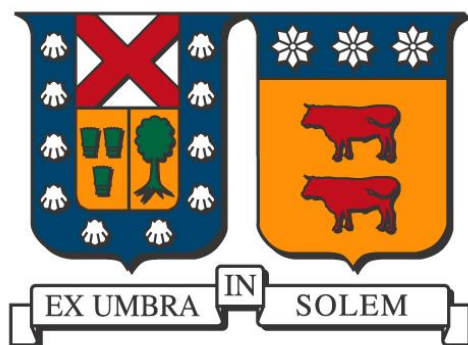


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

VALPARAÍSO – CHILE



“OPERACIÓN DE UN REACTOR ANAEROBIO DE LECHO FIJO CON FLUJO ASCENDENTE PARA REMOVER AZUFRE, NITRATO Y MATERIA ORGÁNICA A TRAVÉS DE LA DESNITRIFICACIÓN SIMULTÁNEA AUTÓTROFA-HETERÓTROFA”.

MARÍA PAZ AUSÍN HESS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE

INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

PROFESOR GUÍA: DRA. LORNA GUERRERO S.

PROFESOR CORREFERENTE: M. CS. ANDREA BARAHONA L.

JUNIO 2017

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a toda mi familia por su infinito cariño y preocupación, pero principalmente a mis padres quienes me dieron la oportunidad de tener esta educación, las alas para seguir el camino que yo elegí y su apoyo incondicional en cada uno de los momentos que lo necesité. Porque me enseñaron que con esfuerzo todo es posible y que las caídas son necesarias para seguir creciendo, este logro es tanto mío como de ustedes.

No puedo dejar de agradecer a mi pololo, quien siempre estuvo a mi lado apoyándome y dándome ánimo pese a la distancia, y a todas las personas que fueron poco a poco formando parte de estos años de universidad. Desde un comienzo mis amigos de plan común que aún siguen presentes aunque hayamos continuado caminos distintos, a las niñas y niños del voley y al equipo de promoción IQA con quienes compartí lindos momentos, desarrollé otras habilidades e hicieron de la universidad algo más que estudio, a los ambientalísimos por su simpatía y ganas de cambiar el mundo, a mis convivientes del 1603 y a todos ellos que durante estos siete años me hicieron sentir como en casa y disfrutamos juntos esta etapa.

También quiero agradecer a la universidad y a mis profesores por las herramientas y conocimiento entregado durante mi formación profesional, a mis profesoras guía y correferente por el apoyo, disposición y ayuda durante el desarrollo de esta investigación. A mis compañeros del laboratorio de Riles con quienes trabajé y compartí día a día durante este último proceso y a cada uno de los integrantes del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental que estuvieron presentes.

Me llevo muy lindos recuerdos con cada uno de ustedes y por fin puedo decir... ¡etapa cumplida!

Gracias a todos aquellos que creyeron en mí.

RESUMEN

El presente estudio surge a raíz del deterioro ambiental que ha traído consigo el desarrollo de la actividad humana, afectando de diversas formas al ecosistema y contribuyendo a un desequilibrio de los ciclos naturales. La descarga incontrolada de efluentes hacia los cursos de agua constituye una de las principales fuentes de contaminación, cuyos compuestos más frecuentes son los que contienen carbono orgánico, nitrógeno y azufre. Este estudio da continuación a otros realizados anteriormente que forman parte del proyecto Fondecyt N°1130108, “*Simultaneous bio-elimination of nitrogen and sulphur in the presence and absence of complex organic matter*”.

La desnitrificación simultánea autótrofa-heterótrofa permite la eliminación conjunta de materia orgánica, nitrógeno y azufre, por lo que resulta interesante estudiar la coexistencia de estos microorganismos. Las bacterias desnitrificantes heterótrofas oxidan la materia orgánica a CO₂, mientras que las autótrofas oxidan los compuestos reducidos de azufre, compitiendo ambas por la reducción de compuestos nitrogenados.

Esta memoria consiste en la operación continua de un reactor anaerobio de lecho fijo ascendente (UAF) de 0,8 litros, utilizando zeolitas chilenas como soportes microbianos, con el objetivo de analizar la remoción de nitrato, azufre y materia orgánica, a través de la desnitrificación autótrofa-heterótrofa simultánea a partir de nitrato.

La operación del reactor se llevó a cabo de forma continua durante 147 días, se mantuvo a una temperatura de $33 \pm 2^\circ\text{C}$ y se alimentó con agua residual sintética, con una relación C/N constante de 3,0 [g C/g N] y relaciones de S/N que variaron de 4,6 a 3,9 y finalmente a 3,4 [g S/g N], disminuyendo el porcentaje en exceso de azufre. La velocidad de carga nitrogenada (VCN) se aumentó gradualmente durante la operación del UAF solo mediante la variación del caudal, comenzando con una VCN de 0,1 [kg N-NO₃⁻/m³/d] hasta alcanzar una VCN de 2,0 [kg N-NO₃⁻/m³/d].

Durante la operación del UAF el pH se mantuvo dentro de los rangos adecuados para la desnitrificación simultánea de $8,0 \pm 0,3$ y se logró la remoción conjunta de los compuestos deseados con un máximo de remoción de nitrato de 99,69% a VCN 0,4 [kg N-NO₃⁻/m³/d], de acetato de 94,39% a VCN 0,6 [kg N-NO₃⁻/m³/d] y de tiosulfato de 66,15% a VCN 1,1 [kg N-NO₃⁻/m³/d]. El tiosulfato fue el compuesto para el cual se obtuvieron tasas de eliminación más bajas durante toda la operación y la razón S/N óptima encontrada resultó ser 3,4 [g S/g N], la más cercana a la razón estequiométrica.

La VCN recomendada para la remoción conjunta de estos tres compuestos de acuerdo a los datos obtenidos es de 0,6 [kg N-NO₃⁻/m³/d], a la cual se alcanzaron remociones de 98,99% para el nitrato, 94,39% para el acetato y 61,71% para el tiosulfato.

Finalmente, se concluye que las condiciones en el reactor hacen posible la coexistencia de ambas bacterias y el desarrollo de la desnitrificación simultánea, siendo esta una opción interesante para el tratamiento de aguas residuales. Pero inevitablemente unas bacterias se ven más favorecidas que otras y en este caso la desnitrificación se llevó a cabo mayormente vía desnitrificación heterótrofa que autótrofa, con una mayor remoción de acetato que de tiosulfato.

Índice de Contenidos

Agradecimientos	ii
Resumen.....	iii
Índice de Contenidos.....	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	vi
CAPÍTULO 1: Introducción y Objetivos	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo general.....	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
CAPÍTULO 2: Marco teórico	3
2.1 Recurso hídrico y su contaminación.....	3
2.1.1 Ciclo del nitrógeno	3
2.1.2 Ciclo del azufre	5
2.1.3 Ciclo del carbono	7
2.2 Normativa Ambiental Vigente.....	8
2.3 Tratamiento de aguas residuales	11
2.3.1 Desnitrificación heterótrofa	12
2.3.2 Desnitrificación autótrofa	13
2.3.3 Desnitrificación autótrofa y heterótrofa simultánea (SD).....	14
2.4 Microorganismos desnitrificantes.....	18
2.4.1 Bacterias desnitrificantes autótrofas (BDA)	18
2.4.2 Identificación de microorganismos	19
2.5 Reactores anaerobios.....	20
2.5.1 Filtro Anaerobio de Flujo Ascendente (UAF).....	22
2.6 Parámetros operación.....	23
2.6.1 Temperatura:.....	23
2.6.2 Potencial de Hidrógeno:.....	24
2.6.3 Oxígeno:.....	24
2.6.4 Razón C/N y S/N:	24

2.6.5	Compuestos inhibidores:.....	26
CAPÍTULO 3:	Materiales y métodos.....	27
3.1	Enriquecimiento poblaciones microbianas	27
3.2	Descripción del equipo	28
3.3	Puesta en marcha.....	31
3.4	Estrategia de operación.....	32
3.4.1	Alimentación	32
3.4.2	Operación en continuo.....	34
3.5	Parámetros de control y métodos analíticos	35
CAPÍTULO 4:	Resultados y Discusión	37
4.1	Potencial de Hidrógeno	37
4.2	Nitrato	39
4.3	Materia orgánica	41
4.4	Compuestos de Azufre	43
CAPÍTULO 5:	Conclusiones y recomendaciones	47
5.1	Conclusiones.....	47
5.2	Recomendaciones	48
CAPÍTULO 6:	Referencias	49
Anexos		54
A.	Curva calibración bomba de alimentación	54
B.	Nitrato: Espectrofotometría UV-VIS.....	54
C.	Nitrito: Espectrofotometría UV-VIS.....	55
D.	DQO: Espectrofotometría uv-vis / Volumetría por reflujo cerrado	57
D.1.	Espectrofotometría UV-VIS (Rivera y Barahona, 2016).....	58
D.2.	DQO: Volumetría por reflujo cerrado (APHA, 2012)	58
E.	Tiosulfato: Titulación yodometrica.....	60
F.	Sulfato: Espectrofotometría UV-VIS.....	61
G.	Acetato: Cromatografía de supresión iónica.....	63
H.	PH: Potenciometría	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo del nitrógeno.....	4
Figura 2: Ciclo del azufre	6
Figura 3: Ciclo del carbono	7
Figura 4: Etapas de tratamiento de Riles	11
Figura 5: Combinación ciclos del nitrógeno y azufre	14
Figura 6: Interacciones biológicas entre los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre.	15
Figura 7: Esquema filtro anaerobio flujo ascendente	22
Figura 8: Configuración del reactor UAF	29
Figura 9: Diagrama de flujo del reactor UAF utilizado	30
Figura 10: Reactor UAF y equipos adicionales	30
Figura 11: Comportamiento del pH del efluente con respecto a la VCN durante la operación del reactor....	38
Figura 12: Remoción de nitrato con respecto a la VCN durante la operación del reactor UAF.....	39
Figura 13: Valores de DQO del efluente registrados durante la operación del UAF mediante ambos métodos de medición.....	41
Figura 14: Remoción de DQO con respecto a la variación de la VCN durante la operación del reactor	42
Figura 15: Concentración acetato en el afluente y efluente junto a su remoción.....	43
Figura 16: Remoción de tiosulfato con respecto a la variación de la VCN y la razón S/N durante la operación del reactor	44
Figura 17: Concentración de SO_4^{-2} y S-SO_4^{-2} en [mg/L] en el efluente con respecto a la razón S/N durante la operación.....	46
Figura 18: Curva de calibración de la bomba de alimentación	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Normativa ambiental vigente en Chile aplicable a residuos líquidos.....	10
Tabla 2: Límites máximos establecidos por normativa para aguas subterráneas, superficiales y alcantarillado	10
Tabla 4: Clasificación de los sistemas o reactores anaerobios.....	20
Tabla 5: Estudios previos desnitrificación autótrofa y/o heterótrofa.....	21
Tabla 6: Agua residual sintética enriquecimiento heterótrofo	27
Tabla 7: Micronutrientes enriquecimiento heterótrofo	27
Tabla 8: Agua residual sintética enriquecimiento autótrofo	28
Tabla 10: Dimensiones del reactor UAF	29
Tabla 11: Equipos utilizados en la implementación del reactor	31
Tabla 9: Parámetros de control puesta en marcha.....	32
Tabla 12: Composición agua residual sintética	33
Tabla 13: Composición micronutrientes	33
Tabla 14: Parámetros para el cálculo de la VCN.....	34
Tabla 15: Razones de S/N utilizadas.....	35

Tabla 16: Parámetros de operación reactor UAF	35
Tabla 17: Parámetros de control y métodos analíticos.....	36
Tabla 18: Variaciones de Velocidad de Carga Nitrogenada (VCN) y razón S/N durante operación del reactor UAF	37
Tabla 19: Remoción de tiosulfato y generación de sulfato para las diferentes razones S/N estudiadas	45

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la actividad humana ha traído consigo un deterioro ambiental significativo que ha afectado de diversas formas al ecosistema, contribuyendo a un desequilibrio de los ciclos naturales y causando efectos negativos, tales como la lluvia ácida, eutrofización y malos olores en el caso de los ciclos del nitrógeno (N) y del azufre (S). La descarga incontrolada de efluentes hacia los cursos de agua, junto con la aplicación intensiva de fertilizantes son algunas de las principales fuentes de contaminación. Algunos residuos industriales líquidos (Riles) presentan contaminantes como materia orgánica, nitrógeno en sus diversas formas y compuestos de azufre y fósforo. Cabe destacar que la composición de cada Ril varía dependiendo de la industria de la cual proviene.

Dado que cada día existen mayores exigencias en cuanto a la normativa ambiental y por lo tanto, mayor control en el vertido de efluentes, se ha comenzado a investigar y desarrollar nuevas tecnologías para dar solución a este problema. Además, la remediación del agua es necesaria tanto para prevenir los impactos ambientales, como la salud de la población.

El proceso convencional utilizado para la eliminación de nitrato o nitrito en aguas residuales es la desnitrificación heterótrofa, sin embargo, tiene como desventaja que su eficiencia es limitada cuando existen bajas cantidades de materia orgánica (baja relación C/N), por lo que se debe adicionar una fuente de carbono externa aumentando los costos. Así surge la necesidad de buscar procesos alternativos más eficientes, que además permitan la eliminación simultánea de contaminantes disminuyendo los costos y el número de operaciones unitarias necesarias.

La presente memoria forma parte del proyecto Fondecyt N°1130108 que estudia diferentes biotecnologías para la eliminación simultánea de compuestos de N y S en presencia y ausencia de materia orgánica. En este caso en particular, se estudiará el proceso de remoción de nitrógeno, azufre y materia orgánica mediante desnitrificación autótrofa y heterótrofa simultánea a partir de nitrato en un reactor de lecho fijo con flujo ascendente, utilizando zeolita como soporte microbiano.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de esta memoria es operar un reactor anaerobio de lecho fijo y flujo ascendente (UAF) para llevar a cabo la desnitrificación autótrofa-heterótrofa y con ello la remoción simultánea de nitrógeno, azufre y materia orgánica, utilizando nitrato, tiosulfato y acetato como sustratos base.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Operar un reactor UAF de 0,8 litros de capacidad en condiciones anóxicas a 35°C, utilizando zeolita chilena como medio de soporte microbiano y agua residual sintética para su tratamiento.
- ✓ Variar la velocidad de carga nitrogenada (VCN) de manera creciente para determinar la máxima capacidad de procesamiento del UAF, comenzando con una VCN de 0,1 [kg N/m³/d] y variando el caudal mientras los demás parámetros permanecen constantes.
- ✓ Evaluar la influencia de la razón S/N en la remoción de tiosulfato, modificando la concentración de la fuente de azufre en la alimentación (S-S₂O₃) y manteniendo la VCN constante.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 RECURSO HÍDRICO Y SU CONTAMINACIÓN

El agua es un recurso natural único, escaso y esencial para el desarrollo de la vida, que pese a ser el componente principal del planeta, solo alrededor del 3% corresponde a agua dulce y de ésta, solo una parte se encuentra disponible.

Aunque Chile es un país privilegiado en términos de disponibilidad de este recurso, el agua se encuentra distribuida de manera desigual a lo largo del país y no deja de ser un tema relevante, ya que la disponibilidad y calidad del agua tiene directa relación con la salud de las personas y su uso indiscriminado puede provocar la contaminación del recurso, además del consecuente deterioro de la calidad de los demás recursos naturales (SINIA, 2016).

Con el pasar de los años y el actuar desmedido del ser humano, los cuerpos de agua se han visto afectados por diversos tipos de contaminantes. La contaminación hídrica es resultado indirecto de las actividades domésticas, industriales y agrícolas, donde una de las principales fuentes de contaminación son los Riles, ya que las industrias suelen descargar sus aguas cargadas de sustancias químicas y diversos desechos del proceso, incorporando sustancias ajenas a su composición o bien aumentando su concentración a niveles desmedidos. Este es un problema que concierne a todos, ya que toda agua contaminada afecta la salud de quienes están en contacto con ella, ya sea de manera directa o indirecta.

Algunos de los contaminantes frecuentes en los Riles son los compuestos que contienen carbono orgánico, nitrógeno en sus diversas formas y compuestos de azufre, con lo que su descarga desmedida a los cursos de agua sin previo tratamiento altera el equilibrio de tres importantes ciclos biogeoquímicos: el ciclo del nitrógeno, del azufre y del carbono.

