro de la mufla y se deja enfriar en un desecador antes de pesarlo.

La concentración de sólidos en suspensión volátiles se calcula aplicando la **ecuación 3.11**:

$$SSV = \frac{(A - C) \cdot 1000}{V_{filtrado} (mL)} \quad (\text{Ec. 3.11})$$

donde SSV es la concentración de sólidos en suspensión volátiles (mg/L), A es el peso del filtro con el residuo seco (mg), C es el peso del filtro tras la ignición (mg) y  $V_{filtrado}$  es el volumen de la muestra filtrado (mL).

### 3.3.2.2. Índice volumétrico de lodos

El índice volumétrico de lodos (IVL) y la velocidad de sedimentación de lodos (VSL) son dos parámetros de seguimiento que se utilizan en depuración de aguas residuales para determinar las propiedades de sedimentabilidad de lodos.

El IVL aporta información sobre la capacidad máxima de un lodo para ser concentrado mediante sedimentación. Expresa la relación entre el volumen (en mL) de lodos sedimentados en 30 minutos de una muestra de 1000 mL y la concentración de SST del licor de mezcla (en mg/L) multiplicada por 1000, de acuerdo a la **ecuación 3.12**:

$$IVL \left( \frac{mL}{g} \right) = \frac{V_{\text{lodo decantado tras 30 min}} \left( \frac{mL}{L} \right) \cdot 1000}{SST \left( \frac{mg}{L} \right)} \quad (\text{Ec. 3.12})$$

Este índice también se conoce con el nombre de índice de Mohlman.

Para determinar el volumen de lodo decantado en media hora, se introduce 1 L de licor de mezcla perfectamente homogeneizado en un cono Imhoff y al cabo de 30 minutos, se lee el volumen de lodo sedimentado. De este modo se obtiene el valor del numerador de la **ecuación 3.12** (mL lodo decantado · L<sub>licor de mezcla</sub><sup>-1</sup>).

Los valores típicos de IVL para lodos de buenas características de sedimentación con concentraciones de 800-3500 mg·L<sup>-1</sup> están comprendidos dentro del intervalo 150-35.

### 3.3.2.3. Velocidad de sedimentación

La VSL se utiliza para determinar la velocidad máxima de decantación de una suspensión en agua (m/h). Lodos con buenas características de sedimentabilidad tienen velocidades de sedimentación mayores de 1 m/h.

La metodología a seguir para la determinación de la velocidad de sedimentación es la siguiente: se toma 1 L de licor de mezcla perfectamente homogeneizado y se introduce en una probeta. Se pone el cronómetro en marcha y se realiza un seguimiento de la interfase entre el líquido clarificado y la suspensión con los lodos biológicos durante, al menos, media hora. Se anotan los valores de volúmenes de lodo sedimentado con el tiempo y a continuación, se transforman estos volúmenes en datos de altura. La VSL corresponde a la velocidad máxima de sedimentación obtenida tras el ensayo de 30 minutos.

### 3.3.3. Fase gaseosa

#### 3.3.3.1. Composición y caudal de biogás

El análisis de la composición del biogás se lleva a cabo mediante cromatografía de gases (APHA,1992). La determinación se llevó a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 serie II dotado de detector de conductividad térmica.

Se procede inyectando 1 mL de muestra con una jeringuilla a través del septum situado en la parte superior del cromatógrafo. Las temperaturas del inyector, del horno y del detector son 110, 35 y 110° C, respectivamente. En el cromatograma resultante se obtienen los picos correspondientes a nitrógeno (N<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>) que contiene la mezcla gaseosa así como las áreas de dichos picos.

El porcentaje molar o volumétrico de cada uno de los gases citados se calcula mediante la **ecuación 3.13**:

$$\% M_i = \frac{\text{Área pico}_i / f_i}{\sum_{i=1}^4 (\text{Área pico}_i / f_i)} \quad (\text{Ec. 3.13})$$

donde  $\% M_i$  es el porcentaje molar del componente  $i$  de la muestra gaseosa,  $\text{Área pico}_i$  es el área del pico del cromatograma para el componente  $i$  y  $f_i$  es el factor de calibrado de dicho componente.

El caudal de biogás producido en el reactor anaerobio metanogénico se mide con un contador de volumen MilliGasCounter MGC-10 (**Figura 3.6**). Este instrumento consiste en un recipiente lleno de líquido que alberga un cuerpo basculante (**Figura 3.6, 7**) formado por dos cámaras (**Figura 3.6, 8**). El gas entra al recipiente por la base del equipo a través de un tubo capilar (**Figura 3.6, 5**), ascendiendo en forma de burbujas. Alternativamente, las burbujas desplazan el líquido de relleno que ocupa el interior de las cámaras que forman el cuerpo basculante. Cada cambio de posición es detectado por la combinación de un imán permanente (**Figura 3.6, 9**) y un sensor magnético y traducido en caudal de gas en la pantalla de visualización (**Figura 3.6, 11**). Se debe tener especial cuidado en mantener este instrumento en perfectas condiciones de limpieza para garantizar que la lectura de biogás registrada es correcta.

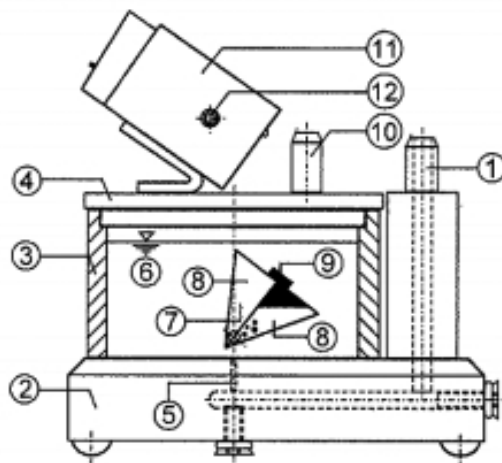


Figura 3.6. Ritter MilliGascounter®.

### 3.3.3.2. Concentración de metano disuelto

La concentración de metano disuelto se calcula mediante la aplicación conjunta de la ley de los gases ideales (Ec. 3.14) y la ley de Henry (Ec. 3.15).

$$P_{CH_4} \cdot V = n_{CH_4} \cdot R \cdot T \quad (\text{Ec. 3.14})$$

$$(C_{CH_4})_g = H_{CH_4} \cdot P_{CH_4} \quad (\text{Ec. 3.15})$$

donde  $P_{CH_4}$  es la presión parcial de metano,  $V$  es el volumen total,  $n_{CH_4}$  es el número de moles de metano,  $R$  es la constante de los gases ideales,  $T$  es la temperatura del sistema,  $(C_{CH_4})_g$  es la concentración del gas metano (solubilidad),  $H_{CH_4}$  es la constante de Henry (depende de la naturaleza del gas, temperatura y del líquido) y  $P_{CH_4}$  es la presión parcial de metano.

La ley de Henry establece que existe un equilibrio entre el metano disuelto en la fase líquida y la presión parcial de metano en la fase gas por encima de la disolución.

Para su cuantificación, se toman aproximadamente 300 mL de muestra en una botella Pyrex de 500 mL provista de cierre hermético (Figura 3.6). Se agita la muestra durante 3 minutos y se extrae con una jeringa una muestra de gas de 1 mL del espacio de cabeza que se analiza por cromatografía gaseosa.



Figura 3.7. Botella Pyrex y jeringa para toma muestra fase gaseosa.

### 3.4. Cálculos y balances

Para determinar las eficacias de eliminación de nitrógeno y carbono se realiza un balance de materia global (Ec. 3.16) a los reactores implicados en el proceso.

$$Q_e \cdot C_e - Q_s \cdot C_s + r \cdot V_r = 0 \quad (\text{Ec. 3.16})$$

donde  $Q_e$  es el caudal volumétrico de entrada ( $\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$ ),  $C_e$  es la concentración de la especie en la corriente de entrada ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $Q_s$  es el caudal volumétrico de salida ( $\text{L} \cdot \text{d}^{-1}$ ),  $C_s$  es la concentración de la especie en la corriente de salida ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $r$  es la velocidad de generación o desaparición de la especie ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) y  $V_r$  es el volumen del reactor (L).

#### 3.4.1. Eliminación de DQO

La eficacia de eliminación de la materia orgánica se evalúa a través de la eliminación de la DQO presente en el agua.

Se diferencia entre la eliminación de DQO llevada a cabo en el reactor anaerobio metanogénico (Ec. 3.17) y la eliminación del sistema integrado SIAL (Ec. 3.18).

$$\% \text{ Eliminación DQO anaerobio} = \left( \frac{C_{(DQO_t)_f} - C_{(DQO_t)_{ef \text{ UASB}}}}{C_{(DQO_t)_f}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3.17})$$

donde  $C_{(DQO_t)_f}$  es la concentración de DQO total en la alimentación del sistema ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) y  $C_{(DQO_t)_{ef \text{ UASB}}}$  es la concentración de DQO total del efluente líquido del UASB ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

$$\% \text{ Eliminación DQO sistema} = \left( \frac{C_{(DQO_t)_f} - C_{(DQO_t)_{ef \text{ SIAL}}}}{C_{(DQO_t)_f}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3.18})$$

donde  $C_{(DQO)_t_f}$  es la concentración de DQO total en la alimentación del sistema ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $C_{(DQO)_t_{ef\ SIAL}}$  es la concentración de DQO total del efluente del SIAL ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 3.4.2. Eliminación de metano

El porcentaje de metano eliminado en el sistema SIAL vendrá dado por la **ecuación 3.19**:

$$\% \text{ Eliminación } CH_4 = \left( \frac{(CH_4)_{eliminado}}{(CH_4)_{UASB}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3.19})$$

donde  $(CH_4)_{eliminado}$  es el caudal másico de metano eliminado en el sistema ( $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ) y  $(CH_4)_{UASB}$  es el caudal másico de metano presente en el efluente del reactor metanogénico UASB ( $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

Se admite en el planteamiento de los balances de materia de metano que la eliminación de metano sólo tiene lugar en la cámara anóxica pero que la concentración de metano en la cámara aerobia no es cero. De este modo, realizando el balance de materia a la cámara anóxica, el caudal másico de metano eliminado viene dado por la **ecuación 3.20**:

$$(CH_4)_{eliminado} = Q_f \cdot (C_{CH_4})_{UASB} + (Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{CH_4})_{aerob} - (Q_f + Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{CH_4})_{anox} \quad (\text{Ec. 3.20})$$

donde  $Q_f$  es el caudal volumétrico de alimentación del sistema ( $\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$ ),  $(C_{CH_4})_{UASB}$  es la concentración de metano en el efluente líquido del UASB ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $Q_{ra}$  es el caudal volumétrico de la corriente de recirculación de la cámara aerobia a la cámara anóxica ( $\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$ ),  $Q_{rs}$  es el caudal volumétrico de la recirculación de lodo del decantador a la cámara anóxica ( $\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$ ),  $(C_{CH_4})_{aerob}$  es la concentración de metano en la cámara aerobia ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $(C_{CH_4})_{anox}$  es la concentración de metano en cámara anóxica ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Entonces, teniendo en cuenta la ecuación 3.20, la expresión del porcentaje de eliminación de metano del sistema vendrá dada por la **ecuación 3.21**:

$$\% \text{ Eliminación } CH_4 = \left( \frac{[Q_f \cdot (C_{CH_4})_{UASB} + (Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{CH_4})_{aerob} - (Q_f + Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{CH_4})_{anox}]}{Q_f \cdot (C_{CH_4})_{UASB}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3.21})$$