2.1.1 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento versátil que existe tanto en formas inorgánicas como orgánicas, así como en muchos estados de oxidación diferentes. El movimiento del N entre la atmósfera, la biosfera y la geosfera en diferentes formas se describe por el ciclo del nitrógeno (Figura 1), uno de los principales ciclos biogeoquímicos (Harrison, 2003). Las principales transformaciones biológicas existentes entre los diferentes estados de oxidación del nitrógeno en la naturaleza son: fijación, amonificación, asimilación, nitrificación, desnitrificación

y anammox. Cada una de ellas es realizada por un tipo determinado de microorganismos, particularmente bacterias, por lo tanto, estas transformaciones tienden a ocurrir más rápidamente que los procesos geológicos, pero a su vez se ven afectados por factores ambientales que influyen en la actividad microbiana, como la temperatura, la humedad y la disponibilidad de recursos.

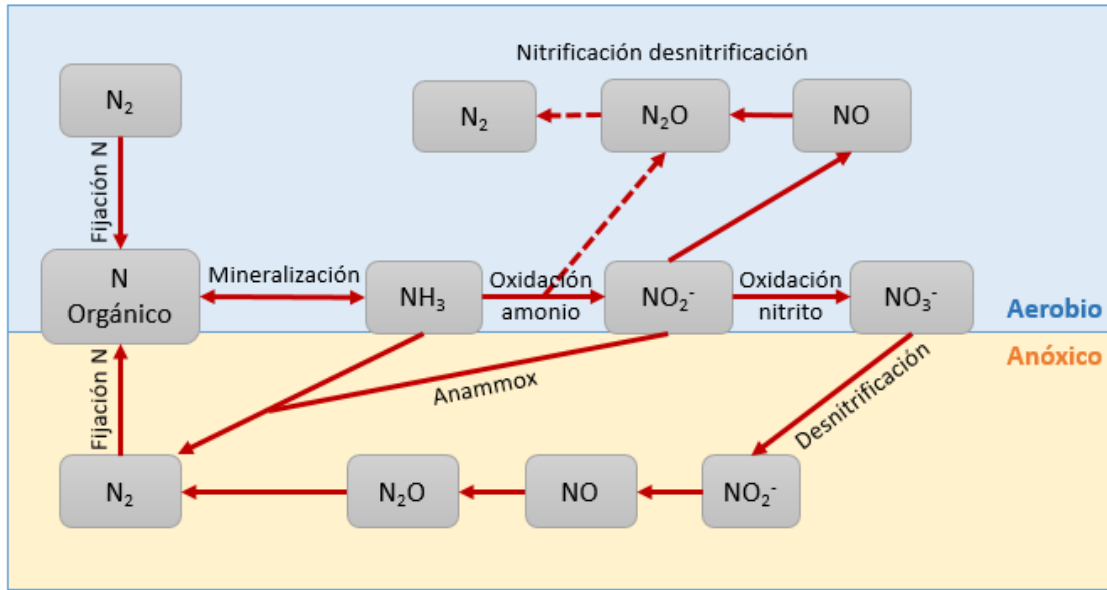


Figura 1: Ciclo del nitrógeno

Fuente: Modificado de Offre *et al.* (2013)

La mayoría de los organismos asimilan N a partir de fuentes inorgánicas de este elemento, como amoníaco (NH_3) y nitrato (NO_3^-), o bien de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno. Sin embargo, estas fuentes son escasas dentro de la biosfera y el mantenimiento de la mayoría de las formas de vida depende de procesos que produzcan continuamente compuestos nitrogenados adecuados a partir del gran reservorio de N_2 en la atmósfera. El nitrógeno atmosférico entra en la cadena alimenticia esencialmente a través de un proceso biogeoquímico llamado fijación de nitrógeno, que consiste en la reducción de N_2 a NH_3 . El proceso se realiza naturalmente por un consorcio microbiano, pero a su vez la fijación industrial de nitrógeno a través del proceso de *Haber-Bosch* produce cantidades similares de amoníaco que se utilizan como fertilizantes en la agricultura, lo cual está perturbando este ciclo (Offre *et al.*, 2013).

El amoníaco no sólo es absorbido por la mayoría de los organismos e inmovilizado en su biomasa, también es oxidado a nitrato en ambientes aerobios a través del proceso de nitrificación, que consiste en dos pasos, la oxidación de NH_3 a nitrito (NO_2^-) y su posterior conversión en NO_3^- (Offre *et al.*, 2013). En los suelos, la

nitrificación también es responsable de las pérdidas de nitrógeno, ya que NO_2^- y NO_3^- son altamente solubles y fácilmente lixiviados a las aguas subterráneas, a diferencia del NH_4^+ que al tratarse de un catión se adhiere a las partículas y materia orgánica del suelo con carga negativa.

Para cerrar el ciclo, es necesaria la existencia de procesos que regeneren el N_2 atmosférico, ya que de lo contrario todo el N de tierra se acumularía en el océano debido a la actividad de nitrificación en curso. Su producción se realiza a partir de compuestos nitrogenados inorgánicos oxidados (NO_2^- y NO_3^-) a través de dos procesos principalmente: desnitrificación y anammox (anaerobic ammonium oxidation). La desnitrificación es una forma de respiración anaerobia que utiliza NO_2^- o NO_3^- como aceptor de electrones y resulta en la formación secuencial de compuestos nitrogenados gaseosos, es decir, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) y N_2 .

Los procesos antropogénicos que más influyen en este ciclo son: la minería, el uso de combustibles fósiles, la fijación del nitrógeno atmosférico mediante procesos químicos (fertilizantes) y el cultivo de plantas fijadoras de nitrógeno. Por otra parte, los problemas que origina el N en las aguas residuales van a depender de la forma en que se encuentre. El nitrógeno amoniacal plantea problemas como: eutrofización, toxicidad y pérdida de oxígeno en las aguas. Mientras que los principales efectos producidos por el nitrito y nitrato son: Metahemoglobinemia (“síndrome del niño azul”) en niños de corta edad, formación de compuestos cancerígenos (nitrosaminas y nitrosamidas) a niveles altos de nitrato, alteraciones de los vasos sanguíneos durante exposiciones prolongadas a altas concentraciones y/o formación de óxidos de nitrógeno, como NO y N_2O , que contribuyen a la destrucción de la capa de ozono y al efecto invernadero (Campos *et al.*, 2009).

2.1.2 Ciclo del azufre

El azufre (S) es el décimo elemento más abundante en la corteza terrestre, es un importante macronutriente necesario para el crecimiento de las plantas y se encuentra en la naturaleza mayoritariamente como sulfato de calcio (yeso), en forma de complejos metálicos (pirita) y como azufre elemental (Lens y Kuenen, 2001). Sus compuestos circulan entre el suelo, los océanos, la atmósfera y la materia viva, a través de reacciones descritas en el llamado ciclo biogeoquímico del azufre (Figura 2). El S experimenta transformaciones cíclicas entre sus estados de oxidación de -2 (HS^-) a +6 (SO_4^{2-}), debido a procesos químicos, geológicos y biológicos. Los tres estados de oxidación más abundantes en la naturaleza son: -2 en forma del anión sulfuro de hidrógeno (HS^-), 0 en forma de azufre elemental (S_0) y +6 en forma de sulfato (SO_4^{2-}). Una parte importante de la movilidad de los compuestos de azufre se debe a que pueden encontrarse como gases o disueltos en

líquidos y así transportarse en la naturaleza. Las bacterias desempeñan un importante papel en este ciclo, tanto en su parte reductiva como oxidativa (Espinoza *et al.*, 2010).

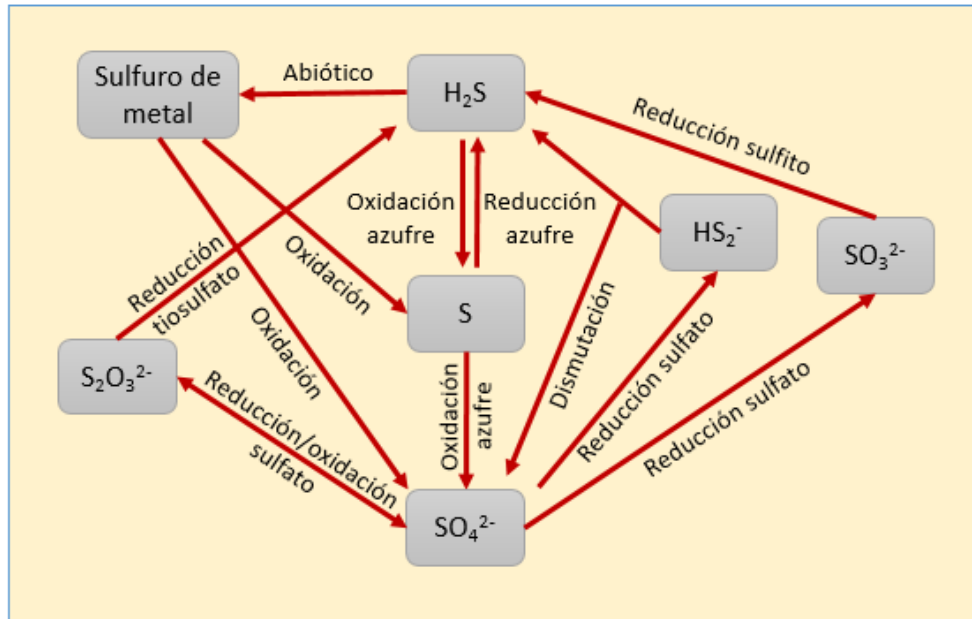


Figura 2: Ciclo del azufre

Fuente: Modificado de Offre *et al.* (2013)

Durante los procesos de reducción, las bacterias sulfato reductoras (SRB) utilizan compuestos de S oxidados (SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-}) como aceptores terminales de electrones en su respiración anaerobia, produciendo H_2S . Los sustratos o donadores de electrones típicos para SRB son lactato, etanol, propionato y H_2 . Este proceso se puede aplicar para eliminar altas concentraciones tanto de sulfato (SO_4^{2-}) como de sulfito (SO_3^{2-}).

Por otro lado, la oxidación biológica se lleva a cabo mediante oxidación fototrófica o quimiotrófica. Las bacterias fotótrofas oxidan el sulfuro a azufre elemental y sulfato bajo condiciones de sulfuro limitante, proceso que se realiza en condiciones anaerobias y requiere luz, CO_2 y nutrientes inorgánicos (Syed *et al.*, 2006). Mientras que, del mismo modo la oxidación de azufre elemental puede ser realizada por bacterias oxidadoras de azufre obteniéndose como producto iones sulfato e hidrógeno, cerrando así el ciclo y equilibrio entre las especies (Janssen *et al.*, 2001).

El aumento de la actividad antropogénica ha dado como resultado desequilibrios locales significativos en las conversiones del ciclo del azufre, sobre todo en la industria del petróleo, papel, curtiembres y durante la digestión anaerobia de lodos y residuos orgánicos. Esto ha llevado a una serie de tipos de contaminación ya conocidas, como: olores molestos, corrosión, toxicidad de sulfuro, muertes de peces y lluvia ácida, producto

de las emisiones de SO_x (Lens y Kuenen, 2001). Desde mediados de los años setenta se ha prestado cada vez más atención al S debido a su importante contribución en la "deposición ácida", producida principalmente por la combustión de combustibles fósiles y la fundición de minerales (Chesworth, 2007). Por otra parte, de los diferentes compuestos de azufre contenidos en los efluentes, el sulfuro de hidrógeno (H_2S) puede causar un gran impacto en el ambiente y la salud. Es un gas incoloro conocido por su toxicidad, corrosión y mal olor, incluso a concentraciones muy bajas, provoca serios problemas de salud, tales como el coma y la inconsciencia en concentraciones de 200 y 300 [mg/L] (Borkenstein y Fischer, 2006; Syed *et al.*, 2006), presenta un fuerte olor a huevo podrido y suele ser un problema importante en algunas plantas industriales. Además, su combustión en presencia de oxígeno forma dióxido de azufre (SO_2), precursor de la lluvia ácida y contribuyente a la acidificación del suelo.

2.1.3 Ciclo del carbono

El carbono (C) es el cuarto elemento más abundante, después del hidrógeno, helio y oxígeno. Este elemento se presenta en la naturaleza en básicamente dos formas: orgánica e inorgánica. Al igual que los anteriores, el ciclo del carbono (Figura 3) es un ciclo biogeoquímico por el cual el C se intercambia entre la biósfera, litósfera, hidrósfera y atmósfera de la Tierra. Los conocimientos sobre este ciclo permiten apreciar la intervención humana y sus efectos sobre el cambio climático.

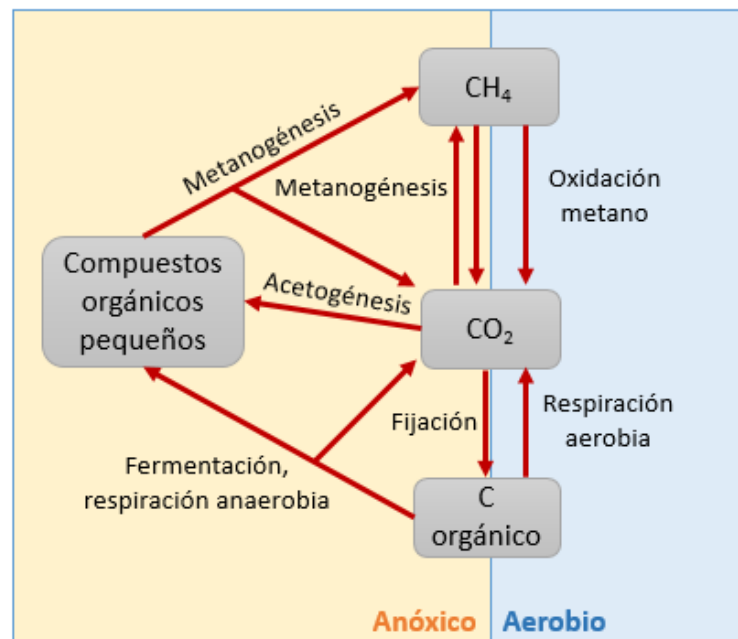


Figura 3: Ciclo del carbono

Fuente: Modificado de Offre *et al.* (2013)

La degradación catabólica de sustratos orgánicos por quimioorganotróficos generalmente da lugar a la producción de CO_2 como principal producto. Sin embargo, la ausencia de receptores externos de electrones (condiciones de fermentación) o una limitación en la capacidad respiratoria está asociada con la producción de compuestos parcialmente oxidados además del CO_2 , como por ejemplo ácidos orgánicos o alcoholes.

El metano (CH_4), un importante gas de efecto invernadero, es el principal producto del metabolismo de las arqueas metanogénicas, las cuales son anaerobias estrictas. Por otra parte, los metanógenos hidrogenotróficos y las bacterias acetogénicas tienen requisitos similares, incluyendo condiciones anóxicas, una fuente de H_2 como donador de electrones y una fuente de CO_2 como aceptor de electrones. Además, las metanogénicas participan en varias asociaciones sintróficas que implican la transferencia de electrones de un organismo fermentativo al metanógeno a través de una molécula portadora, tal como H_2 o acetato. El impacto biogeoquímico global de las interacciones sintróficas es considerable, ya que permiten la completa degradación de moléculas orgánicas complejas al dióxido de carbono y al metano (Offre *et al.*, 2013). Luego, para mantener el control de estas emisiones, el CH_4 es oxidado de regreso a CO_2 .

Los efectos de la contaminación por materia orgánica en general son diferentes, según se trate de materia orgánica biodegradable o no biodegradable. La primera provoca una disminución del oxígeno disuelto en el agua, producto del consumo de éste en los procesos de descomposición. Estos procesos corresponden a reacciones químicas que requieren el oxígeno disuelto en el agua para su desarrollo, oxígeno procedente de la atmósfera que en condiciones normales es requerido por la flora y fauna del medio, lo cual al existir un exceso de materia por degradar ocasiona que el equilibrio del medio se altere. Además, cuando se ha consumido todo el oxígeno disuelto, la degradación se torna anaeróbica, emanando generalmente malos olores.

Finalmente, para prevenir estos problemas y los anteriormente mencionados la legislación ha establecido límites máximos de vertido para materia orgánica, nitrógeno, azufre y algunos otros, los que se pueden alcanzar mediante tratamientos físico-químicos o biológicos.

2.2 NORMATIVA AMBIENTAL VIGENTE

La preocupación por el medio ambiente en Chile desde el punto de vista jurídico no es reciente, pero en los últimos años ha tenido un avance significativo. A principios del siglo pasado se dictaron las primeras normas con el objetivo de regular aspectos específicos de la incidencia de la actividad humana sobre el medio

ambiente. Pero fue a partir del año 2010 que la institucionalidad ambiental tuvo un salto sustantivo, cuando la Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA) fue reemplazada por el Ministerio del Medio Ambiente (MMA) y un conjunto de organismos públicos, cuya función principal es evaluar y fiscalizar conforme con la legislación ambiental vigente.

El MMA es el órgano del Estado de Chile encargado de colaborar con el Presidente de la República en el diseño y aplicación de políticas, planes y programas en materia ambiental, así como la protección y conservación de la diversidad biológica y de los recursos naturales renovables e hídricos, promoviendo el desarrollo sustentable, la integridad de la política ambiental y su regulación normativa (MMA, 2016).

El concepto de normativa de carácter ambiental, o normativa ambiental aplicable, comprende aquellas normas cuyo objetivo es asegurar la protección del medio ambiente, la preservación de la naturaleza y la conservación del patrimonio ambiental, que imponen una obligación o exigencia, cuyo cumplimiento debe ser acreditado (SEA, 2016).

Una de las metas ambientales de Chile es mejorar la calidad de sus aguas, los avances que hasta hoy se registran en protección del recurso hídrico sitúan a nuestro país a la cabeza de Latinoamérica. La disponibilidad de este recurso, junto con su calidad, son parte de los temas relevantes para la gestión ambiental del país, no sólo para resguardar el desarrollo y la calidad de vida de sus habitantes, sino también para posibilitar el adecuado equilibrio ambiental (SINIA, 2016).

La ley 19.300 corresponde a la ley General de Bases sobre el Medio Ambiente y establece tanto normas de calidad como normas de emisión. Las normas de calidad pueden ser primarias o secundarias, cuya diferencia radica en el objetivo de protección. En las primeras, el objeto de protección es la vida o salud humana, mientras que para las secundarias es la protección y conservación del medio ambiente, o preservación de la naturaleza. Por su parte, las normas de emisión limitan contaminantes medidos en el efluente de una fuente emisora (SINIA, 2016).

En el presente estudio las normas que cobran mayor importancia son las de emisión, cuyos límites están establecidos dependiendo del destino que vaya a tener el RIL. Estas y cada una de las normativas que conciernen a este caso y a los residuos líquidos en general, se señalan en la Tabla 1.

Tabla 1: Normativa ambiental vigente en Chile aplicable a residuos líquidos

Normativa	Organismo	Materia
Ley N°19.300 (Modificada por Ley N°20.417)	Ministerio Secretaría General de la Presidencia	Ley sobre Bases Generales del Medio Ambiente.
D.S. N°43 /2003	Ministerio Secretaría General de la Presidencia	Norma de emisión de residuos líquidos a aguas subterráneas.
D.S. N°90 /2001	Ministerio Secretaría General de la Presidencia	Norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales.
D.S. N°609 /2004	Ministerio de Obras Públicas	Norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos industriales líquidos a sistemas de alcantarillado.
NCh. 1333 Of. 78 (Modificada en 1987)	Ministerio de Obras Públicas	Norma chilena sobre requisitos de calidad de agua.

Fuente: Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (2016)

Las normas de emisión anteriormente mencionadas (D.S. N°43, 90 y 609) contribuyen a mantener la calidad ambiental de las aguas y determinan las concentraciones máximas permitidas de los diferentes contaminantes en los residuos líquidos que son descargados por la fuente emisora, ya sea a aguas subterráneas, superficiales o alcantarillados. Estas aplican en todo el territorio nacional y se encuentran resumidas en la Tabla 2.

Tabla 2: Límites máximos establecidos por normativa para aguas subterráneas, superficiales y alcantarillado

Parámetro	Unidad	Aguas superficiales					Aguas subterráneas		Alcantarillado	
		RSD	RCD	Lacustre	MDZP	MFZP	VM	VB	SCPT	SSPT
DBO5	mgO ₂ /L	35	300	35	60	-	-	-	300	-
NTK	mg/L	50	75	10	50	-	10	15	-	-
N-NO₃ + N-NO₂	mg/L	-	-		-	-	10	15	-	-
NH₄⁺	mg/L	-	-	-	-	-	-	-	80	-
SO₄⁻²	mg/L	1.000	2.000	1.000	-	-	250	500	1.000*	1.000*
S⁻²	mg/L	1	10	1	1	5	1	5	5	5
pH	-	6,0-8,5	6,0-8,5	6,0-8,5	6,0-9,0	5,5-9,0	6,0-8,5	6,0-8,5	5,5-9,0	5,5-9,0
SST	mg/L	80	300	80	100	300	-	-	300	-
T	°C	35	40	30	30	-	-	-	35	35

RSD: ríos sin dilución; RCD: ríos con dilución

MDZP: marino dentro de zona de protección litoral; MFZP: marino fuera de zona de protección litoral

VM: vulnerabilidad media; VB: vulnerabilidad baja

SCPT: sistema con planta de tratamiento; SSPT: sistema sin planta de tratamiento

*Se aceptarán concentraciones entre 1.000 y 1.500 mg/L cuando se cumple que: a) pH= 8-9; b) temperatura del RIL (°C) ≤ temperatura de las aguas receptoras.

Fuente: D.S. N°43, 90 y 609

Finalmente, con el objetivo de lograr que la reducción de los contaminantes provenientes de los procesos industriales sea efectiva, no se debe usar como procedimiento de tratamiento la dilución de los Riles con aguas ajenas al proceso industrial, incorporadas sólo con el fin de reducir las concentraciones. Además, si el contenido natural del acuífero excede al límite máximo permitido en el decreto correspondiente, el límite máximo de la descarga será igual al contenido natural mencionado.

2.3 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Los procesos utilizados para el tratamiento de Riles se pueden clasificar a grandes rasgos en tratamientos fisicoquímicos y tratamientos biológicos, donde en comparación con los primeros, los biotratamientos son ventajosos debido al funcionamiento a bajas presiones y temperaturas, sumado a la ausencia de catalizadores costosos (Tang *et al.*, 2010). Además, se pueden agrupar por operaciones unitarias para proporcionar distintos niveles de tratamiento (Figura 4), los que incluyen las siguientes categorías: pre-tratamiento, tratamiento primario, secundario y terciario (Metcalf y Eddy, 1998).



Figura 4: Etapas de tratamiento de Riles

Fuente: Muñoz (2015)

Este estudio corresponde al tratamiento terciario, que implica la minimización de contaminantes que se puedan verter a cuerpos receptores de aguas, afectando el ecosistema acuático.

La tecnología más extendida para la eliminación de N en aguas residuales se basa en la combinación de dos procesos biológicos: la nitrificación y la desnitrificación. El primero es realizado por un conjunto de bacterias autótrofas oxidantes de amonio y de nitrito, mientras que el segundo es realizado por un amplio conjunto de bacterias que tienen la posibilidad de emplear nitrato o nitrito como aceptores de electrones en una cadena respiratoria, principalmente en ausencia de oxígeno. Las características que describen ambos procesos obliga

a realizarlos por separado, precisando un sistema aireado para llevar a cabo la nitrificación y otro anóxico para la desnitrificación (Khin y Annachhatre, 2004). Sin embargo, pese a que el proceso de nitrificación-desnitrificación ha demostrado tener la viabilidad técnica suficiente, presenta un gran inconveniente: el alto consumo de oxígeno necesario para realizar el proceso de nitrificación, que incrementa los costos del sistema, y que además requiere de suficiente cantidad de materia orgánica, co-sustrato del proceso de desnitrificación heterótrofa.

Los microorganismos desnitrificantes son facultativos (pueden usar nitrato u oxígeno como aceptores de electrones) y usan los tres tipos de fuentes de energía posibles: orgánica (heterótrofos), inorgánica (autótrofos) y luz (fotótrofos). Los sustratos orgánicos son la fuente de energía más común, por lo que las bacterias desnitrificantes son generalmente heterótrofas, sin embargo, un número limitado de bacterias son capaces de llevar a cabo la desnitrificación autótrofa, utilizando compuestos inorgánicos como donadores de electrones (Torrentó *et al.*, 2010).

2.3.1 Desnitrificación heterótrofa

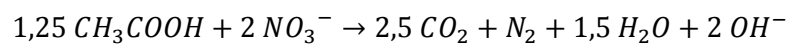
La desnitrificación heterótrofa es una de las tecnologías más ampliamente utilizadas para el tratamiento de Riles contaminados con nitrato o nitrito y materia orgánica, debido a que es económica, ambientalmente amigable y versátil. Es el método convencional utilizado para la eliminación de estos compuestos de nitrógeno producidos luego del tratamiento aerobio, en el cual también se reduce materia orgánica por la alta relación C/N requerida para llevarlo a cabo.

Corresponde a un proceso biológico en el cual se reducen el nitrato (NO_3^-) y el nitrito (NO_2^-) a nitrógeno gaseoso (N_2), con una fuente de carbono orgánica como dador de electrones. Esto controla la fijación de nitrógeno y ayuda con la remoción de materia orgánica en cuerpos de agua.

La reducción del nitrato hasta N_2 sigue una serie de pasos que involucran la actividad de diferentes enzimas. Los géneros desnitrificantes más citados incluyen *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*, entre otros. La mayoría de ellos son heterótrofos, pero algunos pueden crecer autótroficamente en hidrógeno y CO_2 o en compuestos sulfurados reducidos. Además, poseen la enzima nitrato reductasa para reducir NO_3^- a NO_2^- , a excepción de algunas especies como *Pseudomonas aureofaciens* que su producto final es N_2O .

El proceso es de tipo anaerobio y es fuertemente inhibido en la presencia de oxígeno, sobre todo en la última etapa de la desnitrificación correspondiente a la reducción de N_2O a N_2 . Debido a esto, es importante evitar la entrada de O_2 en el proceso, para no liberar N_2O , gas que contribuye al efecto invernadero. Otra variable ambiental que también puede influir en la acumulación de intermediarios indeseables es el pH. Se ha descrito que en condiciones ácidas (pH 6 o menor) se acumula ácido nitroso (HNO_2), muy tóxico para las bacterias, mientras que a valores de pH ligeramente alcalinos el nitrato es convertido en N_2 . El proceso de desnitrificación tiende a aumentar la alcalinidad por sí solo, puesto que necesita los protones de hidrógeno para su ejecución (Sánchez y Sanabria, 2009).

Para obtener una alta eficiencia de desnitrificación la razón C/N es el principal parámetro de control en el biorreactor. La reacción estequiométrica entre acetato y nitrato (relación C/N igual a 1,07) se muestra en la ecuación [1] (Reyes-Avila *et al.*, 2004):



[1]

Por último, cuando se utiliza al nitrito como aceptor de electrones la velocidad máxima de crecimiento es menor que cuando se utiliza nitrato (1,5 y 2,6 d^{-1} , respectivamente), lo que implica una menor producción de biomasa (Ciudad, 2007). Por otro lado, Gee y Kim (2004) mostraron que la desnitrificación a partir de nitrito es de 3 a 5 veces más rápida que cuando se utiliza nitrato, reduciendo además el requerimiento de materia orgánica.

2.3.2 Desnitrificación autótrofa

La evolución de las técnicas de depuración junto con el objetivo de reducir el consumo energético, los costos de los procesos y la necesidad de eliminar nitrógeno de las aguas residuales han favorecido el desarrollo de novedosos procesos de eliminación de nitrógeno. En estas aguas, además de los compuestos de nitrógeno y carbono pueden estar presentes compuestos de azufre.

En la naturaleza existen ciertos microorganismos capaces de combinar los ciclos del nitrógeno y el azufre, estos juegan un papel importante en los ecosistemas marinos, principalmente en el límite entre las interfaces anóxicas y aerobias (Fernández-Polanco *et al.*, 2001). La interacción biológica o combinación de estos dos ciclos (Figura 5) implica la oxidación de las formas reducidas de azufre y la reducción de compuestos de nitrógeno oxidados, tal como en el proceso de desnitrificación autótrofa (DA).

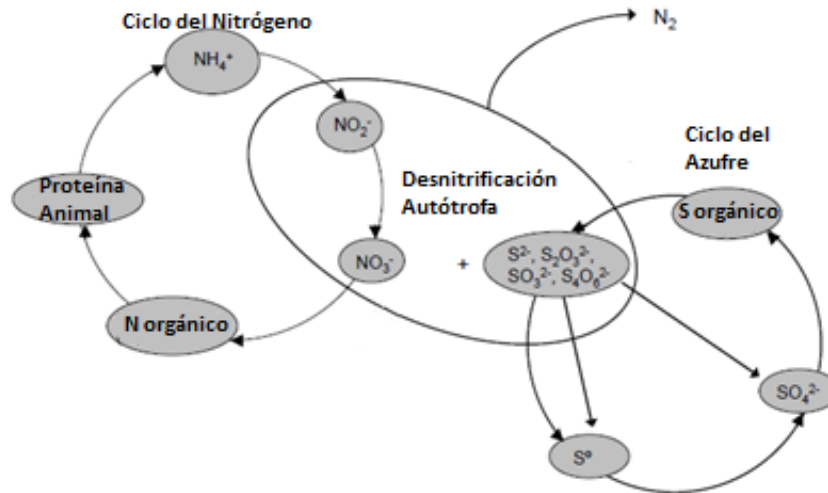
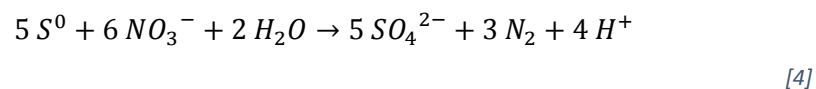
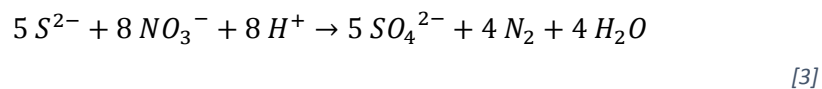
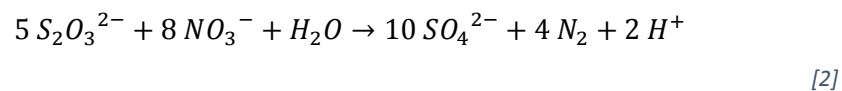


Figura 5: Combinación ciclos del nitrógeno y azufre

Fuente: Adaptado de Fajardo (2011)

En el proceso de DA se lleva a cabo la reducción de nitrato (NO_3^-) y/o nitrito (NO_2^-) a N_2 , con H_2 o compuestos de azufre ($S_2O_3^{2-}$, S^{2-} , S^0 , $S_4O_6^{2-}$, SO_3^{2-}) como donadores de electrones (Ecuaciones [2], [3] y [4]). Todo esto ocurre por la acción de las bacterias oxidantes de azufre (SOB) con CO_2 y HCO_3^- como fuente de carbono (Fajardo, 2011). Estas bacterias pueden usar también el oxígeno como aceptor de electrones para la oxidación de compuestos azufrados, aunque si el propósito del proceso es la eliminación de NO_3^- se debe evitar la presencia de O_2 , ya que las bacterias lo usarán preferentemente como aceptor de electrones. A partir de la ecuación [2], se obtiene que la razón molar estequiométrica entre el tiosulfato y el nitrato $S_2O_3^{2-}/NO_3^-$ es igual a 0,625 (Cardoso *et al.*, 2006) y el producto final obtenido (SO_4^{2-}) es menos perjudicial que el nitrato, especialmente cuando se vierte al medio marino.



2.3.3 Desnitrificación autótrofa y heterótrofa simultánea (SD)

En resumen, la desnitrificación heterótrofa es utilizada para la eliminación de compuestos de nitrógeno (NO_2^- , NO_3^-), en el cual también se reduce materia orgánica, mientras que la desnitrificación autótrofa se logra

eliminar además el azufre. Interactuando así los 3 ciclos anteriormente mencionados, como se observa en la Figura 6.