Además, se definen las tasas de eliminación volumétrica y específica de metano (**Ec. 3.22 y 3.23**) como el caudal másico de metano eliminado por unidad de volumen de reactor y por masa de SSVLM, respectivamente.

$$\begin{aligned} & \text{Tasa eliminación volumétrica } CH_4 \\ &= \frac{Q_f \cdot (C_{CH_4})_{UASB} (Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{CH_4})_{aerob} - (Q_f + Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{CH_4})_{anox}}{V_{c.anox}} \end{aligned} \quad (\text{Ec. 3.22})$$

donde  $V_{c.anox}$  es el volumen de la cámara anóxica (L).

$$\begin{aligned} & \text{Tasa eliminación específica } CH_4 \\ &= \frac{Q_f \cdot (C_{CH_4})_{UASB} (Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{CH_4})_{aerob} - (Q_f + Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{CH_4})_{anox}}{(C_{SSVLM})_{c.anox} \cdot V_{c.anox}} \end{aligned} \quad (\text{Ec. 3.23})$$

donde  $(C_{SSVLM})_{c.anox}$  es la concentración de SSV del licor de mezcla de la cámara anóxica ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 3.4.3. Eliminación de nitrógeno

El porcentaje de nitrógeno eliminado en el sistema SIAL vendrá dado por la **ecuación 3.24**:

$$\% \text{ Eliminación } NT \text{ sistema} = \left( \frac{NT_{eliminado}}{NT_{UASB}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3.24})$$

donde  $NT_{eliminado}$  es el caudal másico de nitrógeno total eliminado en el sistema ( $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ) y  $NT_{UASB}$  es el caudal másico de nitrógeno total presente en el efluente del reactor metanogénico UASB ( $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

En el reactor anaerobio metanogénico UASB no se produce apenas eliminación de nitrógeno, solo la biomasa anaerobia granular consume una pequeña parte para crecimiento celular. La eliminación de nitrógeno tiene lugar en el post-tratamiento del efluente del reactor UASB. Teniendo esto en cuenta, el porcentaje de eliminación de nitrógeno total en el sistema se puede expresar mediante la **ecuación 3.25**:

$$\% \text{ Eliminación } NT \text{ sistema} = \left( \frac{(C_{NT})_{UASB} - (C_{NT})_{ef SIAL}}{(C_{NT})_{UASB}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3.25})$$

donde  $(C_{NT})_{UASB}$  es la concentración de nitrógeno total en el efluente del UASB ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $(C_{NT})_{ef SIAL}$  es la concentración de nitrógeno total en el efluente de salida del SIAL ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Los procesos de desnitrificación tienen lugar en la cámara anóxica del biorreactor híbrido, de tal modo que se pueden expresar las tasas de eliminación volumétrica y específica de NT del sistema de post-tratamiento como las correspondientes a dicha cámara (**ecuaciones 3.26 y 3.27**):

*Tasa eliminación volumétrica NT*

$$= \frac{Q_f \cdot (C_{NT})_{UASB} + (Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{NT})_{aerob} - (Q_f + Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{NT})_{anox}}{V_{c.anox}}$$

(Ec. 3.26)

donde  $(C_{NT})_{aerob}$  es la concentración de nitrógeno total en la cámara aerobia ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

*Tasa eliminación específica NT*

$$= \frac{Q_f \cdot (C_{NT})_{UASB} + (Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{NT})_{aerob} - (Q_f + Q_{ra} + Q_{rs}) \cdot (C_{NT})_{anox}}{(C_{SSVLM})_{c.anox} \cdot V_{c.anox}}$$

(Ec. 3.27)



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Arranque y optimización del sistema

El sistema de reactor metanogénico y biorreactor de biomasa en suspensión y biopelículas se puso en marcha en dos fases: 1) Arranque del reactor metanogénico UASB; 2) Arranque del post-tratamiento del efluente del reactor UASB.

El día 29 de octubre de 2015, se realizó el arranque del reactor metanogénico utilizando 55 L de biomasa anaerobia, procediendo 45 L ( $30 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de un reactor anaerobio de lodo granular activo de una industria cervecera (Estrella Galicia) situada en A Coruña y 10 L ( $30 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de biomasa granular activa de un reactor UASB experimental que trata un influente de características semejantes al sistema objeto de estudio. Una vez introducida la biomasa anaerobia se completó el volumen del reactor con agua de servicio y se comenzó a alimentar el sistema. El reactor UASB comenzó a alimentarse con un caudal promedio de  $68\pm 3 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$  correspondiéndole una VCO de  $0,64\pm 0,08 \text{ kg COD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ . Inicialmente, se aplica una VCO baja para conseguir la aclimatación de la biomasa anaerobia a las características del influente.

El sistema de post-tratamiento del efluente del reactor UASB se puso en marcha 6 días después del arranque del reactor UASB. En este caso, para inocular el sistema se utilizaron 10 L de biomasa procedente de las purgas de la cámara anóxica de un reactor UASB con biomasa ya adaptada con una concentración media de  $5 \text{ gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ . A continuación, se introdujeron los soportes Levapor® y Biochip® en las cámaras anóxica y aerobia, respectivamente, y se mantuvo el sistema parado durante 3 horas para favorecer la adhesión de la biomasa a los soportes.

Tras comprobar que las eliminaciones de DQO y los porcentajes de metanización del sistema anaerobio se mantienen estables, a partir del día 14 de operación, se duplica el caudal de alimentación (valor promedio  $150\pm 8 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ ) con unas VCO promedio para el reactor UASB y el sistema completo de  $1,15\pm 0,35$  y  $0,78\pm 0,24 \text{ kgCOD}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ , respectivamente.

El principal problema operacional del sistema durante el período de estudio fue la aparición de fango ascendente en el decantador, a partir del día 19 de operación. Este problema estaba asociado al mal funcionamiento de la recirculación de lodos (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1.** Imagen de fango ascendente en el decantador del sistema.

El problema de fango ascendente se produce como consecuencia de la desnitrificación convencional de nitritos y nitratos presentes en el agua residual debido a la formación de un ambiente anóxico en las capas internas del lodo sedimentado. A medida que se produce nitrógeno en el seno de la capa de fango, parte de él queda retenido en el mismo, de tal modo que si se forma una cantidad de gas suficiente, la boyancia de la masa de fango provoca que flote. El fango ascendente se caracteriza por aparición de burbujas de gas adheridas a los sólidos flotantes.

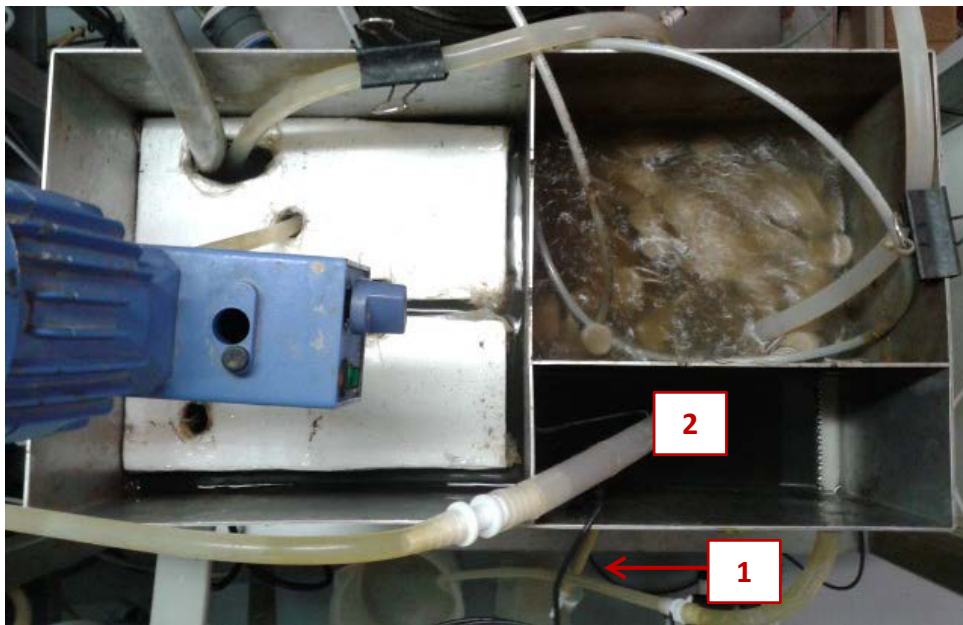
Este problema de fango ascendente se considera que se encuentra asociado a un problema con la recirculación de lodos del decantador. Se comienza a observar que esta corriente no recircula la biomasa depositada en la parte inferior del decantador sino agua residual con menor cantidad de sólidos que la que se observa en suspensión en la cámara aerobia. Las características de la corriente de recirculación de lodos indican que se está formando una capa de lodo a media altura que actúa como filtro, favoreciendo, además, la aparición del fango ascendente debido a la acumulación del mismo en el decantador.

El problema de la recirculación de lodos se comprueba realizando una purga del decantador por gravedad. Aunque inicialmente el líquido que abandona el decantador es muy claro, transcurridos unos segundos, comienza a salir lodo maloliente (indicador de anaerobiosis) del interior del decantador. Este mal olor evidencia la acumulación de lodo en el decantador con el consecuente estrés de las bacterias nitrificantes y desnitrificantes, lo cual afectará tanto a su actividad como a su capacidad sedimentación.

Este problema se intenta abordar realizando los siguientes cambios:

1) Aumento del caudal de la corriente de recirculación de lodo para aumentar la succión (día 71 de operación). Se aumentó el caudal de dicha corriente en un factor de 1,5 respecto al valor inicial, manteniendo la relación de recirculación del sistema en  $R=3$ . La medida no tiene efecto.

2) Cambio en la disposición de la salida de recirculación de lodos (día 83 de operación). Se cierra la purga de fangos del diseño original del decantador y se recircula introduciendo una conducción directamente en el interior del decantador (**Figura 4.2**). Se mantiene el caudal de recirculación en 1,5 veces el caudal inicial.