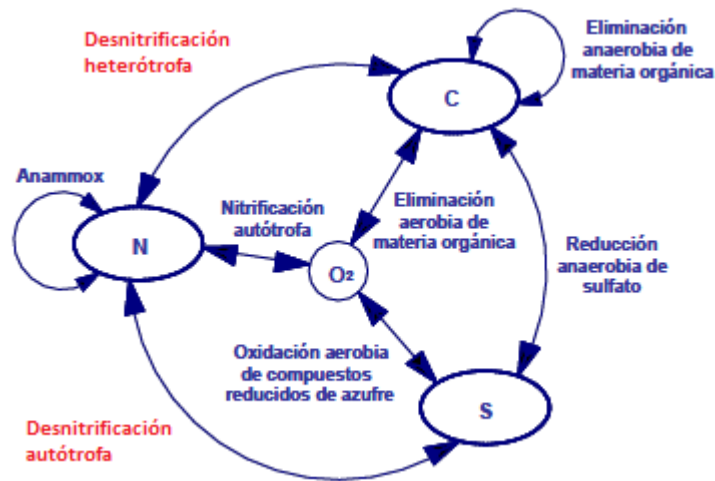


Figura 6: Interacciones biológicas entre los ciclos de carbono, nitrógeno y azufre.

Fuente: Campos *et al.* (2009)

Al tratar residuos con altas concentraciones de estos compuestos mediante desnitrificación autótrofa se reduce el nitrógeno hasta su forma gaseosa, el azufre se oxida produciendo compuestos sulfatados y el medio adquiere protones generados en la metabolización, acidificando el medio. La materia orgánica no es tratada con este tipo de proceso e incluso puede mermar en la eficacia del tratamiento al ser un elemento inhibidor si se encuentra en concentraciones elevadas. En cambio, si se aplica la desnitrificación heterótrofa se puede reducir el nitrógeno a su forma gaseosa y oxidar la materia orgánica, generando hidroxilos que alcalinizan el medio, pero los compuestos sulfurados no son tratados en absoluto.

Por ello, resulta de interés estudiar si es posible la coexistencia de microorganismos heterótrofos y autótrofos para la eliminación conjunta de materia orgánica, nitrógeno y azufre (Guerrero *et al.*, 2016), ya que cuando están presentes bacterias desnitrificantes autótrofas y heterótrofas en el mismo reactor compiten significativamente por el suministro limitado de nitrato (Chen *et al.*, 2008) y la producción de protones por parte del cultivo autótrofo es compensada por la generación de hidroxilos asociada al cultivo heterótrofo, lo que genera un efecto tampón, controlando cambios muy drásticos en el pH del medio.

Existen pocos estudios referidos a la desnitrificación heterótrofa y autótrofa simultánea (SD), a continuación se mencionan algunos.

Gommers *et al.* (1988) utilizaron un reactor de lecho fluidizado para estudiar el efecto del sulfuro y el acetato en desnitrificación bajo condiciones limitadas de ambos sustratos. Los autores observaron que la reducción de nitrato fue parcial, debido a que se acumuló nitrito en el sistema. El acetato fue consumido a altas eficiencias y el sulfuro fue completamente oxidado a sulfato. No obstante, no se determinaron todos los productos finales de las reacciones biológicas.

Reyes-Ávila *et al.* (2004) argumentaron que la velocidad de reacción ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) es mayor vía desnitrificación autótrofa ($\text{S}_2^- \rightarrow \text{S}^0$) que vía desnitrificación heterótrofa (acetato $\rightarrow \text{CO}_2$). Por el contrario, la velocidad de reacción ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$) es mayor vía desnitrificación heterótrofa. Por tanto, con un inóculo suficiente de heterótrofos y autótrofos simbióticos y suministro de nitrato ilimitado lograron remover simultáneamente nitrógeno ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$), sulfuro ($\text{S}_2^- \rightarrow \text{S}^0$) y carbono (acetato $\rightarrow \text{CO}_2$) en el mismo reactor continuo de tanque agitado (CSTR) a velocidades de carga de 0,209 [kg N/m³d], 0,294 [kg S/m³d], y 0,303 [kg C/m³d]. Así su uso combinado disminuye la acumulación de productos intermediarios al acelerar globalmente y específicamente la metabolización de los compuestos nitrogenados.

Chen *et al.* (2008) trabajaron con un reactor EGSB donde sulfuro, nitrato y acetato fueron simultáneamente convertidos a S^0 , N_2 y CO_2 a velocidades de carga de 3,0 [kg S/m³d], 1,45 [kg N/m³d] y 2,77 [kg Ac/m³d], respectivamente. No se registró inhibición por azufre hasta concentraciones de 800 [mg/L]. Se observó que los gránulos contenían *Pseudomonas spp.* y *Azoarcus*, heterótrofos y autótrofos trabajando juntos en desulfurización y desnitrificación simultánea.

Li *et al.* (2009) operaron un bioreactor anaeróbico de crecimiento adherido (AAGBR), llegando a remover hasta un 99,9% de S y un 91,8% carbono orgánico, a velocidades de carga de 1.800 [mg S_2^- /L d], 302,4 [mg C/L d] y 180 [mg N- NO_2^- /L d]. Este proceso demostró la posibilidad de eliminar carbono orgánico en presencia de nitrato y nitrito.

En otras dos publicaciones (Tang *et al.*, 2010; An *et al.*, 2010) se utilizó una colonia microbiana de un yacimiento petrolífero. Tang *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la velocidad de carga de azufre (VCS), la velocidad de carga nitrogenada (VCN) y la proporción molar en las tasas de remoción de sulfuro, nitrato y acetato. La remoción de sulfuro y nitrato bajo condiciones autótrofas fue de 30 y 24,4 [mM/h], respectivamente, y las mismas para nitrato y acetato bajo condiciones heterótrofas fueron 183,2 y 88 [mM/h], respectivamente. Por otro lado, An *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la VCS y de la relación sulfuro/nitrato

(S/N). Los resultados obtenidos indicaban que cortos tiempos de residencia y relaciones altas S/N promueven la formación de S^0 .

Los estudios que se han realizado dentro del proyecto Fondecyt N°1130108, en el que se enmarca esta memoria, han entregado los siguientes resultados:

Aguirre (2014) evaluó el comportamiento de un reactor híbrido anaerobio de flujo ascendente con lecho para filtro de lodos (UASFB) operando el proceso de desnitrificación simultánea. Se corroboró experimentalmente que existen condiciones que permiten la coexistencia de ambos microorganismos desnitrificantes en un reactor de biomasa granular. Se alcanzaron remociones máximas de 99,5% de nitrato, 75,8% de materia orgánica y 32,5% de tiosulfato, para una razón DQO/N de 5,8 y una VCS de 0,25 [kg S/m³d].

Peirano (2016) modeló la remoción de nitrato y acetato y la producción de sulfato en relación a la proporción de bacterias heterótrofas/autótrofas, la razón acetato/nitrato y la razón tiosulfato/nitrato dentro de los reactores a través de ensayos *batch*, para lo cual se obtuvo que el rango óptimo de operación recomendado es una razón molar acetato/nitrato de 1,05, una razón de desnitrificantes heterótrofos vs autótrofos de 0,37 y una razón de tiosulfato/nitrato de 0,8-0,9.

Jeria (2016) realizó la puesta en marcha de un reactor EGSB (*Expanded Granular Sludge Bed*), al que se le inocularon microorganismos heterótrofos y autótrofos, mediante lo cual se alcanzaron remociones de nitrato del 99,5%, de tiosulfato del 98,7% y de materia orgánica (DQO) de 73,0%, a una velocidad de carga nitrogenada (VCN) de 0,1 [kg N/m³/d]. Además, se recalca la importancia de la temperatura y el pH en las tasas de remoción.

Rodríguez (2016) analizó la capacidad de tratamiento de un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente y filtro superior (UASBF), utilizando bacterias desnitrificantes autótrofas y heterótrofas. Los datos obtenidos muestran que las condiciones proporcionadas hacen posible la coexistencia y eficacia de ambas bacterias. A su vez se determinó que el sistema no puede operar superados los 0,82 [g N-NO₃⁻/L/d], con relaciones de DQO/N de 3,7, S/N de 2,0 y un TRH de 1 [d]. Se obtuvo remociones con un promedio de: 90% de nitrato, 88% de DQO y 99% de tiosulfato. Además, se presenta una posible inhibición de funciones metabólicas del lecho microbiológico por continua operación con acumulación de ion sulfato.

2.4 MICROORGANISMOS DESNITRIFICANTES

Principalmente bacterias y algunas archaeas constituyen la vasta mayoría de organismos capaces de realizar desnitrificación. Los géneros más citados incluyen *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera* (Aguirre, 2014). Estos microorganismos son principalmente mesófilos con óptimos de temperatura entre 25 y 35°C y pH entre 7 y 8. La mayoría reducen el nitrógeno hasta su forma gaseosa, aunque algunas sólo lo transforman a óxido nitroso, incluso existiendo especies que sólo pueden llevar a cabo la reducción hasta nitrito como producto final (Robertson y Kuenen, 1992).

2.4.1 Bacterias desnitrificantes autótrofas (BDA)

Las bacterias sulfo-oxidantes, o *colourless sulphur bacteria*, son microorganismos quimiolitotrofos obligados y facultativos capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre para obtener energía. Además, son organismos que pueden crecer en ambientes mesófilos y termófilos, a pH neutro y bajo condiciones aerobias o anaerobias. En la naturaleza se encuentran a menudo en la interfaz anóxica y aerobia de los sedimentos y el agua, donde las concentraciones de compuestos de azufre son también bajas, y en las aberturas geotérmicas. Sin embargo, dentro de este grupo son pocos los microorganismos habilitados para realizar la desnitrificación autótrofa usando el azufre como donador y el nitrato/nitrito como aceptor de electrones. A este reducido grupo se le conoce como bacterias desnitrificantes autótrofas (BDA).

Las BDA son miembros del *phylum Proteobacteria*, que incluye a las familias *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Thiobacillus versutus*, *Thiosphaera pantatropa*, *Thioploca* y *Thiobacillus thioparus* (Tandukar *et al.*, 2009; Madigan y Martinko, 2006), que pueden utilizar compuestos reducidos de azufre, tales como el S^{-2} , S^0 , $S_2O_3^{-2}$, $S_4O_6^{-2}$ y SO_3^{-2} , como donadores de electrones para reducir el nitrato o nitrito a nitrógeno gaseoso.

Dentro de este grupo de protobacterias destaca la *Thiobacillus denitrificans*, perteneciente a la clase β -Protobacteria (Robertson y Kuenen, 1992). Es una bacteria caracterizada por tener forma de vástago (bacilo), incolora, gram-negativa, no filamentosa y con movilidad a partir de flagelos polares o sin movilidad (Fajardo, 2011). Esta bacteria es una de las pocas sulfo-oxidantes anaerobias facultativas, capacitada para oxidar tiosulfato y tiocianato bajo condiciones aerobias y además puede oxidar azufre elemental, sulfuros y tetratiónato bajo condiciones anaerobias. Las condiciones óptimas de crecimiento para esta bacteria son pH 6,9 y 29,5°C de temperatura. Contrario a lo que ocurre durante la desnitrificación heterótrofa, en este proceso

se requiere de una fuente de alcalinidad (HCO_3^- , CaCO_3) para neutralizar los protones producidos (Fajardo, 2008).

2.4.2 Identificación de microorganismos

La identificación de microorganismos consiste en un análisis cualitativo, que indica la presencia de algún tipo de microorganismo en un sistema determinado. Esta información se obtiene a través de diversas técnicas y ensayos microbiológicos. Es conveniente realizar la caracterización del inóculo previo a cualquier investigación que involucre la acción microbiana en su proceso, para así conocer con que se está trabajando, sus parámetros cinéticos, metabólicos y todo aquello que ayude a optimizar el funcionamiento del sistema.

En estudios anteriores (Muñoz, 2015; Garrido, 2016) pertenecientes al mismo Fondecyt en el que se enmarca este trabajo, se llevaron a cabo análisis microbianos para identificar las especies presentes en el inóculo utilizado. Bajo la premisa de estar favoreciendo el crecimiento de bacterias desnitrificantes autótrofas, como *Thiobacillus denitrificans* y *Thiomicrospira denitrificans* en el sistema, se realizaron ensayos con el fin de identificar y corroborar si estos microorganismos proliferaban al interior del reactor. Se realizó la caracterización de las bacterias a través de tinciones (simple y Gram), pruebas bioquímicas y además se efectuó la amplificación de ADN por PCR y FISH. Mediante estos ensayos se pudo identificar las BDA presentes en el reactor. La técnica PCR, permitió detectar enzimas nitrito reductasas, que son las responsables de llevar a cabo el proceso de desnitrificación y de transformar compuestos de nitrato hasta nitrógeno gaseoso. Por otra parte, la técnica de FISH arrojó como resultado que los microorganismos desnitrificantes autótrofos presentes son de la clase *Betaproteobacteria* y pertenecen al género *Thiobacillus*. Además, se realizó una secuenciación que arrojó como resultado el género *Castellaniella*, teniendo un 100% de identidad con *Castellaniella denitrificans* strain ZU-I (Garrido, 2016).

El género *Castellaniella* pertenece al grupo *Betaproteobacteria* y se caracteriza por ser gramnegativos, anaerobios facultativos y desnitrificantes. Las células son varillas móviles cortas, de 1,3-2,0 [μm] de largo y de 0,2- 0,8 [μm] de ancho. El género contiene dos especies, *Castellaniella defragrans* y *Castellaniella denitrificans*. Esta última crece en ambientes entre 30 y 42°C, mientras que bajo los 4°C no hay crecimiento (Kämpfer *et al.*, 2006). Se comporta como heterótrofa, es decir utiliza compuestos de carbono orgánico como fuente de carbono.

2.5 REACTORES ANAEROBIOS

Actualmente existen a nivel mundial decenas de tipos de reactores o sistemas anaerobios, algunos ya aplicados y otros se están estudiando con intensidad a escala laboratorio. Existen diferentes maneras de clasificarlos, una de ellas es como reactores de primera o segunda generación (Tabla 3). En los de primera generación el tiempo de retención hidráulico es igual al tiempo de retención de sólidos, mientras que en los de segunda generación el tiempo de retención de los sólidos es mayor que el tiempo de retención hidráulico y como consecuencia el proceso es mucho más eficiente (Montalvo y Guerrero, 2003). A su vez, los reactores de segunda generación se clasifican según si su biomasa está fija o suspendida, si es dispersa o granular y según el tipo de operación a la cual está sujeta, es decir continuos o de operación *batch*.

Tabla 3: Clasificación de los sistemas o reactores anaerobios

1era Generación	2da Generación	
	Con biomasa adherida	Con biomasa suspendida
Tanques sépticos	Filtro anaerobio (flujo ascendente)	UASB
Lagunas anaerobias	Reactor de lecho fijo (flujo descendente)*	EGSB
Minidigestores	Lecho fluidizado	Circulación interna
Digestores convencionales	Lecho expandido	Dos etapas
		Proceso Anaerobio Secuencial
		Reactor con membrana

* Incluye aquellos con soporte ordenado y desordenado.

Fuente: Modificado de Montalvo y Guerrero (2003)

Se han realizado diferentes estudios sobre desnitrificación utilizando principalmente reactores *batch* con tiosulfato como compuesto reductor y en menor medida reactores continuos, utilizando sulfuro o azufre elemental (Fajardo, 2011). La elección del tipo de reactor es un factor muy importante a la hora del diseño, ya que determina la forma en la que la biomasa es retenida en el sistema. En la Tabla 4 se resumen algunos estudios de desnitrificación autótrofa, heterótrofa y simultánea, junto con los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

Tabla 4: Estudios previos desnitrificación autótrofa y/o heterótrofa

Reactor	Inóculo	Donador/Aceptor Electrones	Remoción Máxima	Referencia
REACTOR EMPACADO DE AZUFRE (SPBR)	-	$S^0 / NO_3^- / \text{Lixiviado}$	99% N	Kim y Bae, 2000
SPBR	-	$S^0 / NO_3^- / \text{MeOH}$	97% N 90% C	Oh et al., 2001
REACTOR CONTINUO DE MEZCLA PERFECTA (CSTR)	<i>T. Denitrificans bioaumentado</i>	$S_2O_3^{2-} / NO_3^-$	95% S 100% N	Manconi et al., 2007
CSTR	<i>Lodo activado</i>	S^{-2} / NO_2^-	80% S 100% N	Dogan et al., 2012
FED BATCH	<i>Lodo enriquecido</i>	$S^{-2}, S^0, S_2O_3^{2-} / NO_3^-$	100% S 100% N	Beristain et al., 2006
FILTRO ANÓXICO DE FLUJO ASCENDENTE (UAF)	<i>Lodo metanogénico</i>	S^{-2} / NO_3^-	99% S 94% N	Mahmood, et al., 2009
UAF	---	$S_2O_3^{2-} / NO_2^-$	90% N	Yamamoto-Ikemoto et al., 2000
UAF	<i>Lodo Enriquecido</i>	S^{-2} / NO_3^-	100% S 100% N	Kleerebezem y Méndez, 2002
UAF	<i>Lodo anaerobio</i>	$S^0 / NO_3^-, NO_2^-$	90% N	Zhou et al., 2011
UAF	<i>Cultivos enriquecidos</i>	$S^{-2} / NO_3^- / \text{Acetato}$	99.7% S	Tang et al., 2010
LECHO FIJO FLUJO VERTICAL	<i>Lodo enriquecido</i>	$S^{-2} / NO_3^-, NO_2^-$	87% S 95% N	Moraes et al., 2012
LECHO EMPACADO FLUJO ASCENDENTE	<i>Lodo enriquecido</i>	$S^{-2}, S^0 / NO_3^-, NO_2^-$	99% N	Sun y Nemati, 2012
LECHO EXPANDIDO (EGSB)	<i>Lodo enriquecido</i>	$S^{-2} / NO_3^- / \text{Acetato}$	99% S 99% N 94% C	Chen et al., 2012
LECHO EMPACADO FLUJO ASCENDENTE	<i>Desnitrificación por proceso Bardenpho</i>	$S^0 / NO_3^-, NO_2^-$	100% N	Uyanik et al., 2013
LECHO DE LODO GRANULAR	<i>Lodo anaerobio</i>	$S^{-2} / NO_3^- / \text{COD}$	100% S	Chen et al., 2004

2.5.1 Filtro Anaerobio de Flujo Ascendente (UAF)

Los reactores anaerobios con lecho fijo (RALF) o empacado o filtro anaerobio (FA) corresponden a reactores de segunda generación con crecimiento en soporte. En ellos el agua residual pasa a través de un lecho con material inerte sobre el cual se establecen y desarrollan los microorganismos que actúan sobre el sustrato. De esta manera, los sólidos biológicos se retienen dentro del reactor por un período largo de tiempo. Además, el material de soporte actúa como un separador gas-sólido, ayuda a uniformar el flujo a través del reactor y mejora el contacto entre el sustrato y la biomasa. Pero, por otro lado, debido al poco mezclado que existe en el interior de este tipo de reactores, presentan una estratificación de microorganismos en la dirección del flujo y dentro de la biopelícula, la zona de entrada del afluente es la de mayor actividad biológica. En los filtros anaerobios que degradan materia orgánica, la zona de entrada del efluente se constituyen los microorganismos de fase acidogénica, que hidrolizan y degradan la materia orgánica compleja, en la capa intermedia los microorganismos anaerobios y productores de oxígeno y en la capa interior los metanogénicos (Montalvo y Guerrero, 2003).

Según el tipo de alimentación, pueden ser de flujo ascendente, descendente o longitudinal. En los reactores de lecho fijo o filtros anaerobio con flujo ascendente (UAF por sus siglas en inglés) la entrada de agua residual a tratar se realiza por la zona inferior, siendo esta la más activa, y asciende por el interior de la columna donde los microorganismos realizan la depuración. Por la parte superior se obtiene biogás y un efluente con menor carga contaminante (Figura 7). Esta conformación otorga al equipo una gran capacidad de filtración física.

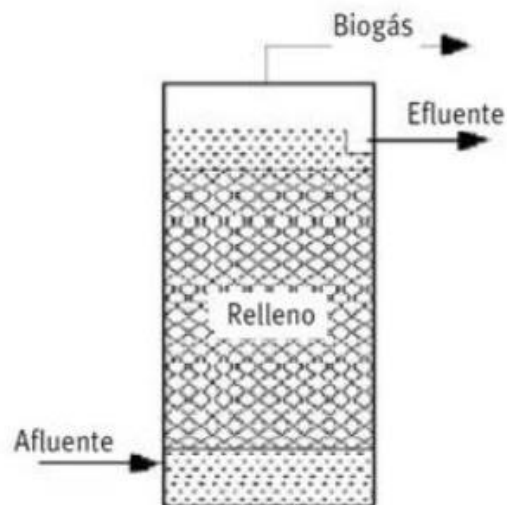


Figura 7: Esquema filtro anaerobio flujo ascendente

Fuente: Hernández (2014)

La recirculación del efluente a la entrada del reactor aumenta ligeramente la eficiencia del proceso, sin embargo, esta operación ayuda a reducir la alcalinidad y los requerimientos de nutrientes, mejora la distribución de flujo a través del reactor y reduce la concentración de ácidos orgánicos en contacto con los microorganismos en la zona de lodos.

Este tipo de reactores son los más sencillos de mantener, porque la biomasa permanece como una biopelícula adherida al material de soporte. Además, el desarrollo de los microorganismos sobre un medio sólido hace que se logren tiempos de retención celular muy elevados con bajos tiempos de retención hidráulica, lo que podría resultar en una mayor eficiencia (Moraes y Foresti, 2012). No obstante, estos sistemas pueden presentar problemas de obstrucción y altas caídas de presión, debido al exceso de biomasa que provoca la opresión del gas, limitando así la transferencia de masa desde el líquido al *biofilms* (Fajardo, 2011). Ahora bien, si el flujo es ascendente el riesgo de obstrucción disminuye considerablemente (Navarro, 2008).

Entre sus principales ventajas se encuentran su fácil construcción y poco espacio utilizado, lo que lo hace adecuado para la aplicación a pequeña y mediana escala, su operación es simple, se caracteriza por soportar altas cargas y con recirculación es capaz de aceptar repentinos cambios de carga, rápida aclimatación a diferentes aguas residuales, bajos tiempos de retención hidráulica y rápido re-arranque después de fallos. Pero también presenta inconvenientes como la dificultad en la puesta en marcha, el riesgo de atascamiento y el encontrarse limitado a aguas residuales con bajo contenido de sólidos suspendidos (Montalvo *et al.*, 2012).

2.6 PARÁMETROS OPERACIÓN

A continuación, se presentan algunos de los parámetros operacionales más importantes en la desnitrificación, cuyo control o ausencia de este pueden afectar significativamente en los resultados obtenidos del proceso.

2.6.1 Temperatura:

La temperatura afecta la velocidad de metabolización, se han documentado eficiencias de remoción de compuestos hasta tres veces menor cuando se opera a 14°C que cuando se opera a 30-32°C (Vlokita *et al.*, 1996). El rango óptimo de operación se encuentra entre 25 y 35°C, aunque debido a la capacidad de adaptación de las bacterias desnitrificantes se ha documentado operación en un rango de 2 a 50°C (Karanasios *et al.*, 2010). En el caso particular de las autótrofas, se ha documentado que cuando es superior a 40°C (Oh *et al.*, 2000) o inferior a 15°C la tasa de DA es insignificante (Yamamoto-Ikemoto *et al.*, 2000).

2.6.2 Potencial de Hidrógeno:

Una variable ambiental que también influye en el proceso de desnitrificación, así como en la acumulación de intermediarios indeseables es el pH.

En cuanto a los microorganismos autótrofos, el rango de operación de *Thiobacillus denitrificans* es entre 7 y 8 (Oh *et al.*, 2000; Claus y Kutzner, 1985). En este intervalo de valores los productos finales son N_2 y SO_4^{2-} , mientras que a valores menores a 7 la desnitrificación es incompleta y se detectan productos intermedios tales como NO_2^- y/o S^0 . A valores inferiores a 6 o superiores a 9 se observa inhibición completa de la DA (Moon *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2000).

Para el caso de los heterótrofos, se ha descrito que en condiciones ácidas, pH 6 o menor, se acumula ácido nitroso (HNO_2), muy tóxico para las bacterias. A valores de pH ligeramente alcalinos, el nitrato es convertido en N_2 . Cabe destacar que estos estudios han sido realizados en cultivos batch, mientras que en cultivos en continuo, no se observó acumulación de intermediarios de la desnitrificación en el intervalo de pH de 6 a 9, aun cuando se utilizó una velocidad de carga alta (1.000 mg $N-NO_3^-/L/d$), pero el proceso si fue totalmente inhibido a un pH de 5 (Pérez, 1998).

2.6.3 Oxígeno:

El oxígeno y el nitrato son aceptores de electrones, donde la oxidación de los compuestos de azufre en presencia de oxígeno es termodinámicamente más favorecida que la oxidación por nitrato, por lo que la presencia de oxígeno disuelto puede significar que las bacterias, en base a capacidades facultativas, empleen el O_2 como aceptor final de electrones, reduciendo su recuperación. Por lo tanto, su presencia debe ser evitada asegurándose de que el reactor y el sistema completo este completamente sellado.

Varios trabajos de investigación coinciden en que la concentración mínima de oxígeno disuelto que no causa inhibición de la desnitrificación autotrófica es de entre 0,1-0,3 [mg O_2/L]. Por encima de estas concentraciones se inhibe la desnitrificación (Kimura *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2004). Fajardo (2011) también coincide que con concentraciones superiores a los 0,3 [mg/L] se produce una inhibición de la desnitrificación y la formación de sulfato.

2.6.4 Razón C/N y S/N:

En el caso de Riles con compuestos sulfurados, nitrogenados y materia orgánica disuelta resulta primordial tener en cuenta estas relaciones, donde las razones S/N y C/N representan la concentración de carbono o

azufre en la fuente respectiva, respecto a la concentración de nitrógeno. Ambas entregan información sobre la respuesta de un proceso de tratamiento simultáneo y el control del reactor biológico.

Se ha observado que la relación S/N de la alimentación juega un papel importante en la desnitrificación autótrofa y su control se requiere para conducir el proceso a los productos de interés. Oh *et al.* (2000) ensayaron diferentes relaciones S/N con tiosulfato como donador de electrones y nitrato como aceptor de electrones y encontraron que a relaciones inferiores a 6,51 [g S/g N] (limitación de azufre) la desnitrificación sólo se llevó a cabo con nitrito. En el caso de relaciones S/N superiores a la estequiométrica, el compuesto de azufre sólo se oxida a azufre elemental (Gadekar *et al.*, 2006).

Campos *et al.* (2008) indican que en un reactor del tipo *batch*, utilizando razones menores a la estequiométrica, en donde el compuesto limitante es el tiosulfato de sodio, la desnitrificación es incompleta produciéndose nitrito como producto final. Mientras que a razones estequiométricas o superiores, se observa desnitrificación total, produciendo N₂ con una fuente de nitrógeno correspondiente a nitrato en concentración variable de 0,88 a 3,98 [g/L]. Por otro lado, Muñoz (2015) operando un reactor de tipo UASB determinó una relación óptima de S/N de 4,6, con VCN de 2,2 [kg/m³/d], alcanzando remociones de nitrato y tiosulfato de 91% y 82%, respectivamente.

Peirano (2016) analizó los efectos de la razón molar S₂O₃²⁻/NO₃⁻ (0,15; 0,625; 1,1) mediante ensayos *batch*, manteniendo constante la concentración de nitrato (10 mM NaNO₃) y variando la concentración de tiosulfato. Como resultados se obtuvo que en el caso de la razón tiosulfato-nitrato la máxima producción de sulfato se obtuvo a una razón S/N de 0,91. Sin embargo la máxima remoción de nitrato se obtuvo a razón S/N de 0,41.

Para la relación C/N, Cardoso *et al.* (2006) demuestran que con H₂S, acetato y NO₃⁻ como aceptor de electrones y nitrato estequiométrico, se presenta completa oxidación del ácido sulfhídrico a sulfato. Mientras que, a concentraciones bajo la estequiométrica se obtuvieron ratios de oxidación bajos. Esto radica en que la concentración de carbono impacta directamente la actividad de las bacterias heterotróficas. Por otra parte, Chen *et al.* (2008) analiza el comportamiento de un reactor EGSB con inóculo simultáneo, variando la relación C/N entre 0,85/1 y 2/1 (estequiométrica de 0,75/1), la remoción de nitrato y acetato fue del 100% para una razón de 0,85/1 hasta 1,05/1, sin embargo, para ratios de 2/1 se observa una baja de la remoción de azufre. Esto se explica porque cuando existe exceso de acetato, las bacterias desnitrificantes heterótrofas dominan a las autótrofas. Finalmente, Aguirre (2014) evaluó el comportamiento de un reactor UASFB operando el proceso de desnitrificación simultánea. Trabajó con dos condiciones de alimentación, comenzando con una

relación DQO/N igual a 3,6, y una VCS de 0,75 [kg S/m³d], para continuar con una relación DQO/N igual a 5,8, una VCS de 0,25 [kg S/m³d], alcanzando remociones máximas de 99,5% de nitrato, 75,8% de materia orgánica y 32,5% de tiosulfato con las segundas condiciones.

2.6.5 Compuestos inhibidores:

Existen ciertas especies que pueden inhibir las capacidades desnitrificantes de las bacterias, como lo es el nitrito, compuesto altamente tóxico. Se debe controlar su aparición como producto intermedio de la reacción, ya que esta especie representa ser un inhibidor natural de los procesos de remoción de nitrógeno de aguas residuales (Cardoso, 2002). La enzima nitrito reductasa es relativamente sensible a condiciones del medio, lo que vuelve al sistema propenso a la acumulación de NO₂⁻, aunque algunos autores documentan buena remoción del nitrito por parte de las bacterias a pesar de la inhibición (Liu *et al.*, 2014).

También se ha informado de la inhibición de la desnitrificación por nitrato a concentraciones de 660 [mg N-NO₃/L], mientras que el nitrito parece ser un fuerte inhibidor incluso a bajas concentraciones de entre 36-60 [mg N-NO₂/L] (Oh *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2002).

La materia orgánica no tiene efecto inhibitorio sobre el proceso, pero afecta la oxidación de las especies de azufre, disminuyendo la formación de sulfato (Kim y Son, 2000; Oh *et al.*, 2002). El sulfato es un producto del proceso y se ha informado que provoca una inhibición parcial a concentraciones de 500 [mg S-SO₄/L] y un agotamiento de la actividad total a 6400 [mg S-SO₄/L] (Claus y Kutzner, 1985).

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ENRIQUECIMIENTO POBLACIONES MICROBIANAS

Este proceso fue realizado por separado para autótrofos y heterótrofos. El enriquecimiento de las bacterias heterótrofas desnitrificantes fue realizado por Moraga (2016), para lo cual se utilizó lodo de un reactor anaerobio UASB de la planta de tratamiento *British American Tobacco Chile*. Esto se hizo en un reactor anaerobio a 35°C, alimentado de forma *batch* con agua residual sintética, cuya composición se indica en la Tabla 5 y Tabla 6.

Tabla 5: Agua residual sintética enriquecimiento heterótrofo

MEDIO ENRIQUECIMIENTO	CONCENTRACIÓN [g/L]
CH ₃ COOK	1,52
NH ₄ CL	0,1
KH ₂ PO ₄	0,3
K ₂ HPO ₄	1,84
KNO ₃	1,43
MICRONUTRIENTES	1 [ml]

Fuente: Moraga (2016)

Tabla 6: Micronutrientes enriquecimiento heterótrofo

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN [g/L]
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30
ZnCl ₂	1,0
CaCO ₃	2,0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
HCl (37%)	50
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
H ₃ BO ₃	0,5

Fuente: Moraga (2016)

Por otro lado, el enriquecimiento de las bacterias autótrofas desnitrificantes se había realizado para investigaciones anteriores en el laboratorio a partir de lodo proveniente de una laguna anaerobia de la

empresa Agrícola AASA, mediante el mismo procedimiento y cambiando únicamente la composición del agua residual sintética (Tabla 7). Los resultados obtenidos alcanzaron los 20.220 [mg SSV/L] y una remoción de NO_3^- del 98,37% para las heterótrofas y 24.460 mg [SSV/L] y 96,94% de remoción para las autótrofas (Moraga, 2016).