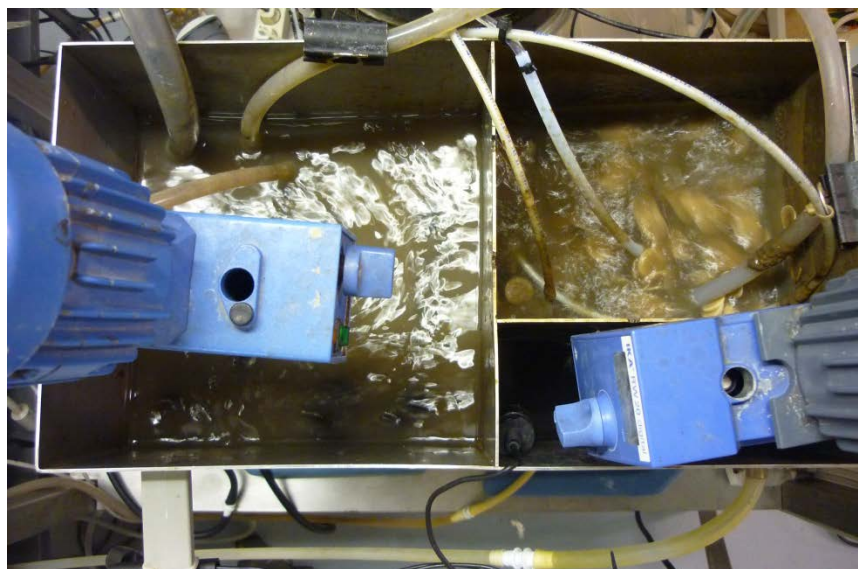
**Figura 4.2.** Cambio disposición de la recirculación de lodos del sistema: 1) Original; 2) Nueva.

Tras 5 días de operación, los problemas de fango ascendente y recirculación de lodos persisten (**Figura 4.3**).



**Figura 4.3.** Imagen de fango ascendente en decantador.

3) Instalación de un agitador en el decantador (día 88 de operación). Se dispone un agitador provisto de una varilla de palas cortas en el decantador y se vuelve a conectar la conducción de recirculación de lodos del diseño original (**Figura 4.4**). Se selecciona la menor velocidad de giro para el agitador y se acopla a un temporizador, para que lo active durante períodos de 1 minuto cada 30 minutos.



**Figura 4.4.** Imagen del biorreactor con el agitador instalado en el decantador.

Utilizando este sistema, se consigue obtener una corriente de recirculación de biomasa continua de buena calidad, tanto en los períodos de funcionamiento como de reposo del agitador. Sin embargo, aunque durante los primeros días no se observa apenas lodo ascendente en el decantador, el problema se agrava de nuevo a partir del día 95 de operación.

Dado que, al término del trabajo experimental, las medidas llevadas a cabo en el decantador no han permitido resolver el problema de fango ascendente se plantea la posibilidad de aumentar el diámetro de la salida de recirculación de lodos para evitar su acumulación en el decantador.

El sistema sufrió dos desbordes durante el período de operación de estudio, concretamente los días 41 y 59 de operación. Estos desbordes fueron debidos a la obstrucción de los orificios de paso del LM de la cámara anóxica a la cámara aerobia debido a gránulos de biomasa anaerobia del UASB arrastrados en el efluente de dicho reactor. El taponamiento produjo un aumento del nivel de líquido en la cámara anóxica y el desbordamiento del LM de las dos cámaras al no disponer en ese momento el biorreactor de un sistema de control de nivel ni rebosaderos. Para prevenir estos incidentes se habilitaron rebosaderos entre las cámaras y el decantador. Asimismo, fue instalado un sensor de nivel en el decantador conectado a un controlador lógico programable (PLC, del inglés *Programmable Logic Controller*). Éste al detectar un aumento del nivel de líquido produce la parada de la alimentación del sistema.

#### 4.2. Eliminación de DQO

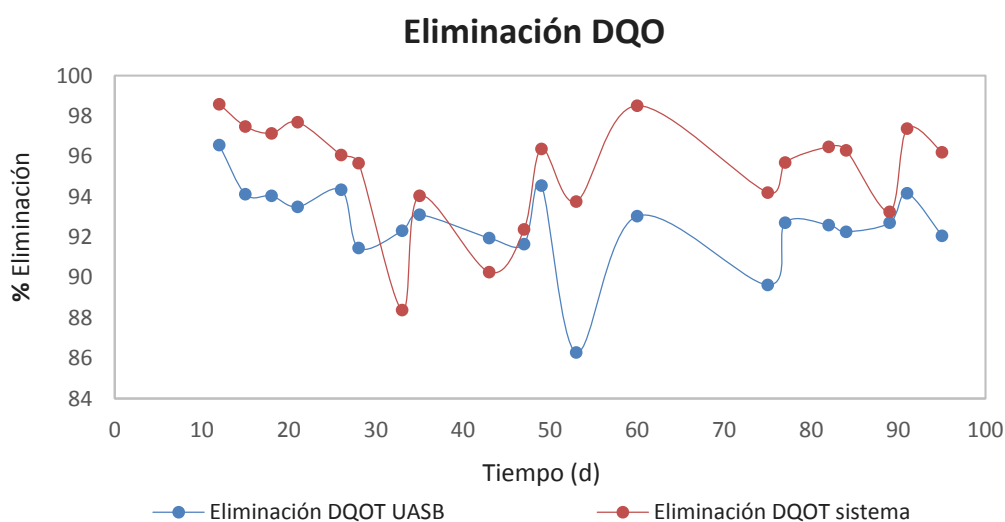
Se pueden diferenciar dos etapas en el experimento:

1) Etapa de arranque del reactor UASB: Durante esta etapa el sistema fue alimentado con un caudal de  $68 \pm 3 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ , para favorecer la aclimatación de la biomasa anaerobia siendo la VCO del reactor de  $0,64 \pm 0,08 \text{ kg COD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ .

2) Etapa de operación convencional: A partir del día 14 de operación, una vez el proceso anaerobio metanogénico se mantuvo estable, se procedió a alimentar el sistema con un caudal de  $141 \pm 8 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ , ascendiendo la VCO del reactor UASB a  $1,15 \pm 0,35 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ . La VCO aplicada en el post-tratamiento del UASB durante la etapa de operación ha sido de  $0,18 \pm 0,04 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ .

Durante la etapa de operación, los valores promedio de DQOT en las corrientes de alimentación, efluente de UASB y efluente del sistema global fueron de  $872 \pm 184 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $66 \pm 17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $39 \pm 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivamente. De acuerdo con esta concentración de DQO, el efluente del sistema cumple la legislación aplicable (Directiva 91/271/CEE) para su vertido tanto a zonas sensibles como no sensibles al ser su valor inferior a los  $125 \text{ mg DQO} \cdot \text{L}^{-1}$ .

En la **Figura 4.5** se presenta la evolución de los porcentajes de eliminación de DQOT del reactor UASB y del sistema global. Los valores promedio de los porcentajes de eliminación son de  $92,7 \pm 2,03\%$  y  $95,3 \pm 2,60\%$ , respectivamente. Estos datos indican que la eliminación de DQO tiene lugar principalmente en el sistema anaerobio UASB.



**Figura 4.5.** Porcentajes de eliminación de DQOT del reactor metanogénico y del sistema global.

En el post-tratamiento del efluente del reactor UASB se consiguen eliminaciones de DQO del  $36,6 \pm 30,5\%$ , debido fundamentalmente a procesos de oxidación de la materia orgánica. La concentración de DQOT en el efluente del reactor UASB tiene un valor de  $48 \pm 13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , siendo en su mayor parte DQOT de tipo recalcitrante que es difícilmente degradada por los microorganismos. La presencia de bajas concentraciones de DQO fácilmente biodegradable permite que se fomenten vías de desnitrificación utilizando metano como dador de electrones. La desviación del valor del porcentaje de eliminación de DQOT en el biorreactor híbrido puede ser debida a varias causas: cambio del punto de toma de muestra de efluente final, presencia de ciertos microorganismos en el efluente del sistema, variabilidad de la concentración de biomasa en suspensión durante la etapa experimental o problemas de fango ascendente en el decantador.

En los reactores del tipo UASB, la biomasa anaerobia metanogénica es capaz de transformar la materia orgánica en biogás, rico en metano, en ausencia de oxígeno. Durante la operación del sistema, la producción media de biogás obtenida ha sido de  $37,7 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$  siendo la concentración promedio de metano, dióxido de carbono y nitrógeno de  $74,7 \pm 1,89\%$ ,  $16,0 \pm 1,74\%$  y  $9,2 \pm 2,3\%$ , respectivamente y alcanzando la tasa de metanización un valor de  $66 \text{ m}^3 \text{ CH}_4 \cdot \text{kg DQO}^{-1}$ . El biogás producido es de alta calidad y pureza debido al alto porcentaje de  $\text{CH}_4$  que contiene. Parte del metano total generado durante el proceso anaerobio, un  $17 \pm 8\%$ , abandona el sistema disuelto en el efluente del UASB constituyendo una fracción de salida de DQO.

La biomasa anaerobia, de crecimiento entre 6 y 8 veces menor que la biomasa aerobia, consume una pequeña fracción de DQO de la alimentación destinándola a procesos de

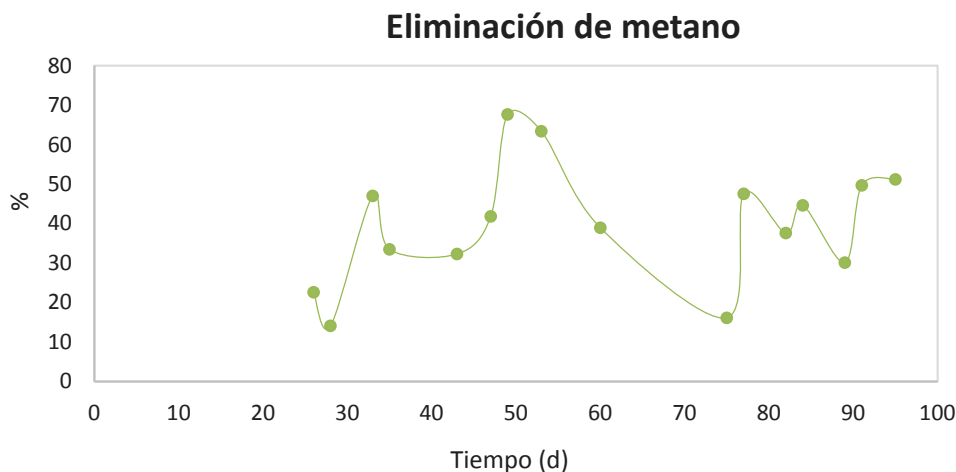
crecimiento celular. Cabe destacar que durante la etapa experimental, se realizó una purga de 6 L de biomasa con una concentración de  $30 \text{ g SSV} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Cuando se realizan los balances de materia al sistema en términos de DQO, se observa que las contribuciones de los términos de entradas y salidas no están compensadas. Existe un promedio de desviación de las entradas respecto a las salidas del  $30 \pm 16\%$ . Diversos motivos han podido interferir a la hora de cerrar el balance de DQO en el total del sistema de tratamiento: el medidor de volumen de biogás Ritter®, errores analíticos en la determinación de este parámetro así como el procedimiento de toma de muestra para determinación de metano disuelto en el efluente del UASB. Pequeñas turbulencias en la toma de muestra producen la desorción de metano de dicha corriente de tal modo que, con mucha probabilidad, la concentración real de metano disuelto será mayor que la que se detecta por cromatografía de gases.