Tabla 7: Agua residual sintética enriquecimiento autótrofo

MEDIO ENRIQUECIMIENTO	CONCENTRACIÓN [g/L]
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,0
KNO_3	1,43
NaHCO_3	1,5
Na_2HPO_4	1,5
KH_2PO_4	0,3
NH_4Cl	0,1
MICRONUTRIENTES	1 [ml]

Fuente: Peirano (2016)

3.2 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

La tecnología utilizada para la desnitrificación simultánea en este estudio corresponde a un reactor de lecho fijo a escala de laboratorio, específicamente un filtro anaerobio de flujo ascendente o UAF por sus siglas en inglés, con recirculación.

El equipo fue diseñado de manera tal, que el ingreso de la alimentación y de la recirculación se encuentran en la parte inferior del equipo, para obtener así un flujo ascendente. Mientras que la salida, tanto del efluente como de la recirculación se encuentran en la parte superior del mismo, donde además cuenta con una salida de gas. Esta última es controlada por una válvula anti retorno, que junto con el sellado hermético del reactor evitan el ingreso de oxígeno de manera de mantener las condiciones anóxicas requeridas. En la zona central cuenta con un lecho empacado que contiene zeolita chilena de granulometría promedio 5 mm, la cual es utilizada como medio de soporte. Su volumen de trabajo es de 0,8 litros. Su configuración y dimensiones se detallan a continuación en la Figura 8 y la Tabla 8.

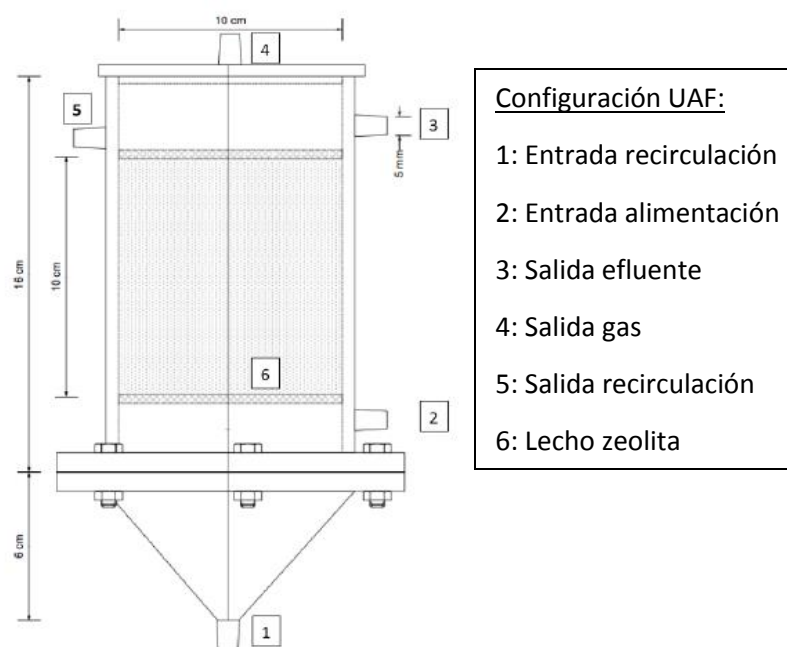


Figura 8: Configuración del reactor UAF

Fuente: Modificado de Muñoz (2015)

Tabla 8: Dimensiones del reactor UAF

CARACTERÍSTICA	VALOR	CARACTERÍSTICA	VALOR	UNIDAD
H cilindro	16	H relleno	10	cm
A cilindro	74	A flujo	30	cm ²
V total	1,5	V útil	0,8	L

Fuente: Moraga (2016)

En reactor UAF fue montado en un soporte universal y conectado mediante mangueras a dos bombas peristálticas, una para la alimentación y otra para la recirculación. Además, contaba con tanques de alimentación y descarga, donde el de alimentación se mantuvo permanentemente agitado mediante un agitador magnético, para que el Ril sintético se mantuviera homogéneo. Por otro lado, la bomba de alimentación fue conectada a un temporizador que se programaba conforme al caudal diario necesario en el reactor y el entregado por la bomba. Todo lo anterior debió sellarse herméticamente para evitar fugas e ingreso de oxígeno.

El sistema completo, a excepción de los tanques de alimentación y descarga, fue implementado en una cámara cerrada, la cual se mantuvo a una temperatura de 33°C aproximadamente. Esta temperatura es la óptima para el crecimiento de los microorganismos utilizados y se mantuvo controlada mediante un termoventilador regulado por un controlador de temperatura (termocupla) que se encarga de accionar su funcionamiento para mantener el *set point* fijado. Ver Figura 9 y Figura 10.

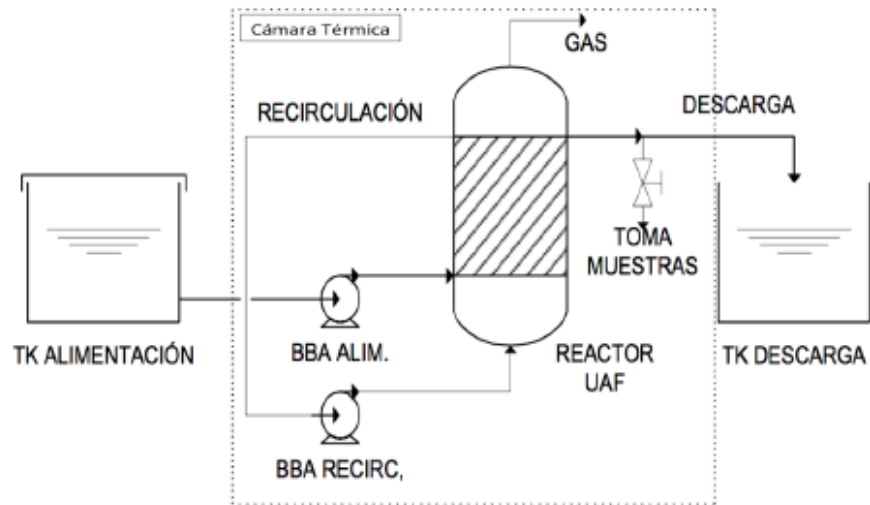


Figura 9: Diagrama de flujo del reactor UAF utilizado
Fuente: Muñoz (2015)



Figura 10: Reactor UAF y equipos adicionales

La bomba de alimentación debió ser calibrada (Anexo A) para que su configuración correspondiera realmente al caudal que se deseaba entregar y de esta forma poder controlar la VCN. Este y los demás equipos observados en la figura anterior son detallados en la Tabla 9.

Tabla 9: Equipos utilizados en la implementación del reactor

EQUIPO	DESCRIPCIÓN
Bomba peristáltica (recirculación)	<i>Lead Fluid YZ15, BT300L</i>
Bomba peristáltica (alimentación)	<i>Lead Fluid YZ15, BT301S</i>
Mangueras	<i>MasterFlex, silicona, #15 y #18</i>
Controlador de temperatura	<i>Barnant Company</i>
Temporizador	<i>CT6S Autonics</i>
Termoventilador	<i>Somela, 1800 watts</i>
Agitador mecánico	<i>CAT R18</i>
Estanques	<i>Material: plástico, Capacidad: 20 L</i>
Cámara adiabática	<i>Material: polietileno expandido</i>

Fuente: Modificado de Moraga (2016)

3.3 PUESTA EN MARCHA

La puesta en marcha del reactor operado en la presente investigación fue realizada en una memoria anterior por Moraga (2016). Para montar el reactor UAF se añadió el medio de soporte microbiano correspondiente a zeolita natural chilena de granulometría promedio de 5 mm, se selló herméticamente, se realizó un barrido con gas inerte (Ar) a fin de asegurar las condiciones anóxicas y finalmente se inoculó para lograr la adherencia de los microorganismos a la zeolita. La razón en masa de bacterias heterótrofas sobre autótrofas (H/A) utilizada es de 0,54, relación óptima alcanzada por Peirano (2016) para la remoción de nitrato.

La puesta en marcha propiamente tal se dividió en dos etapas: la primera consiste en el enriquecimiento del reactor UAF, donde el reactor fue operado por lotes alimentados (*fed batch*) esperando la adherencia de los microorganismos a la zeolita hasta que se forme una biopelícula, mientras que la segunda corresponde a la operación en continuo del reactor comenzando con una VCN de 0,02 [kg N/m³/d] hasta llegar a 0,1 [kg N/m³/d]. Los parámetros de control utilizados y con los que se recibió el reactor para continuar con su operación se indican en la Tabla 10.

Tabla 10: Parámetros de control puesta en marcha

PARÁMETRO	VALOR	UNIDAD
Volumen reactor	0,8	L
Temperatura	33 - 35	°C
pH	8 ± 0,3	-
[N]	0,1038	g/L
S/N	4,6	p/p
C/N	3,0	p/p

Fuente: Moraga (2016)

Los resultados obtenidos durante la puesta en marcha fueron de hasta 99,84% de reducción de nitratos, 96,1% de remoción de tiosulfato y 98,36% de reducción de acetato en la etapa *fed batch*, mientras que en la operación en continuo se alcanzó una máxima remoción de nitrato de 99,91%, de tiosulfato de 96,51% y de acetato de 98,21% a VCN 0,02 [N-NO₃⁻/m³/d], llegando a VCN 0,1 [N-NO₃⁻/m³/d] con un 99,18% de remoción de nitrato, 12% de remoción de tiosulfato y 89,74% de remoción de acetato.

3.4 ESTRATEGIA DE OPERACIÓN

3.4.1 Alimentación

El sustrato o medio de alimentación del reactor corresponde a agua residual sintética, la que es preparada en el laboratorio a partir de un conjunto de macro y micro-nutrientes, cuya composición permite satisfacer los requerimientos de las bacterias desnitrificantes, tanto autótrofas como heterótrofas, además de conocer y tener el control sobre lo que se está alimentando.

La composición inicial con la que se operó el reactor fue la misma con la que se realizó la puesta en marcha, la cual se basó en el resultado del estudio previo realizado por Aguirre (2014), donde se indican las concentraciones óptimas para los requerimientos particulares en la desnitrificación simultánea autótrofa y heterótrofa.

La composición inicial sufrió modificaciones durante el transcurso de la operación, como la modificación del tampón de fosfato y de la razón S/N, que serán detalladas más adelante. Ver Tabla 11 y Tabla 12.

Tabla 11: Composición agua residual sintética

COMPUESTO	INICIAL	1 ^{ER} CAMBIO	2 ^{DO} CAMBIO	3 ^{ER} CAMBIO	UNIDAD
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	2,6	2,6	2,2	1,95	mg/L
KNO ₃	1,06	1,06	1,06	1,06	mg/L
CH ₃ COOK	1,81	1,81	1,81	1,81	mg/L
NaHCO ₃	1,5	1,5	1,5	1,5	mg/L
NH ₄ Cl	0,056	0,056	0,056	0,056	mg/L
K ₂ HPO ₄	0,07	0,07	0,07	0,07	mg/L
KH ₂ PO ₄	-	0,027	0,027	0,027	mg/L
MICRONUTRIENTES	1	1	1	1	mL/L

Tabla 12: Composición micronutrientes

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [g/L]
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30
ZnCl ₂	1,0
CaCO ₃	2,0
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
HCl (37%)	50
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
H ₃ BO ₃	0,5

El nitrato (NO₃⁻) que actúa como aceptor de electrones es incorporado como nitrato de potasio (KNO₃), mientras que el azufre es incorporado en forma de tiosulfato (S₂O₃⁻²) como donador de electrones. Estos compuestos son fundamentales, ya que deben estar presentes en el medio para poder evaluar su remoción de acuerdo a los objetivos planteados. La relación S/N en la puesta en marcha y comienzo de la operación fue de 4,6 (Muñoz, 2015), que corresponde a un 60% en exceso de azufre.

Por otra parte, la presencia tanto de carbono orgánico (CH₃COOK) como inorgánico (NaHCO₃) también es necesaria para el metabolismo de las bacterias heterótrofas y autótrofas respectivamente. La relación teórica de C/N utilizada es de 3,0 (Aguirre, 2014) considerando sólo el carbono orgánico, la cual se mantuvo constante durante toda la operación.

Además, al RIL se le añadió un tampón de fosfato (K₂HPO₄ y KH₂PO₄) para mantener el pH en el rango deseado (8,0 ± 0,3). Este fue calculado mediante la ecuación de *Henderson-Hasselbalch* (Harris, 2007).

3.4.2 Operación en continuo

Una vez iniciada la operación en continuo, la estrategia principal de operación del reactor UAF consiste en variar la velocidad de carga nitrogenada (VCN) gradualmente de manera creciente, para determinar la máxima capacidad de procesamiento del reactor, comenzando bajo las condiciones establecidas en la puesta en marcha.

La VCN está dada por la siguiente expresión:

$$VCN \left[\frac{kg\ N}{m^3 \cdot día} \right] = \frac{Q \left[\frac{m^3}{día} \right] \cdot C \left[\frac{kg\ N}{m^3} \right]}{V_r [m^3]}$$

Donde, Q corresponde al caudal de la alimentación, C a la concentración de nitrógeno en la misma y V_r al volumen del reactor. Para el aumento de la VCN durante la operación se modificó únicamente el caudal, de manera ascendente, mientras los demás parámetros permanecieron constantes. Los valores de los parámetros recién mencionados se presentan en la Tabla 13, donde para efectos de cálculo se utiliza la concentración de nitrógeno experimental, obtenida del promedio de las mediciones realizadas en el laboratorio durante la puesta en marcha.

Tabla 13: Parámetros para el cálculo de la VCN

PARÁMETRO	SIGLA	VALOR	UNIDAD
Volumen útil del reactor	V_r	0,0008	m^3
Concentración N teórica	C_{teo}	0,1470	$kg\ N/m^3$
Concentración N experimental	C_{exp}	0,1038	$kg\ N/m^3$
Caudal inicial (VCN = 0,1)	Q_i	0,0008	$m^3/día$

Se comienza con una VCN de 0,1 [$kg\ N/m^3/d$] y se va aumentando en 0,1 hasta alcanzar un valor de 0,6 [$kg\ N/m^3/d$]. Los cambios se realizan una vez que el reactor alcanza su máxima remoción de nitrato y permanece estable por al menos 5 TRH. Esta primera etapa se extendió por 4 semanas.

El Tiempo de Residencia Hidráulico (TRH) es inversamente proporcional al caudal, por lo tanto, a medida que aumenta Q el TRH disminuye acelerando los cambios de VCN al estabilizarse la remoción.

$$TRH = \frac{V_r}{Q}$$

La segunda etapa consiste en realizar cambios en la razón S/N manteniendo la VCN constante, para encontrar la razón óptima para una mayor remoción de tiosulfato. Dado que el nitrato corresponde al reactivo limitante, la razón se modificó cambiando la concentración de tiosulfato en la alimentación. La razón estequiometría corresponde a 2,9 [g S/g N], con lo que la relación inicial correspondía a un 60% en exceso, el cual fue reducido a los valores que aparecen en la Tabla 14.

Tabla 14: Razones de S/N utilizadas

S/N [g/g]	EXCESO	ALIMENTACIÓN [g/L]
4,6	60%	2,60
3,9	35%	2,20
3,4	20%	1,95

Luego de 77 días en que se trabajó en la segunda etapa se continúa con la siguiente, donde se vuelve a aumentar la VCN, pero esta vez a razón S/N 3,4 [g S/g N] buscando la máxima capacidad de procesamiento del reactor. Nuevamente se modifica únicamente el caudal de alimentación en 0,1 hasta alcanzar una VCN de 1,2 [kg N/m³/d], para luego aumentar más bruscamente a 1,5 [kg N/m³/d] y finalmente a 2,0 [kg N/m³/d] concluyendo la operación.

Finalmente, los parámetros de operación que deben mantenerse constantes y controlados durante toda la operación del reactor son los siguientes (Tabla 15).

Tabla 15: Parámetros de operación reactor UAF

PARÁMETRO	VALOR	UNIDAD
TEMPERATURA	33 ± 2	°C
pH	8 ± 0,3	-
[N]	0,1038	g/L
C/N	3,0	p/p
H/A	0,54	p/p

3.5 PARÁMETROS DE CONTROL Y MÉTODOS ANALÍTICOS

Para el correcto seguimiento de la operación es necesario medir ciertos parámetros claves en la desnitrificación simultánea, como son el nitrato, tiosulfato y materia orgánica que se desean remover, el sulfato y el nitrito que corresponden a productos final e intermedio de estas reacciones y el pH que es un factor muy influyente en la actividad de los microorganismos utilizados. Para esto se monitorea su composición tanto en el afluente como en el efluente.

Los métodos analíticos utilizados, junto con la frecuencia de medición de cada parámetro se mencionan en la Tabla 16 y se detallan en Anexos.

Tabla 16: Parámetros de control y métodos analíticos

PARÁMETRO	MÉTODO ANALÍTICO	FRECUENCIA	ANEXO
Nitrato (NO_3^-)	Espectrofotometría UV-VIS (205 nm)	Diariamente	B
Nitrito (NO_2^-)	Espectrofotometría UV-VIS (543 nm)	Diariamente	C
DQO	Espectrofotometría UV-VIS / Volumetría por reflujo cerrado	3 veces por semana	D
Tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$)	Titulación yodométrica	3 veces por semana	E
Sulfato (SO_4^{2-})	Espectrofotometría UV-VIS (420 nm)	3 veces por semana	F
Acetato	Cromatografía de supresión iónica	1 vez por semana	G
pH	Potenciometría	Diariamente	H

La medición del pH se efectuó tanto en la alimentación como la descarga para controlar la estabilidad del reactor y verificar que el valor se mantenga dentro del rango óptimo de operación, para favorecer el crecimiento de las bacterias desnitrificantes. Esta es una variable crítica, ya que al bajar de 6,5 el medio se considera acidificando y la población de bacterias podría disminuir, al igual que su capacidad de degradación.

Los demás parámetros de control también fueron medidos tanto en la alimentación como en la descarga, a excepción del nitrito que se midió solamente en el efluente.

Para el caso de la DQO se mencionan 2 métodos analíticos diferentes, ya que en un principio se midió por espectrofotometría UV-VIS, pero los resultados de los triplicados para una misma muestra presentaban una desviación estándar demasiado grande, lo cual se puede deber a interferencias de otros compuestos. Es por esto que se decidió cambiar al método tradicional de volumetría por reflujo cerrado, el que conlleva un mayor error del operador, pero aun así los triplicados presentaban una menor desviación.

Producto de esta incertidumbre se decidió medir además acetato, para lo cual se comenzó a tomar muestras durante la segunda etapa de operación, las cuales fueron analizadas en el Centro de Biotecnología "Dr. Daniel Alcalay" mediante cromatografía de supresión iónica.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan y analizan los datos obtenidos de la operación del reactor UAF para cada uno de los parámetros de control indicados anteriormente.

De acuerdo a la estrategia de operación se realizaron variaciones graduales de la VCN de manera creciente, comenzando con una VCN de 0,1 [kg N/m³/d], que corresponde a la alcanzada durante la puesta en marcha (Moraga, 2016), y finalizando con un máximo de 2,0 [kg N/m³/d]. Además, se realizan cambios de la razón S/N, disminuyendo el porcentaje en exceso de azufre de 60% a 35% y luego a 20% para evaluar el comportamiento del sistema con respecto a la remoción de tiosulfato. La etapa de operación completa se llevó a cabo durante 147 días y no presentó mayores complicaciones.

En la Tabla 17 se presentan las variaciones de carga realizadas y sus respectivos parámetros de operación.

Tabla 17: Variaciones de Velocidad de Carga Nitrogenada (VCN) y razón S/N durante operación del reactor UAF

DÍAS DE OPERACIÓN	VCN [kg N/m ³ /d]	S/N [g S/g N]	EXCESO AZUFRE	CAUDAL [mL/d]	TRH [d]
1	0,1			0,0008	1,04
2 – 7	0,2			0,0015	0,52
8 - 13	0,3	4,6	60%	0,0023	0,35
14 – 21	0,4			0,0031	0,26
22 – 28	0,5			0,0039	0,21
29 – 60		4,6	60%		
61 - 86	0,6	3,9	35%	0,0046	0,17
87 - 105		3,4	20%		
106 – 111	0,7			0,0054	0,15
112 – 117	0,8			0,0062	0,13
118 – 123	0,9			0,0069	0,12
124 – 127	1,0			0,0077	0,10
128 – 132	1,1	3,4	20%	0,0085	0,09
133 – 138	1,2			0,0093	0,09
139 – 142	1,5			0,0116	0,07
143 – 147	2,0			0,0154	0,05

4.1 POTENCIAL DE HIDRÓGENO

Se midió diariamente el pH como indicador de la concentración de protones al interior del reactor, con el objetivo de controlar la estabilidad del mismo y verificar que se estén llevando a cabo las reacciones químicas esperadas, dada la incidencia de este parámetro en la actividad enzimática de los microorganismos presentes.

Los resultados obtenidos para el efluente con respecto a las variaciones de la VCN realizadas se muestran en la Figura 11. Se puede observar que se trabajó principalmente dentro de los rangos establecidos, con un pH óptimo de $8,0 \pm 0,3$ para favorecer el crecimiento simultáneo de ambos cultivos. No se presenta ninguna medición con pH superior a 9,0 ni inferior a 6,5, puntos críticos tanto para la inhibición completa de la DA y acumulación de intermediarios, como para la acidificación del medio y disminución de la capacidad de degradación, respectivamente. El pH promedio del sistema fue de 8,1, fluctuando entre un mínimo de 7,5 y un máximo de 9,0.

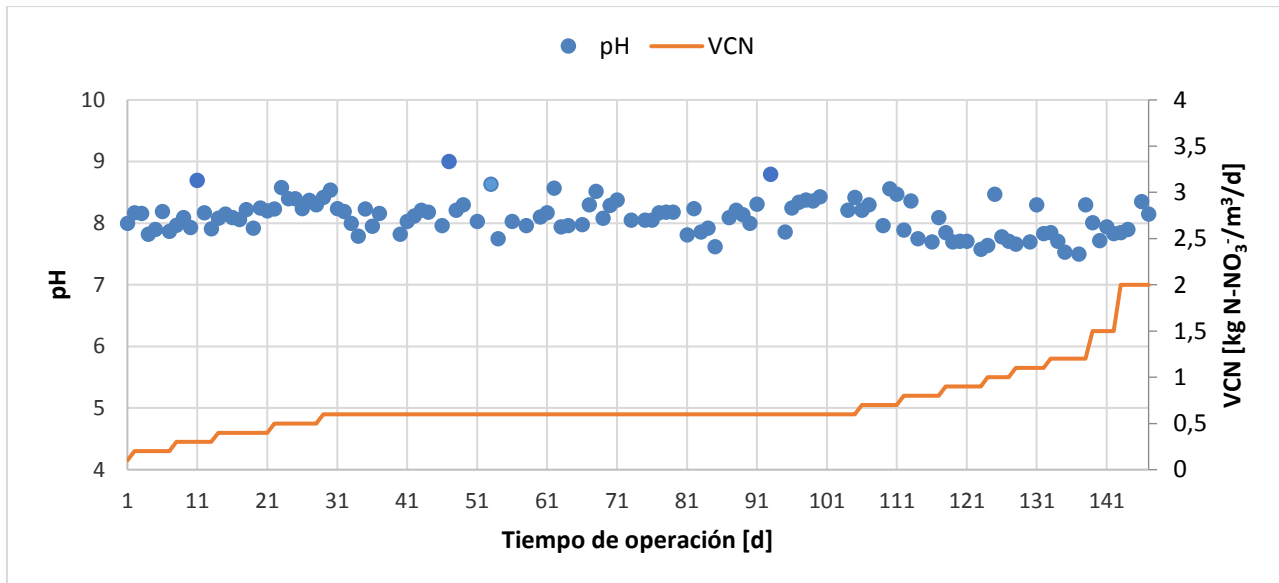


Figura 11: Comportamiento del pH del efluente con respecto a la VCN durante la operación del reactor

Durante la operación se observó que frente a cualquier alteración el pH tendía a aumentar, lo que se puede deber a la mayor estabilidad y adaptabilidad de las bacterias heterótrofas por sobre las autótrofas. Por lo tanto, la producción de protones se ve superada por la de hidroxilos alcalinizando el medio, como se explicó anteriormente. Debido a la tendencia al alza observada durante el primer mes de operación, el día 30 se realizó un cambio en la composición del agua residual sintética añadiendo KH_2PO_4 (Tabla 11) de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Harris, 2007) para formar un tampón de fosfato, controlar los cambios bruscos y mantener el pH en el rango deseado.

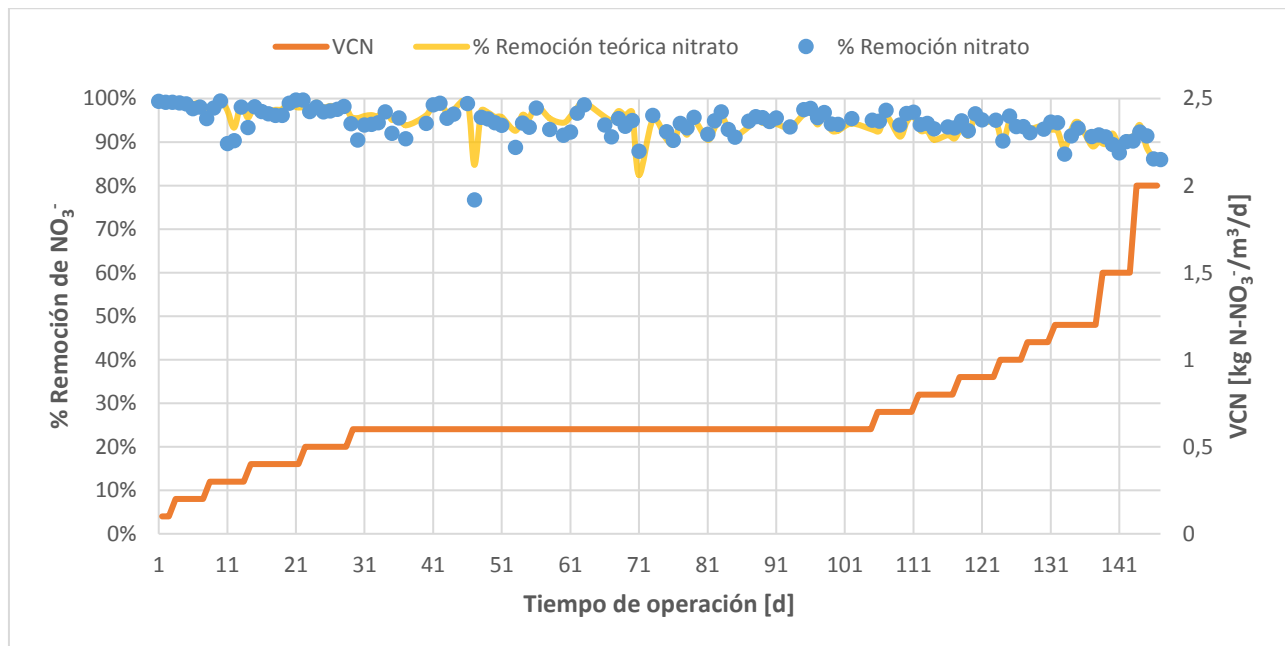
A pesar de que el sistema se mantuvo en el rango óptimo para llevar a cabo el proceso de SD, se observó que en cada cambio de VCN se producía un leve aumento del pH que era rápidamente estabilizado, pero no se percibió un aumento considerable en el tiempo.

En cuanto al pH del afluente el promedio registrado fue de 8,3. El reactor fue alimentado con RIL sintético, al cual no se le modificó la concentración de bicarbonato, ni se debió recurrir a otro tipo de medidas para el control del pH además del tampón de fosfato antes descrito.

4.2 NITRATO

La remoción de nitrato es uno de los principales objetivos de este estudio, por lo que este parámetro se midió diariamente tanto en el afluente como el efluente. Una vez obtenidos los resultados de las mediciones su remoción se calculaba inmediatamente para observar su evolución y de acuerdo a esto efectuar los cambios de VCN.

Las remociones obtenidas durante los 147 días de operación continua del UAF con respecto a las variaciones de la carga nitrogenada se muestran en la Figura 12. La alimentación de NO_3^- promedio fue de 645 [mg/L] actuando como reactivo limitante, equivalentes a 146 [mg/L] de N-NO_3^- para cumplir con la relación C/N establecida previamente. La remoción de nitrato fue en promedio de 94% y la máxima se alcanzó a VCN 0,4 [kg $\text{N-NO}_3^-/\text{m}^3/\text{d}$] con un 99,69%, manteniendo una eficiencia elevada en comparación al 99,91% alcanzado a VCN 0,02 [kg $\text{N-NO}_3^-/\text{m}^3/\text{d}$] durante la puesta en marcha (Moraga, 2016).



*Remoción teórica NO_3^- : cálculo con concentraciones experimentales del efluente con respecto a concentración teórica del afluente.

**Remoción nitrato: cálculo con datos experimentales tanto para del afluente como del efluente.

Figura 12: Remoción de nitrato con respecto a la VCN durante la operación del reactor UAF

La remoción de nitrato se ve afectada por el aumento de la VCN, experimentando una caída temporal luego de cada cambio. Este efecto se atribuye a la capacidad de la biomasa a adaptarse a la carga nitrogenada, pero su recuperación se aprecia inmediatamente en la siguiente medición. Los aumentos de VCN eran realizados cuando la remoción de nitrato se estabilizaba por al menos 5 TRH, llevándose a cabo un total 13 cambios. Además, se observa una tendencia a la disminución de la remoción a medida que aumenta la carga nitrogenada, donde en las últimas mediciones a VCN 2,0 [kg N-NO₃⁻/m³/d] se registró un promedio de 89%. Esto se debe a que a medida que se aumenta la carga mediante el incremento del caudal, el tiempo de residencia hidráulico disminuye. En este estudio se comenzó la operación con un TRH de 24,9 [h] y se terminó con 1,2 [h], sin observar una caída significativa de la eficiencia, lo que representa una tecnología estable.

El día 29 de operación se alcanzó una VCN de 0,6 [kg N-NO₃⁻/m³/d], la cual se mantuvo constante mientras se realizaban variaciones de la razón S/N. Se disminuyó el porcentaje en exceso de azufre de 60% a 35% y luego a 20%, sin que la remoción de NO₃⁻ se viese afectada.

Las reacciones de desnitrificación pueden simplificarse como: NO₃⁻ → NO₂⁻ → N₂. Para corroborar si la conversión se estaba llevando a cabo en su totalidad se midió la concentración de nitrito en el efluente. Su presencia indica que no todo el nitrato es transformado a nitrógeno gaseoso, con un promedio de 548 [μg/L] de NO₂⁻ generado durante la operación (0,17 [μg N-NO₂⁻/L]), que representa el 0,0001% del nitrógeno alimentado. Se observa una leve tendencia al aumento de la concentración de nitrito con el transcurso del tiempo, contraria a la disminución de la remoción de nitrato. Y aunque el nitrito representa un compuesto tóxico e inhibidor para la desnitrificación, las concentraciones de NO₂⁻ registradas se encuentran muy por debajo de las necesarias para que ocurra este fenómeno.

La concentración promedio de nitrito en el efluente corresponde a 0,17 [μg N-NO₂⁻/L] y la de nitrato a 34 [mg N-NO₃⁻/L], que en conjunto alcanzan un 5% del nitrógeno de la alimentación. Por lo tanto, de acuerdo al balance de N el 95% restante del nitrógeno alimentado (N-NO₃⁻) se convertiría a nitrógeno molecular como principal producto de la reacción y otros productos intermedios como NO y N₂O, que no fueron medidos.

La reducción del óxido nitroso (N₂O → N₂) es la etapa más lenta durante la reducción de NO₃⁻ a N₂ y también es fuertemente inhibida en la presencia de oxígeno, por lo que existe la probabilidad de acumulación de N₂O, gas que contribuye al efecto invernadero. Es por esto que es importante evitar la entrada de O₂ en el proceso. Además, el oxígeno al igual que el nitrato actúa como aceptor de electrones y en su presencia los microorganismos desnitrificantes (facultativos) prefieren el O₂, reduciendo su recuperación. Por lo tanto, se

prestó especial atención en mantener las condiciones anóxicas del sistema, el cual experimentó una fisura en una manguera que al ser identificada a tiempo y ser inmediatamente reemplazada, permitió que el sistema se recuperara rápidamente y continuara con su operación normal.