### 4.3. Eliminación de metano

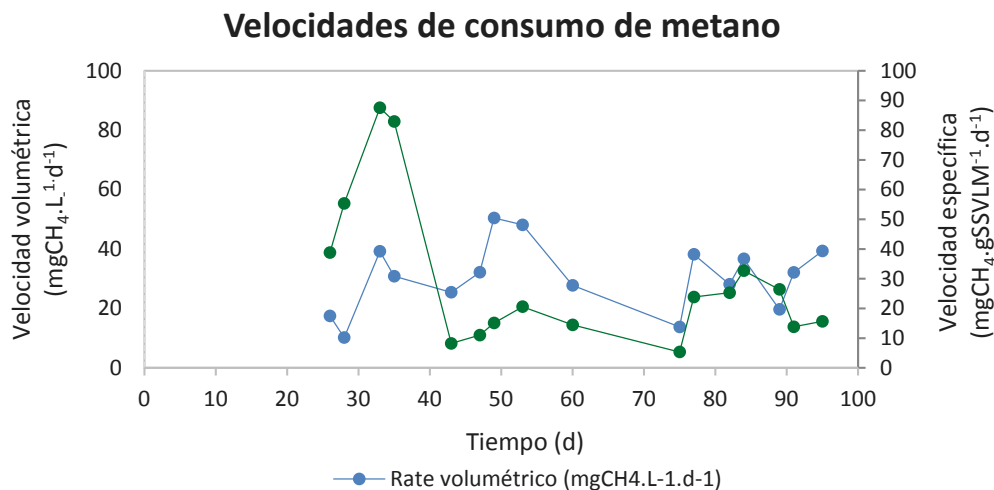
Durante el período de estudio, la concentración promedio de metano en el efluente del reactor metanogénico UASB fue de  $19,0 \pm 1,52 \text{ mg CH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ . Las principales causas de la desviación de este valor pueden ser las oscilaciones de temperatura de operación del sistema ( $19,2\text{-}21,9^\circ \text{C}$ ) así como la fácil desorción del metano al realizar la toma de muestra de la corriente. Este valor de concentración representa un  $17 \pm 8\%$  del metano total generado en el reactor UASB, encontrándose por debajo de los porcentajes esperados de entre el 30-50% para aguas residuales de características semejantes en términos de DQO y a una temperatura de  $20^\circ \text{C}$  según bibliografía consultada (Souza *et al.*, 2011; Noyola *et al.*, 1988).

La **Figura 4.6** muestra la evolución del porcentaje de eliminación de metano en la cámara anóxica siendo el valor promedio de eliminación durante el período de estudio del  $43,0 \pm 16,0\%$ .



**Figura 4.6.** Porcentajes de eliminación de metano en la cámara anóxica.

Las tasas de eliminación volumétrica y específica durante la etapa experimental alcanzaron valores promedio de  $33,0 \pm 9,69 \text{ mg CH}_4 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  y  $27,35 \pm 24,72 \text{ mg CH}_4 \cdot \text{g SSVLM}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivamente. En la **Figura 4.7** se muestra la evolución de las tasas de eliminación de metano en el período de estudio.



**Figura 4.7.** Velocidades de consumo volumétricas y específicas de metano.

En las **Figuras 4.6 y 4.7** se observa la variabilidad de los parámetros representados. La variación es propia de la etapa de arranque de cualquier sistema si bien se cree que esta resultó afectada principalmente por los siguientes motivos: el inicio natural del proceso de nitrificación, la baja actividad de las bacterias nitrificantes debido posiblemente al estrés producido por los problemas de recirculación de lodos así como los desbordes (días 41 y 59 de operación) que tuvieron lugar en el sistema.

Al término del estudio, en vista de los resultados obtenidos, se plantean 2 hipótesis para explicar el porqué de que no haya sido posible alcanzar mayores porcentajes de eliminación de metano, 1) Baja concentración de aceptores de electrones, nitrito y nitrato, presentes en el medio. 2) Bajas concentraciones de biomasa presente, tanto en suspensión como formando biopelículas, capaz de degradar el metano. Los microorganismos responsables de la eliminación de metano que pudiesen crecer en el interior de los soportes Levapor®, además de en suspensión, debido a las bajas concentraciones de nitrito y nitrato estarían ávidos de aceptores de electrones, puesto que se cree que no existe la cantidad suficiente como para que difunda hasta el interior de los mismos.

El metano disuelto en el efluente del UASB puede ser eliminado de forma conjunta con el nitrógeno mediante procesos de oxidación anaerobia unida a desnitrificación y procesos de

oxidación aerobia. En estos últimos, los productos de oxidación del metano generados por las bacterias metanótrofas son utilizados por las desnitrificantes heterótrofas convencionales para llevar a cabo la desnitrificación. Desde el punto de vista microbiológico, los procesos de oxidación de metano unido a desnitrificación pueden ser de dos tipos: AMO y AnMO.

Conocidas las velocidades volumétricas de consumo de las especies nitrogenadas y metano en la cámara anóxica, se presentan en la **Tabla 4.1** las relaciones molares que de forma experimental se obtienen entre las especies de interés. En la **Tabla 4.2**, se muestran las relaciones molares teóricas según las estequiometrías de los procesos AMO y AnMO (**ecuaciones 1.11 a 1.14**) con el objetivo de encontrar el mecanismo de eliminación de metano que tiene lugar en el sistema.

**Tabla 4.1.** Relaciones molares experimentales.

$\text{NO}_3^-/\text{CH}_4$	$\text{NO}_2^-/\text{CH}_4$
-0,03	1,41

**Tabla 4.2.** Relaciones molares teóricas para procesos de desnitrificación con metano.

Relaciones molares	AMO	AnMO
$\text{NO}_2^-/\text{CH}_4$	1,33	2,66
$\text{NO}_3^-/\text{CH}_4$	0,80	1,60

Comparando las relaciones molares experimentales  $\text{NO}_2^-/\text{CH}_4$  y  $\text{NO}_3^-/\text{CH}_4$  con las teóricas (**Tablas 4.1 y 4.2**), se observa que la mayor aproximación corresponde a la relación  $\text{NO}_2^-/\text{CH}_4$  perteneciente al proceso de oxidación aerobia de metano utilizando nitrito como aceptor final de electrones.

Este hecho contribuye, junto con las bajas concentraciones de nitrato y nitrito, a la hipótesis de que el mecanismo de eliminación de metano en el sistema tendría lugar mediante oxidación aerobia vía nitrito. Los productos de oxidación aerobia del metano sería utilizados en la cámara anóxica por las desnitrificantes convencionales para para reducir el nitrito a nitrógeno gas.

Por último comentar que en la cámara aerobia existe metano en bajas concentraciones, siendo el valor promedio de  $0,31 \pm 0,13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . El descenso de la cantidad de metano en esta cámara puede ser debida fundamentalmente al stripping que tiene lugar en el interior de la cámara debido a la agitación neumática sumado al que se produce durante la toma de muestra. Además, puede producirse oxidación del metano en el ambiente aerobio pero en menor medida. Con este valor de concentración, la cantidad de metano emitida a la atmósfera por desorción alcanzaría un valor de  $173,2 \pm 77,0 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ .

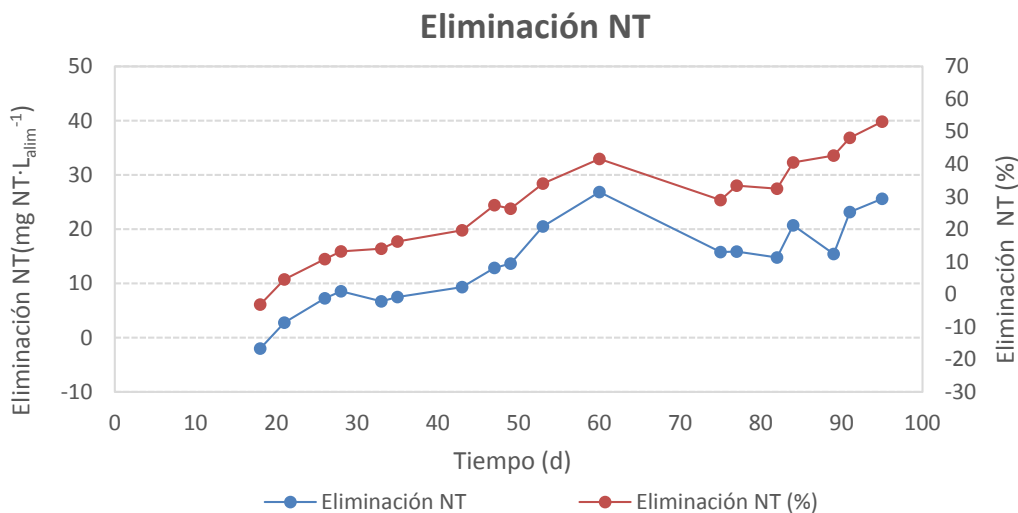
#### 4.4. Eliminación de nitrógeno

La eliminación de nitrógeno tiene lugar en la cámara anóxica por procesos de desnitrificación. La mayor parte del nitrógeno en el efluente del UASB se encuentra en forma de amonio ( $49,8 \pm 6,55 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ ) debido a la hidrólisis de las proteínas que tiene lugar en el interior del reactor anaerobio metanogénico. En este reactor no tiene lugar eliminación de nitrógeno, tan sólo una pequeña fracción es consumida por la biomasa anaerobia granular para el crecimiento celular. La concentración promedio de NT en el efluente del sistema global es de  $33,4 \pm 6,47 \text{ mg NT} \cdot \text{L}^{-1}$ . Los valores promedio de eliminación de NT, expresados como masa de NT por litro de alimentación y porcentaje, son de  $15,8 \pm 6,22 \text{ mgNT} \cdot \text{L}_{\text{alim}}^{-1}$  y  $31,4 \pm 11,9\%$ .

Según los valores de concentración de NT en el efluente y porcentaje de eliminación de NT del sistema, éste no cumpliría con los valores límite de vertido a zonas sensibles establecidos por la Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas, al ser el valor de concentración superior a  $15 \text{ mg NT} \cdot \text{L}^{-1}$  y el porcentaje de eliminación menor del 70%.

Los procesos de eliminación de nitrógeno en el sistema de biorreactor anaerobio metanogénico y biorreactor de biomasa en suspensión y en biopelícula tienen lugar en la cámara anóxica debido a procesos de desnitrificación.

En la **Figura 4.8** se muestra la evolución de la eliminación de NT durante la etapa experimental.



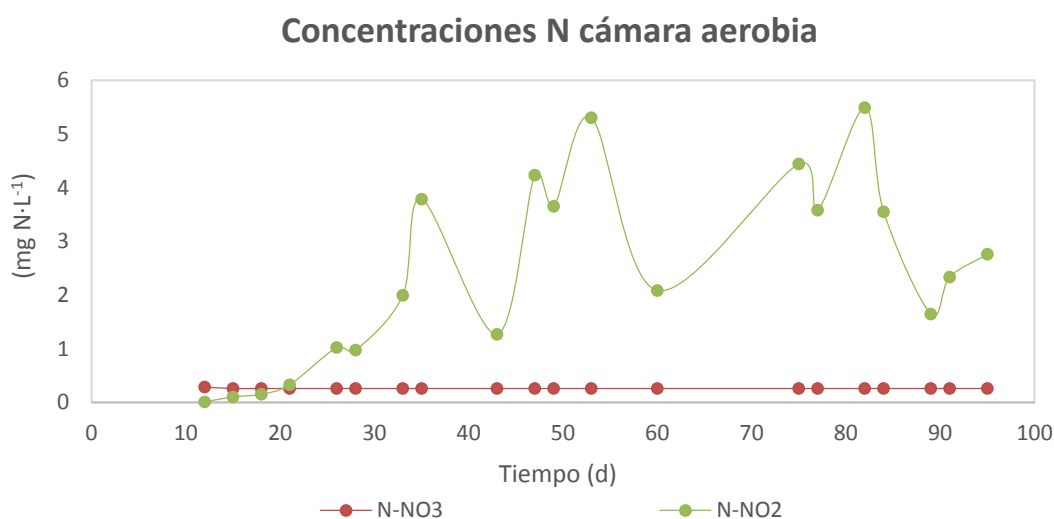
**Figura 4.8.** Eliminación de NT en el sistema.

En la **Figura 4.8** se observa la tendencia creciente de la eliminación de NT en el sistema desde el día 18 de operación. Existe una caída de los valores entre los días 60 y 75 de operación

correspondientes al período vacacional, pero a partir de este día se comienza a recuperar la capacidad del sistema, existiendo una tendencia creciente de eliminación de NT.

Las eliminaciones de NT del sistema están íntimamente ligadas con la cantidad de aceptores de electrones, nitrito y nitrato, disponibles en la cámara anóxica para el proceso de desnitrificación. El proceso de eliminación de NT fue en ascenso a lo largo del período de estudio como se observa en la **Figura 4.8**. Inicialmente, la eliminación del nitrógeno en el sistema estaba limitada por el déficit de aceptores de electrones. A medida que las concentraciones de nitrito y nitrato aumentan debido a las mejores tasas de nitrificación, las desnitrificantes convencionales presentes en la cámara anóxica disponen de aceptores de electrones para llevar a cabo la reacción de desnitrificación y por tanto, eliminar una mayor cantidad de NT.

La **Figura 4.9** muestra la evolución de la concentración de nitrito y nitrato en la cámara aerobia durante la etapa experimental, reflejando el proceso de nitrificación que en ella tiene lugar.



**Figura 4.9.** Concentración de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la cámara aerobia.

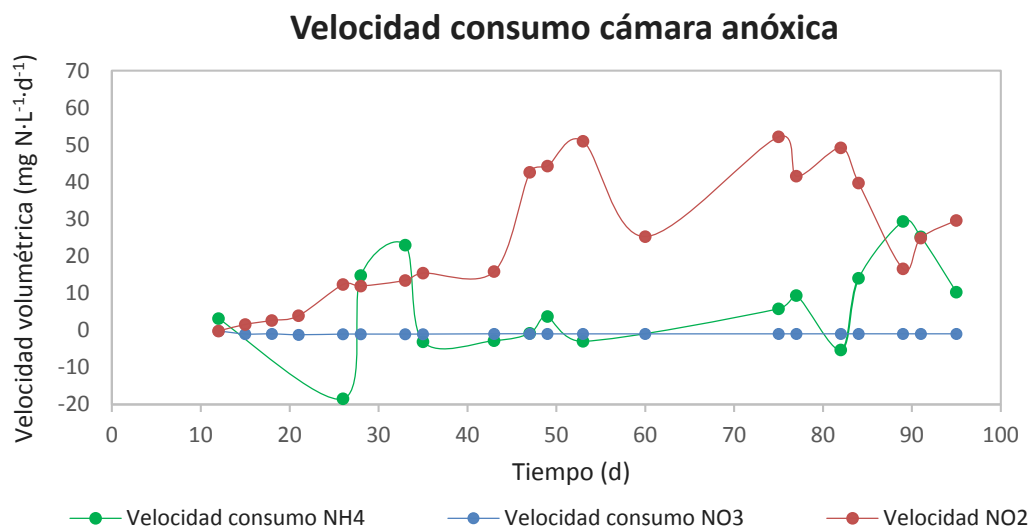
En la **Figura 4.9** se puede observar como tiene lugar el arranque del proceso de nitrificación en la cámara aerobia. Inicialmente, se puede apreciar como los microorganismos responsables de la oxidación del amonio poco a poco van incrementando su actividad. No ocurre lo mismo con los microorganismos responsables de la oxidación de nitrito ya que apenas se detecta nitrato en la cámara aerobia del sistema.

La etapa limitante en sistemas de nitrificación desde el punto de vista cinético, es la oxidación de amonio o nitrito. La concentración de OD en la cámara aerobia se encuentra en el rango 1,27-4,85 mg O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>, no resultando este parámetro limitante para el proceso de

nitrificación total. Los microorganismos BNO han podido sufrir estrés intercalaron etapas de Debido al problema existente con la recirculación puede provocar el estrés de las BNO que pierden su capacidad de oxidación del, de modo que la nitratación no tiene lugar.

La velocidad de consumo de amonio en la cámara aerobia es de  $143,5 \pm 79,82 \text{ mg NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Por tanto, prácticamente casi todo el nitrógeno que se podría emplear en la cámara anóxica, como aceptor final de electrones, procedente de la cámara aerobia, se encuentra en forma de nitrito.

En la **Figura 4.10** se pueden observar las velocidades volumétricas de consumo de las especies de nitrógeno presentes en la cámara anóxica:



**Figura 4.10.** Velocidades volumétricas de eliminación de especies de amonio, nitrito y nitrato en la cámara anóxica.

Los valores promedio de las tasas de eliminación volumétricas de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  y NT son de  $0,77 \pm 28,71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;  $32,96 \pm 13,85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;  $-0,98 \pm 0,80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  y  $32,7 \pm 31,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivamente. Prácticamente, la totalidad del nitrógeno eliminado en el sistema mediante desnitrificación se lleva a cabo utilizando el nitrito como aceptor final de electrones.

Conocidos los valores promedio de concentración de  $\text{CH}_4$  y ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) en el efluente del reactor UASB y en la cámara anóxica y admitiendo que la concentración de ácido acético es cero en la cámara aerobia (al tratarse de un compuesto muy fácilmente biodegradable), si se plantean los balances de materia en la cámara anóxica se pueden calcular las cantidades de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CH}_3\text{COOH}$  eliminadas, cuyos valores son de  $1,19 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$  y  $0,09 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivamente.

Teniendo en cuenta las estequiometrías para las reacciones de desnitrificación heterótrofa convencional usando ácido acético (**Ec. 1.6 a 1.8**), y del proceso AMO, siendo el nitrito el aceptor de electrones (**Ec 1.11**), si todo el acético y el metano estuviesen disponibles para ser utilizados en los procesos de desnitrificación, se podrían llegar a consumir 0,18 y 4,55  $\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$  de nitrito, respectivamente, siendo el consumo total por ambos procesos de 4,73  $\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ .

Los datos experimentales indican que en la cámara anóxica se produce una eliminación promedio de 1,80  $\text{g NT}\cdot\text{d}^{-1}$ . Empleando los cálculos mencionados anteriormente, a partir del acético y metano presentes en la cámara anóxica del sistema se podría llegar a eliminar hasta 4,73  $\text{gN-NO}_2\cdot\text{d}^{-1}$ . Esto podría indicar que existe una limitación de sustrato en forma de aceptores de electrones, debido a que existe suficiente acético y metano para poder alcanzar mayores eliminaciones de nitrógeno.

#### 4.5. Estudios de sedimentabilidad de lodos

Los ensayos de sedimentación de LM son una de las herramientas más útiles para determinar lo que está sucediendo en el interior de un sistema de lodos activos. En el presente trabajo se realizaron ensayos de VSL e IVL a partir del día 49 de operación, para determinar las características de sedimentabilidad de la biomasa existente en el biorreactor híbrido. Los ensayos de sedimentación se realizaron sobre muestra de LM de la cámara aerobia.

Los valores del IVL y VSL obtenidos se muestran en la **Tabla 4.3**:

**Tabla 4.3.** Valores de IVL y VSL del sistema.

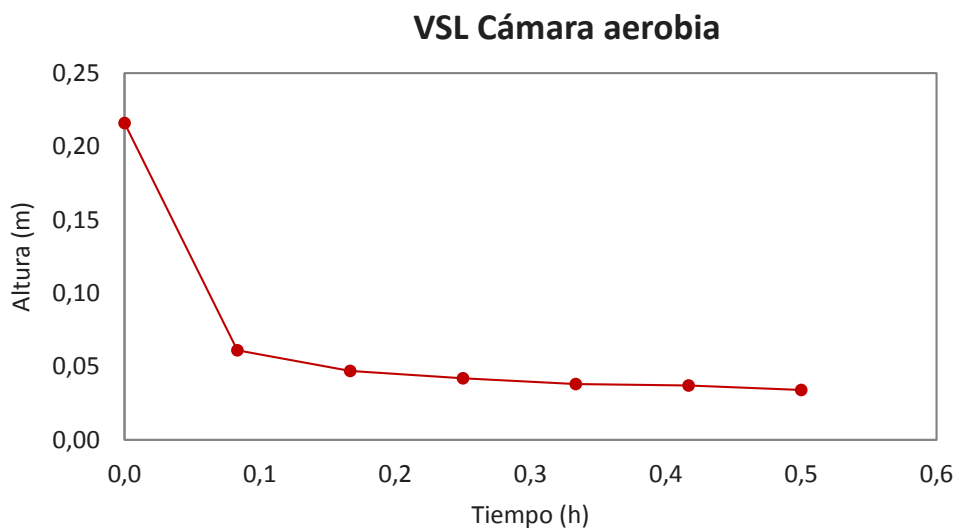
Día operación	49	53	75	77	82	84	89	91	95
IVL ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )	215,7	292,1	142,7	96,3	116,8	98,9	136,2	166,7	191,4
VSL ( $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$ )	0,35	0,19	1,25	1,86	2,04	3,17	-	1,46	0,83

Como se observa en la **Tabla 4.3**, los valores de IVL y VSL sufrieron oscilaciones durante el período de estudio. Los valores de IVL y VSL típicos de un sistema de lodos activos con buenas características de sedimentación son:  $\text{IVL} < 150 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  y  $\text{VSL} > 1 \text{ m}\cdot\text{h}^{-1}$  (*Metcalf&Eddy*). Entonces, comparando los valores bibliográficos y los recogidos en la **Tabla 4.3** se pueden diferenciar dos situaciones: 1) Lodos con malas características de sedimentación (días 49, 53, 91, 95 de operación), 2) Lodos con buenas características de sedimentación (restantes días).

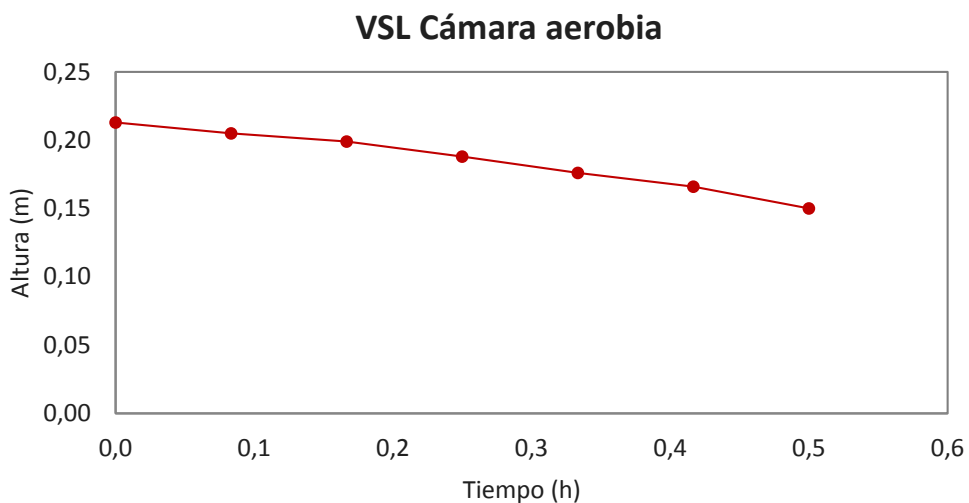
Se podría considerar que los valores de IVL y VSL de la primera etapa fuesen debidos a cambios operacionales que se realizaron en el arranque del sistema y que podrían afectar a la sedimentación de los lodos, así como al problema existente con la recirculación desde el decantador que provoca el estrés de la biomasa. A continuación, en la segunda etapa, la biomasa comienza a decantar bien obteniéndose valores de IVL y VSL propios de un sistema de lodos

activos con buen funcionamiento. Durante esta etapa se podría pensar que la biomasa, debido a una agitación insuficiente del LM, decantaba en las propias cámaras sufriendo condiciones de estrés, de tal modo que una vez que ésta fue resuspendida en el sistema (tercera etapa), provocaría el empeoramiento de los valores de VSL e IVL.

Las **Figuras 4.11** y **4.12** muestran la variación de la altura de la interfase frente al tiempo para el ensayo de VSL para dos lodos de diferentes características de sedimentación, correspondientes a los días 53 y 82 de operación, respectivamente.

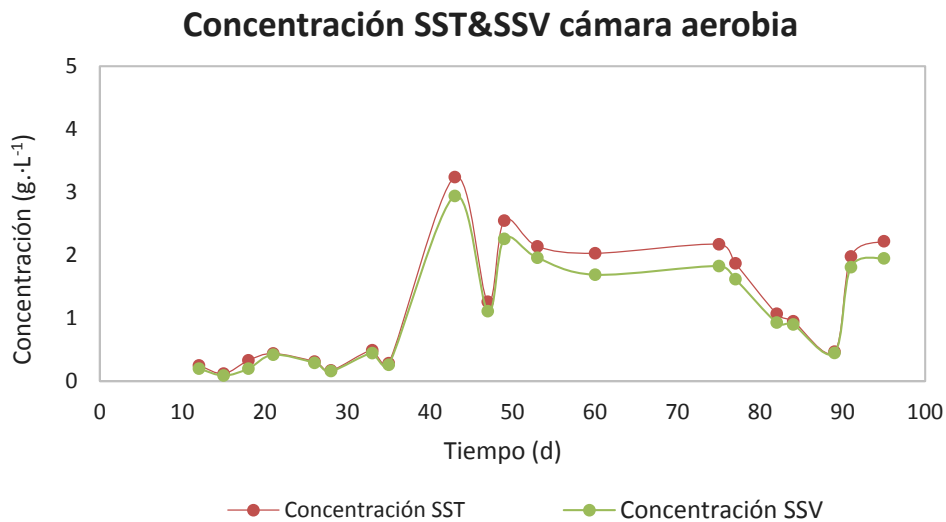


**Figura 4.11.** Gráfica de la VSL de un lodo con buenas características de sedimentación.



**Figura 4.12.** Gráfica de la VSL de un lodo con malas características de sedimentación.

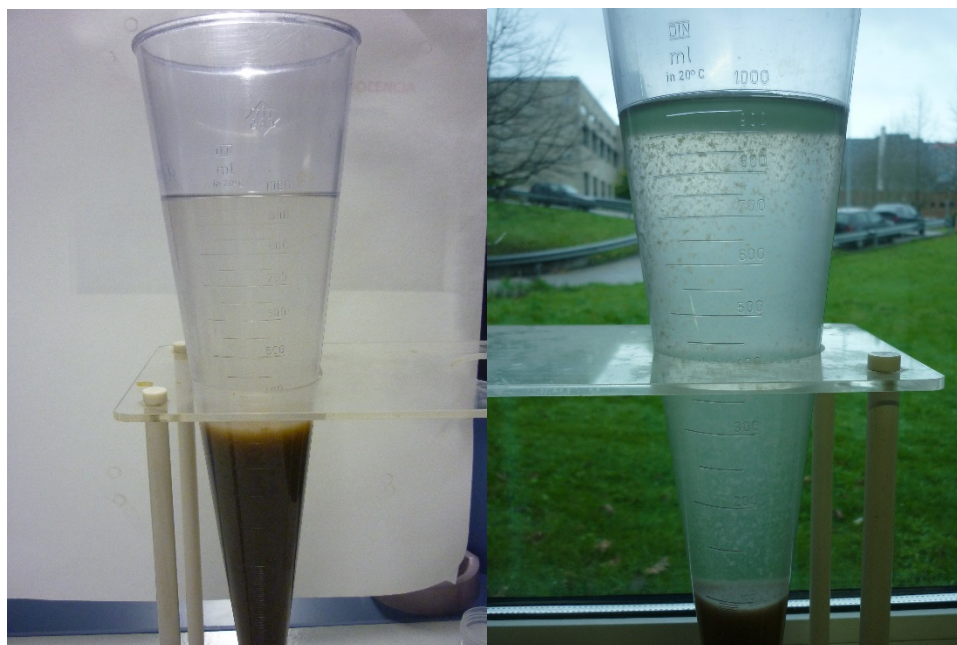
En la **Figura 4.13** se muestra la evolución de las concentraciones de SSTLM y SSVLM en la cámara aerobia del sistema.



**Figura 4.13.** Concentración de SSTLM y SSVLM en la cámara aerobia.

Hasta el día 35 de operación, las concentración de SSTLM y SSVLM se mantuvo en valores promedio de  $0,30 \pm 0,12$  mg SSTLM·L<sup>-1</sup> y  $0,26 \pm 0,12$  mg SSVLM·L<sup>-1</sup>, respectivamente. El incremento de la concentración en el día 43 de operación se produjo tras un desborde en el sistema. A partir del día 75, se observa un descenso de la cantidad de sólidos en suspensión que coincide temporalmente con los mejores valores de los parámetros característicos de la sedimentación de lodos. Al aumentar el IVL y la VSL, la biomasa comienza a decantar en el interior de las cámaras al no ser la agitación suficiente para mantenerla en suspensión. Esta biomasa decantada se encuentra en condiciones de estrés, de tal modo, que una vez que se resuspende (día 89 de operación), tendería a decantar mal. De ahí que a pesar del aumento de la concentración de SSTLM y SSVLM en la última etapa de la operación del sistema, al tratarse de un lodo viejo y estresado, los valores de IVL y VSL empeoren.

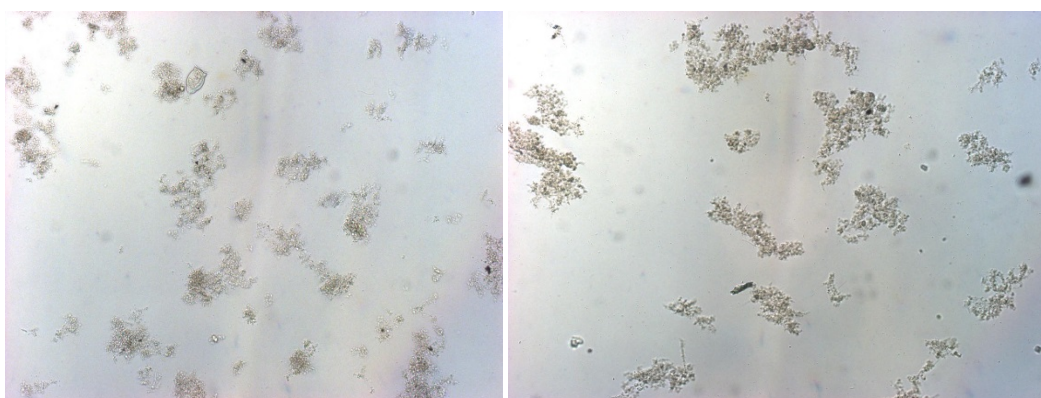
Cabe destacar que a medida que los valores de VSL e IVL empeoraban se detectó un aumento de la turbidez así como aparición de flóculos en el sobrenadante al realizar el ensayo de IVL respecto a situaciones de buena sedimentación (**Figura 4.14**).



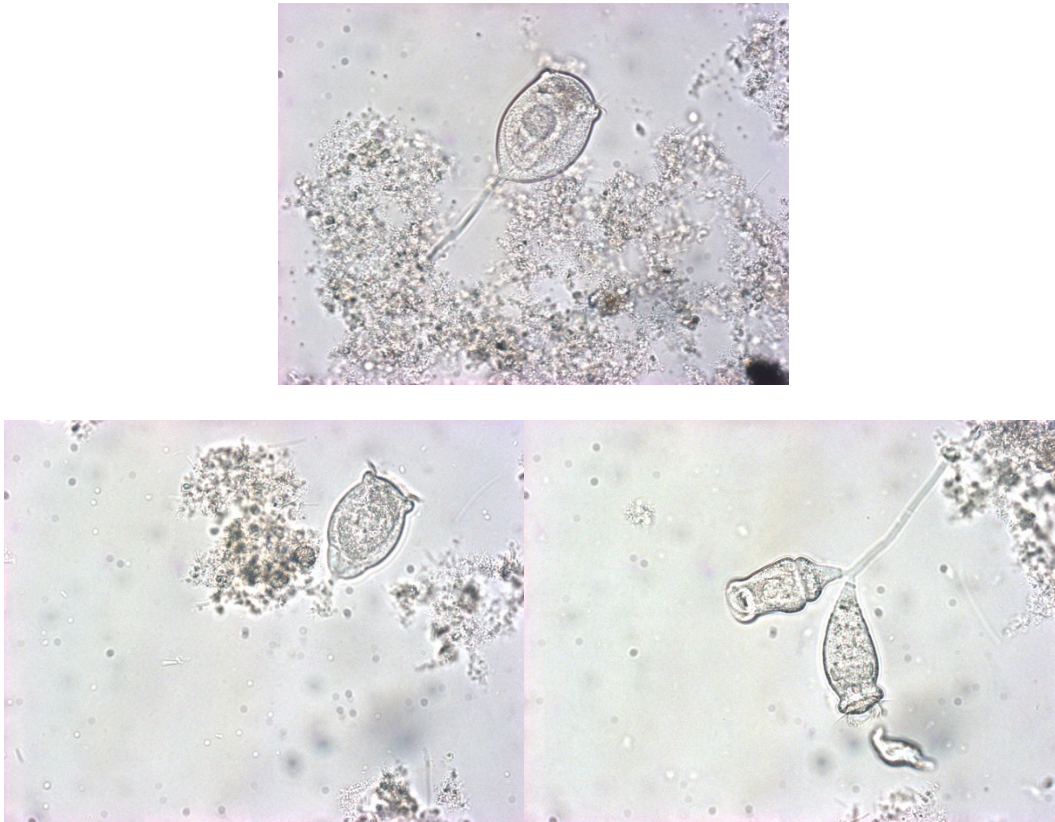
**Figura 4.14.** Comparativa de calidad del sobrenadante en ensayo de IVL.

Para descartar que los valores no deseados de VSL e IVL sean debidos a presencia microorganismos no deseados en el LM, se utilizó la microscopia óptica para observar las características de la biomasa de la cámara aerobia. Observaciones rutinarias al microscopio aportan información sobre la población microbiana presente en el sistema de lodos activos, el tamaño y densidad de los flóculos, el crecimiento de organismos filamentosos, la presencia de bacteria *Nocardioform* así como la abundancia y tipo de protozoos y rotíferos. La abundancia relativa de los microorganismos presentes en el sistema de lodos activos está determinada por las relación alimentación-microorganismos (relación F/M) y el TRC.

En las **Figuras 4.15 y 4.16** se muestran fotografías de la biomasa realizadas mediante microscopía óptica a 10X y 40X, respectivamente.



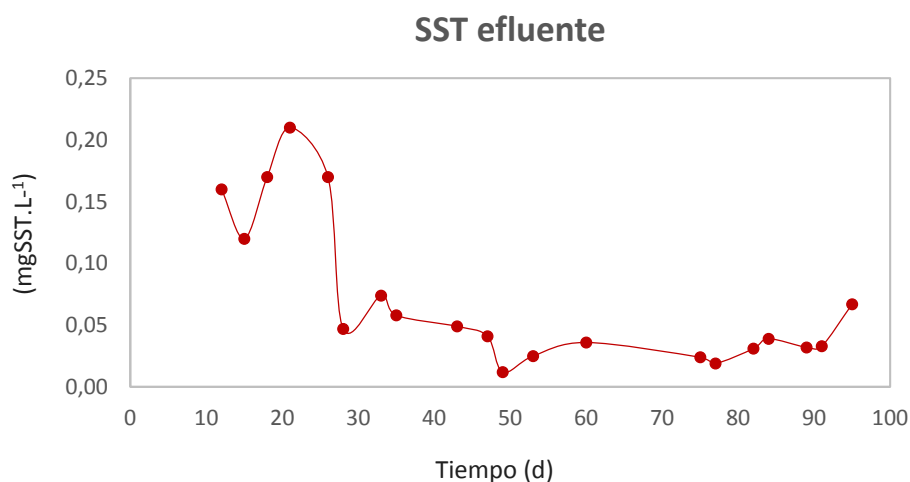
**Figura 4.15.** Imágenes de biomasa de cámara aerobia a 10X.



**Figura 4.16.** Imágenes de la biomasa de la cámara aerobia mediante microscopía óptica 40X.

Las imágenes de la **Figura 4.15** evidencian la ausencia de bacterias filamentosas en el LM. En ellas se puede apreciar igualmente como la biomasa forma flóculos de pequeño tamaño. En la **Figura 4.16** se pueden ver imágenes a 40X de protozoos ciliados típicos de sistemas de lodos activos con bajas cargas de lodos como *Vorticella* (imagen superior e inferior izquierda) o *Epistylis* (imagen inferior derecha).

La concentración de SST en el efluente del sistema tiene un valor promedio de  $0,07 \pm 0,06$   $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Este valor no cumple con el límite de vertido establecido por la Directiva 91/271/ CEE sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas, el cual marca el valor máximo de SST de 0,035  $\text{mg/L}$  para efluentes de tratamientos secundarios para zonas sensibles y no sensibles.



**Figura 4.17.** Evolución de la concentración de SST en el efluente del sistema.

En la **Figura 4.17** se observa la variación de los SST en el efluente del sistema que fue debida fundamentalmente a 2 motivos:

1) Volumen de muestra filtrada para determinación de SST. Hasta el día 26 de operación se procesaba un volumen de muestra igual a 10 mL. Este volumen de muestra es muy pequeño según el método analítico para la concentración de sólidos esperada en el efluente de tal modo que se estaba incurriendo en un error. Por este motivo, del día 28 en adelante se realizó la determinación de sólidos en suspensión filtrando un volumen de muestra de 100 mL, mejorando el valor de SST obtenido.

2) Cambio del punto de toma de muestra del efluente. Los primeros días de operación, del 12 al 47, la toma de muestra se realizó en la superficie del decantador utilizando una jeringa. A partir del día 49 de operación se comenzó a realizar la toma de muestra en la conducción de salida del efluente del sistema. El cambio del punto de toma de muestra se vió reflejado en las analíticas de sólidos en un descenso de los SST presentes, pues al realizar la toma de muestra con la jeringa se aspiraban sólidos del decantador, no presentes en el efluente real del sistema debido a la acción del rebosadero.

Teniendo en cuenta el error que se estaba produciendo, el valor promedio real de SST sería el calculado a partir del día 49 de operación,  $0,032 \pm 0,014$  mg SST · L<sup>-1</sup>. Este efluente sí cumple con los valores límite de SST de vertido establecidos en la Directiva tanto para 91/271/ CEE, para medios receptores sensibles o no sensibles.

## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

Se ha operado un sistema compuesto por un reactor anaerobio metanogénico de tipo UASB con un post-tratamiento formado por un sistema híbrido de biomasa en suspensión y en biopelículas durante 99 días, tratando una alimentación de características similares a un agua residual urbana de baja carga. La operación tuvo lugar a temperatura ambiente (19,2-21,9 °C).

Las principales conclusiones de este trabajo son:

- El sistema global elimina DQO en un porcentaje promedio de 95,3±2,60%. La eliminación de DQO tiene lugar principalmente en el reactor UASB (92,7±2,03%). En el sistema de post-tratamiento del efluente del UASB, tiene lugar la eliminación del 36,6±30,5% de la DQO de entrada. La concentración de DQOT en el efluente del sistema es de 39±16 mg·L<sup>-1</sup>, de modo que de acuerdo con los valores límite (125 mg DQO·L<sup>-1</sup>) establecidos en la Directiva 91/271/CEE, para aguas residuales urbanas, es posible su vertido tanto a zonas sensibles como no sensibles.
- La producción media de biogás del reactor UASB es de 37,7 L·d<sup>-1</sup>. El biogás es de alta calidad y pureza siendo su composición promedio de metano, dióxido de carbono y nitrógeno de 74,7±1,89%, 16,0±1,74% y 9,2±2,3%. Del total de metano generado en el reactor metanogénico, un 17±8%, abandona el sistema disuelto en el efluente del UASB.
- El sistema de biorreactor híbrido de biomasa en suspensión y biopelículas es capaz de eliminar un promedio del 43,0±16,0% del metano de entrada. Las velocidades volumétricas y específicas de eliminación de metano durante la etapa experimental alcanzaron valores promedio de 33,0±9,69 mg CH<sub>4</sub>·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> y 27,35±24,72 mg CH<sub>4</sub>·g SSVLM<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectivamente
- La eliminación de metano en el sistema de acuerdo con las tasas de eliminación de las especies nitrogenadas y las relaciones estequiométricas teóricas y experimentales, podría deberse fundamentalmente a procesos de oxidación aerobia de metano (AMO) usando el nitrito como aceptor final de electrones. Estudios complementarios en los que se procesó muestra de biomasa en suspensión y en biopelículas (día 5 de febrero), mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH, del inglés *Fluorescence in situ hybridization*), confirman la presencia de bacterias metanótrofas aerobias de tipo I, resultando este mismo ensayo negativo para metanótrofas aerobias tipo II, DAMO arquea y bacterias NC 10. Pese a que el ensayo FISH sea negativo para estos últimos grupos de

microorganismos, no se puede concluir que no existan, ya que pueden estar presentes pero que no fuesen detectadas o que no presenten actividad.

- Se consiguen unas eliminaciones promedio de NT de  $15,8 \pm 6,22 \text{ mgNT} \cdot \text{L}_{\text{alim}}^{-1}$  y  $31,4 \pm 11,9\%$ . Los valores promedio de las velocidades de consumo de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  y NT son de  $0,77 \pm 28,71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;  $32,96 \pm 13,85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ;  $-0,98 \pm 0,80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  y  $32,7 \pm 31,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectivamente. Prácticamente, la totalidad del nitrógeno eliminado en el sistema mediante desnitrificación se lleva a cabo utilizando el nitrito como aceptor final de electrones.

- En la cámara aerobia del sistema de post-tratamiento del sistema UASB mayoritariamente se ha detectado actividad por parte de los microorganismos BAO. Apenas se han detectado pequeñas actividades por parte de los microorganismos de tipo BNO, ya que prácticamente no existe presencia de nitrato en la cámara aerobia en la cual tiene lugar su formación.

- La eliminación de nitrógeno según los datos experimentales obtenidos podría tener lugar mediante 2 mecanismos: 1) desnitrificación convencional utilizando como dador de electrones la DQO residual del efluente del UASB; 2) desnitrificación mediante proceso AMO empleando nitrito como aceptor final de electrones. El estudio de la muestra de biomasa del día 5 de febrero mediante la técnica FISH da resultado positivo en bacterias nitrificantes BAO y BNO, siendo mayor la presencia de las primeras. Asimismo, este ensayo resulta negativo para bacterias Anammox aunque no se puede afirmar con rotundidad que no estén presentes en el sistema.

- La biomasa existente en el sistema de reactor híbrido tiene buenas características de sedimentación ( $\text{IVL} < 150 \text{ mL g}^{-1}$  y  $\text{VSL} > 1 \text{ m h}^{-1}$ ), comparables a las de un sistema de lodos activos convencional. Durante el experimento, el estrés microbiano debido a la problemática del decantador parece ser la causa de que se hayan alternado etapas de buena y mala decantabilidad.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Broda, E. (1977) Two kinds of lithotrophos missing in nature. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* **17**: 491-493.
- Cakir, F.Y., Stenstrom, M.K. (2005) Greenhouse gas production: A comparison between aerobic and anaerobic wastewater treatment technology. *Water Research* **39**: 4197-4203.
- Chernicharo, C.A.L. (2006) Post-treatment options for the anaerobic treatment of domestic wastewater. *Review Environmental Science&Biotechnology* **5**: 73–92
- Chernicharo C.A.L., Van Lier, J.B., Noyola, A., Bressani Ribeiro, T. (2015) Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. *Review Environmental Science&Biotechnology* **14**: 649-679.
- Christensson, M., Welander, T. (2004) Treatment of municipal wastewater in a hybrid process using a new suspended carrier with large surface area. *Water Science and Technology* **49**: 207-214.
- Cookney, J. Cartmell, E., Jefferson, B., McAdam, E.J. (2012) Recovery of methane from a anaerobic process effluent using poly-di-methyl-siloxane membrane contactors. *Water Science&Technology* **65**: 604-610.
- Cookney, J., Mcleod, A., Mathioudakis, V., Ncube, P., Soares, A., Jefferson B., McAdam, E.J. (2016) Dissolved methane recovery from anaerobic effluents using hollow fiber membrane contactors. *Journal of Membrane Science* **502**: 141-150.
- Daims, H., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Juretschko, S. and Wagner, M. (2000) Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology. *Water Science and Technology* **41**: 85-90.
- Dapena-Mora, A., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Jetten, M.S.M. and Mendez, R. (2004) Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. *Journal of Biotechnology* **110**: 159-170.
- Dapena-Mora, A., Fernández, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Mendez, R. and Jetten, M.S.M. (2007) Evaluation of activity and inhibition effects of Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 859-865.
- Davies, T.R., 1973. Isolation of bacteria capable of utilizing methane as a hydrogen donor in the process of denitrification. *Water Research* **7**: 575–579.
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist H., Van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J.B. (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology* **175**: 198-207.
- Ettwig K.F., Shima S., Van de Pas-Schoonen, K.T., Kahnt, J., Medema, M.H., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Strous, M. (2008) Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environmental Microbiology* **10**: 3164–3173.

- Ettwig, K.F., Van Alen, T., Van de Pas-Schoonen, K.T., Jetten, M.S., Strous, M. (2009) Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Applied Environmental Microbiology* **75**: 3656–3662.
- Gadelha, D.A.C., Moura, R.B., Damianovic, M.H.R.Z., Foresti, E. (2013) Nitrogen removal using a structured bed intermittently aerated reactor treating UASB domestic effluent. In: 674 *Review Environmental Science Biotechnology* (2015) **14**: 649–679. 123 13th world congress on anaerobic digestion: recovering (bio) resources for the World. Proceedings. Spain
- Garrido, J.M., Buntner, D., Sánchez, A., Lema, J.M.M. Sistema integrado de reactor metanogénico y biorreactor de membranas para la eliminación de materia orgánica y nitrógeno en aguas residuales. ES Patente 2 401445 A1, abril, 14, 2013.
- Haroon, M.F., Hu, S., Shi, Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P., Yuan, Z., Tyson, G.W. (2013) Aerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage *Nature* **500**: 567-570.
- He, Z., Cai, C., Geng, S., Lou, L., Xu, X., Zheng, P., Hu, B. (2013) Modeling a nitrite-dependent anaerobic methane oxidation process: parameters identification and model evaluation. *Bioresource Technology* **147**: 315–320
- Helmer-Madhok, C., Schmid, M., Filipov, E., Gaulm, T., Hippen, A., Rosenwinkel, K.H., Seyfried, C.F., Wagner, M., and Kunst, S. (2002) Deammonification in biofilm systems populations structure and function. *Water Science and Technology*. **46**: 226-231.
- Henze, M., Harremoës, P., La Cour Jansen, J. y Arvin, E. *Wastewater treatment. Biological and Chemical Processes*. 3ª edición, Springer, 2000.
- Hu, B., He, Z., Geng, S., Cai, C., Lou, L., Zheng, P., Xu, X. (2014) Cultivation of nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacteria: impact of reactor configuration. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 7983-7991.
- Hulshoff Pol, L.W., Euler, H., Schroth, S., Wittur, T., Grohgan, D. (1998) Proc. of 5th Latin American Seminar on Anaerobic Wastewater Treatment, Oct. 27-30, 1998, Vina del Mar, Chili.
- IPCC 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Jetten, M.S.M., Strous, M., Van de Pas- Schoonen, K.T., Schalk, J., Van Dongen, L., Van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., Van Loosdrecht, M.C.M. and Kuenen, J.G. (1999) The anaerobic oxidation of ammonia. *FEMS Microbiology. Reviews* **22**: 421-437.
- Kampman, C., Hendrickx, T.L., Luesken, F.A., Van Alen, T.A., Op den Camp, H.J., Jetten, M.S., Zeeman, G., Buisman, C.J., Temmink, H. (2012) Enrichment of denitrifying methanotrophic bacteria for application after direct low temperature anaerobic sewage treatment. *Journal of Hazardous Materials* (227–228), 164–171.

- Kits, K.D., Klotz, M.G., Stein, L.Y. (2015) Methane oxidation coupled to nitrate reduction under hypoxia by the gammaproteobacterium *Methylomonas denitrificans*, sp. nov. type strain FJG1. *Environmental Microbiology* **17**: 3219-3232.
- Lettinga, G., Hobma, S.W., Hulshoff Pol, L.W., De Zeeuw, W., De Jong, P., Grin, P., Roersma, R. (1983) Design operation and economy of anaerobic treatment. *Water Science & Technology* **15**: 177–195.
- Metcalf & Eddy. (1995) Ingeniería de aguas residuales: Tratamiento, vertido y reutilización. 2ª Edición. McGraw-Hill.
- Metcalf & Eddy. (2004) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4ª Edition. McGraw-Hill.
- Modin, O., Fukushi, K., Yamamoto, K. (2007) Denitrification with methane as external carbon source. *Water Research* **41**: 2726–2738.
- Morgan-Sagastume, J., Jiménez, B., Noyola, A. (1994) Anaerobic–anoxic–aerobic process with recycling and separated biomass for organic carbon and nitrogen removal from wastewater. *Environmental Technology* **15**: 233–243.
- Mulder, A. (2003) The quest for sustainable nitrogen removal technologies. *Water Science and Technology* **48**: 67-75.
- Mulder, A., Vandergraaf, A.A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized-Bed Reactor. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 177-183.
- Noyola, A., Capdeville, B., Roques, H. (1988) Anaerobic treatment of domestic sewage with a rotating-stationary fixed-film reactor. *Water Research* **22**: 1585–1592.
- Noyola, A., Padilla-Rivera, A., Morgan-Sagastume, J.M., Güereca, L.P., Hernández-Padilla, F. (2012) Typology of municipal wastewater treatment technologies in Latin America. *Clean Soil Air Water* **40**: 926–932.
- Okada, D.Y., Foresti, E. (2013) Remoção de matéria orgânica e de nitrogênio de esgoto sanitário em sistema composto por reator anaeróbico/anóxico interligado a reator nitrificante. In: Anais do III Seminário do Projeto Temático: Produção de bioenergia no tratamento de águas residuárias e adequação ambiental dos efluentes e resíduos gerados. São Carlos/SP, Brasil (in Portuguese)
- Pantoja-Filho, J.L.R., Moura, R.B., Peixoto, G., Mockaitis, G., Simoes, D.R.S., Barana, A.C., Foresti, E. (2013) A comparative study of autotrophic and heterotrophic denitrification using reduced sulphur and acetate as electron donors. In: 13th world congress on anaerobic digestion: recovering (bio) resources for the world. Proceedings. Spain
- Park, S., Lee, C.H., Ryu, C.R., Sung, K. (2009) Biofiltration for reducing methane emissions from modern sanitary landfills at the low methane generation stage. *Water, Air, & Soil Pollution* **196**: 19–27.

- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., Van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, I.C., Schouten, S., Sinninghe Damste, J.S., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M. (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**: 918–921.
- Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M. Kansal, A., Lata, K., Kihore, V.V.N. (2000) State of the art of anaerobic digestion technology for industrial waste water treatment. *Renewable & Sustainable energy reviews* **4**: 135-156.
- Rhee, G.Y., Fuhs, G.W. (1978) Wastewater denitrification with one carbon compounds as energy source. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **50**: 2111–2119.
- Sánchez Guillén, J.A., Cuéllar Guardado, P.R., López Vázquez, C.M., de Oliveira, L.M., Brdjanovic, D., Van Lier, J.B. (2015) Lowcost Anammox cultivation in a closed sponge-bed trickling filter. *Bioresource Technology* (submitted).
- Scheutz, C., Kjeldsen, P., Bogener, J.E., De Visscher, A., Gebert, J., Hilger, H.A., Huber-Huber-Humer, M., Spokas, K. (2009) Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas emissions. *Waste Management and Research* **27**: 409-455.
- Silva-Teira, A., Sánchez, A., Buntner, D., Rodríguez-Hernández, L., Omil, F., Garrido, J.M. (2015) Simultaneous nitrogen and dissolved methane removal from the effluent of a UASB system using a membrane bioreactor post treatment. In: 14th world congress on anaerobic digestion: recovering (bio) resources for the World. Proceedings. Chile
- Sollo, F.W., Mueller, H.F., Larson, T.E. (1976) Denitrification of wastewater effluents with methane. *Journal of Water Pollution Control Federation* **48**: 1840–1842.
- Souza, C.L., Chernicharo, C.A.L., Aquino, S.F. (2011) Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. *Water Science Technology* **64**:2259–2264
- Souza, T.S.O., Foresti, E. (2013) Sulfide-oxidizing autotrophic denitrification: an evaluation for nitrogen removal from anaerobically pretreated domestic sewage. *Applied Biochem Biotechnology* **170**:1094–1103.
- Speece, R. E. (1996). Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. In *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**:446-449.
- Strous, M., Kuenen, J.G., Wagner, M. and Jetten, M.S.M. (2002) The Anammox case- A new experimental manifesto for microbiological eco-physiology. *Antoine Van Leeuwenhoek* **81**: 693-702.
- Strous, M., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1999). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:3248-3250.

- Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J.G. and Jetten, M. (1997) Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2446-2448.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998) The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**: 589-596.
- Thalasso, F., Vallecillo, A., Garcia-Encina, P., Fdz-Polanco, F. (1997) The use of methane as a sole carbon source for wastewater denitrification. *Water Research* **31**: 55–60.
- Van Lier, J.B. (2008) High-rate anaerobic wastewater treatment: diversifying from end-of-the-pipe treatment to resource-oriented conversion techniques. *Water Science and Technology* **57**: 1137-1149.
- Van Lier, J.E., Tilche, A., Ahring, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Pol, L.W., Lens, P., Verstratete, W. (2001) New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science Technology* **43**: 1-18.
- Vázquez-Padín, J.R. (2009) Autotrophic nitrogen removal in granular sequencing batch reactors. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidade de Santiago de Compostela. España.
- Von Sperling, M., Chernicharo, C.A.L. (2005) Biological wastewater treatment in warm climate regions. *IWA Publishing*, London 1452.
- Waki, M., Tanaka, Y., Osada, T., Suzuki, K. (2002) Effects of nitrite and ammonium on methane-dependent denitrification. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**: 338–343.
- Werner, M., Kayser, R. (1991) Denitrification with biogas as external carbon source. *Water Science Technology* **23**: 701–708.
- Winogradsky, M.S. (1891) Recherches Sur Les Organismes de LA Nitrification. *Annals Institute Pasteur*, **5**: 92.