4.3 MATERIA ORGÁNICA

La fuente de carbono orgánico presente en el RIL sintético necesaria para que se lleve a cabo la desnitrificación heterótrofa corresponde a acetato de potasio (CH_3COOK) y la fuente de carbono inorgánica para la DA a bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Por lo tanto, se calculó la remoción de materia orgánica a través de la medición de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) tanto en el afluente como el efluente. Se midió la DQO total y no la soluble, ya que no se observaba turbiedad ni sólidos en suspensión a simple vista en la muestra y además durante la puesta en marcha se realizaron mediciones de DQO total y soluble para una misma muestra obteniéndose los mismos resultados.

En un comienzo se continuó con el método de medición utilizado durante la puesta en marcha correspondiente a espectrofotometría UV-VIS, pero como se puede observar en la Figura 13 los valores en un principio mostraban un comportamiento errático y la desviación entre los triplicados era significativa.

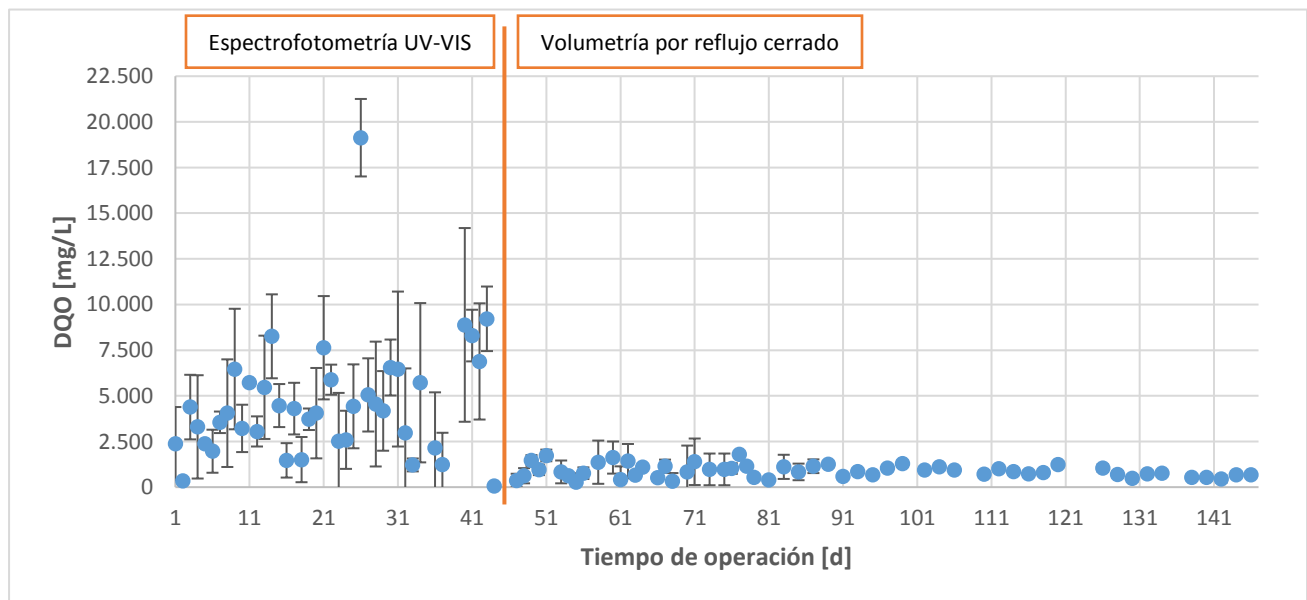


Figura 13: Valores de DQO del efluente registrados durante la operación del UAF mediante ambos métodos de medición

Por este motivo se decidió modificar el método de medición por volumetría por reflujo cerrado a partir del día 47 de operación y como se puede observar el comportamiento de los datos obtenidos cambió significativamente. Lo mismo se percibió para las mediciones de DQO del afluente.

En la Figura 14 se muestra la degradación de la materia orgánica con respecto a la variación de la VCN, con un promedio de 31% hasta el día 46 y un promedio de 51% luego del cambio de método, alcanzando un máximo de remoción de 92,66% a VCN 0,6 [kg N-NO₃⁻/m³/d].

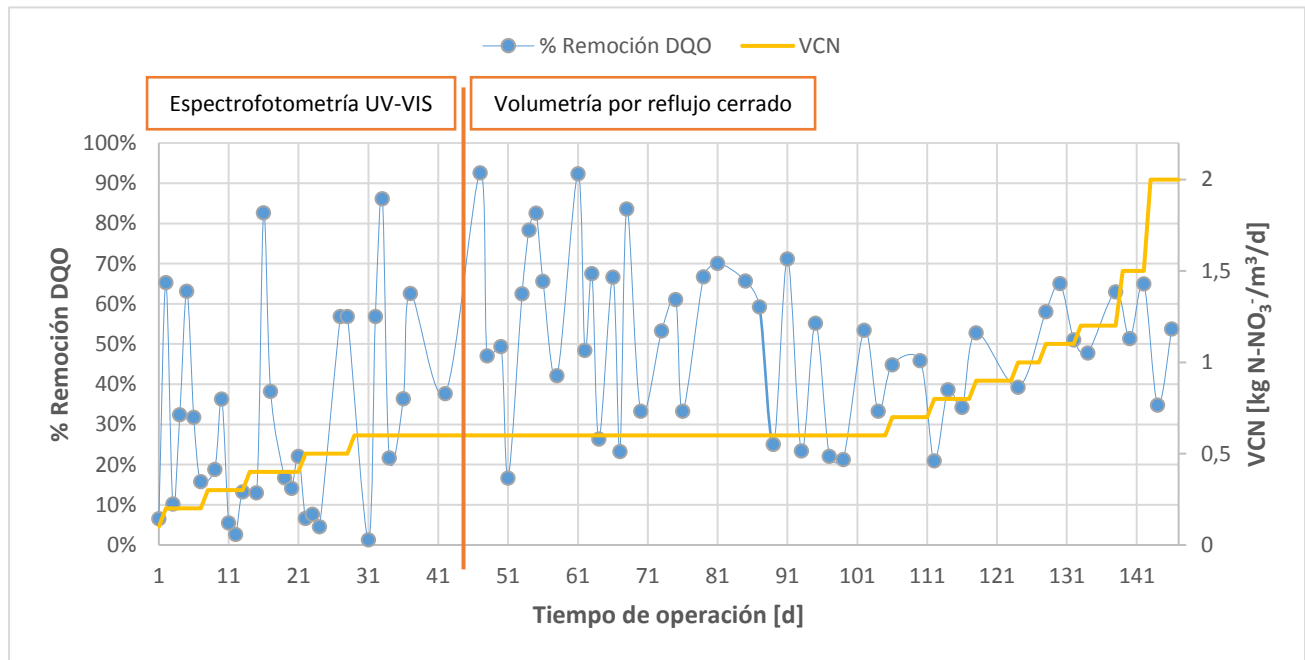


Figura 14: Remoción de DQO con respecto a la variación de la VCN durante la operación del reactor

A pesar de que la remoción máxima alcanzada es alta, no permanece constante y existe una gran brecha entre esta y el promedio. Además, su comportamiento a VCN constante de 0,6 [kg N-NO₃⁻/m³/d] indica que las fluctuaciones no se deben únicamente a lo susceptibles que pueden ser las bacterias heterótrofas frente a cambios de carga nitrogenada. Una posible explicación es el arrastre de materia orgánica correspondiente a bacterias muertas que no alcanzaron a ser degradadas por otras hacia el efluente, cuyo aporte no es constante y puede influir en la variación de las mediciones de DQO en la descarga y por ende en la remoción. Fenómeno que se incrementa a medida que aumenta el caudal y disminuye el TRH, por lo que no fue detectado durante la puesta en marcha. Por lo tanto, se recomienda la filtración de las muestras obtenidas del efluente, para la medición de la DQO soluble en vez de la total y la eliminación de posibles interferencias.

Por otra parte, producto de la incertidumbre acerca de la remoción de materia orgánica, se realizaron también mediciones de acetato a través del método de cromatografía de supresión iónica, para lo cual las muestras fueron filtradas con membranas de 0,45 [µm] y luego ultracongeladas para su análisis. Los resultados se muestran en la Figura 15, donde se puede observar un comportamiento significativamente más constante en los datos, con una concentración promedio del efluente de 133 [ppm] y correspondiente a un 88% de remoción, que fluctúa entre un mínimo de 77,36% y un máximo de 94,39%. Esto demuestra que las bajas remociones presentadas anteriormente se pueden deber a errores de medición y no a una baja actividad de las bacterias heterótrofas.

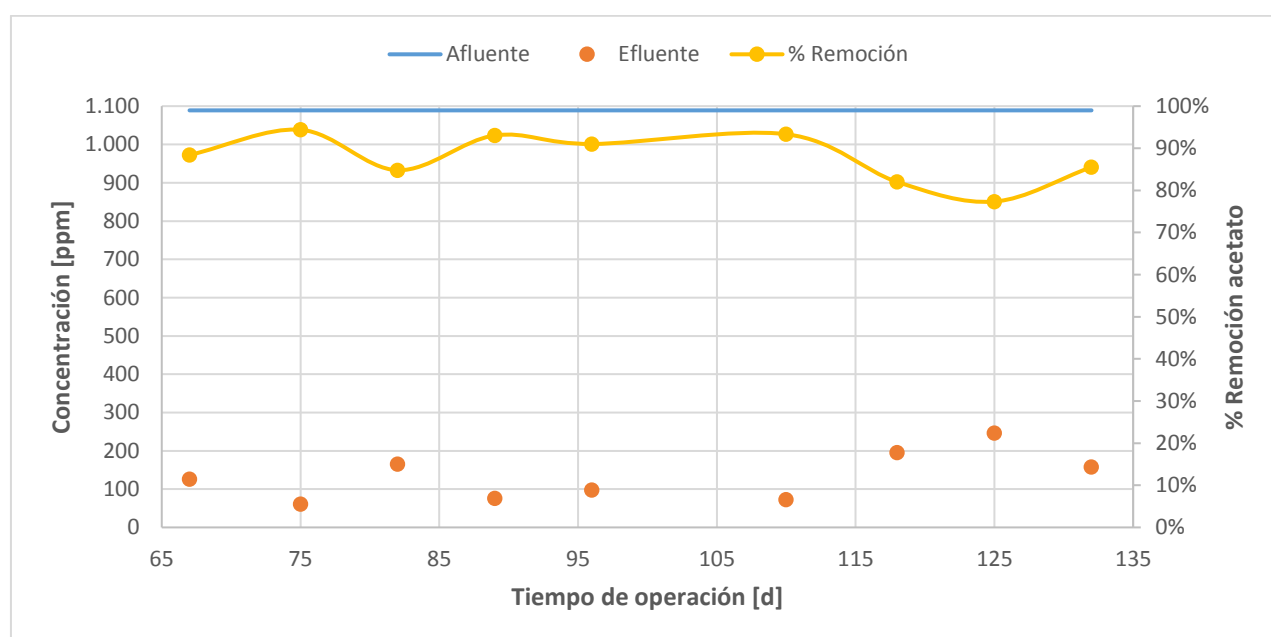


Figura 15: Concentración acetato en el afluente y efluente junto a su remoción

En cuanto a posibles inhibiciones, la materia orgánica no tiene efecto inhibitorio sobre el proceso, pero si afecta la oxidación de compuestos de azufre disminuyendo la formación de sulfato (Kim y Son, 2000; Oh et al., 2002).

4.4 COMPUESTOS DE AZUFRE

Esta corresponde a la parte más compleja de la investigación, ya que a diferencia del nitrato que es degradado por ambos tipos de bacterias (autótrofas y heterótrofas), el azufre es utilizado como sustrato solo por las autótrofas que no tienen la misma capacidad de adaptabilidad que las heterótrofas. Como se mencionó anteriormente, la fuente de azufre contenida en el agua residual sintética corresponde a tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), el

cual actúa como donador de electrones en la DA para obtener como producto sulfato (SO_4^{2-}). Ambos parámetros, tanto el tiosulfato como el sulfato, fueron medidos en el afluente y efluente.

La Figura 16 muestra los porcentajes de remoción de tiosulfato obtenidos durante toda la operación del UAF con respecto a las variaciones de la relación S/N. La operación del reactor comenzó con una razón S/N [g/g] de 4,6 que corresponde a un 60% en exceso de azufre, razón óptima encontrada por Muñoz (2015) y utilizada durante la puesta en marcha (Moraga, 2016). Con esta relación se obtuvo un promedio de remoción de tiosulfato de 23% con una alimentación de 1.174,41 [$\text{mg S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{L}$] y una concentración promedio en el efluente de 901 [$\text{mg S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{L}$], alcanzando un máximo de 50,37% de remoción.

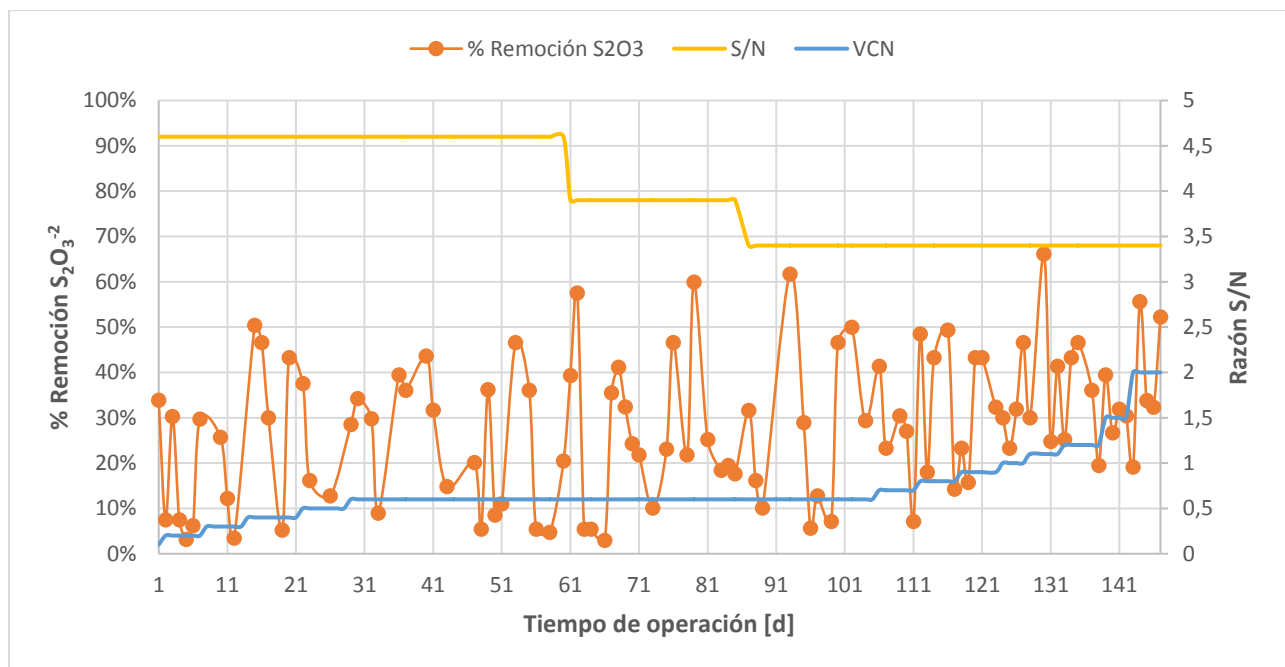


Figura 16: Remoción de tiosulfato con respecto a la variación de la VCN y la razón S/N durante la operación del reactor

Luego se realizaron variaciones de la razón S/N con el objetivo de mejorar la remoción de tiosulfato. Estudios anteriores indican que la relación óptima para llevar a cabo la desnitrificación autótrofa a partir de nitrato es cercana a la estequiometría (Cardoso *et al.*, 2006), la que corresponde a 2,9 [g S/g N], mientras que otros estudios muestran que cuanto la relación S/N es mayor a la estequiométrica la conversión a sulfato decae debido a la formación de compuestos de azufre menos oxidados como el azufre elemental o el sulfito (An *et al.*, 2010). Por otro lado, Aguirre (2014) quien trabajó con razones inferiores a la estequiométrica alcanzó un remoción máxima de 32,5% de tiosulfato, mientras que Peirano (2016) propone como óptimo para la desnitrificación simultánea el rango entre 3,7 y 4,1 [g S/g N] (C/N=1,05 y H/A=0,37).

Por lo tanto, se realizan dos modificaciones disminuyendo el porcentaje en exceso de azufre a 35% y 20% a una VCN constante de 0,6 [kg N-NO₃⁻/m³/d] entre los días 29 y 105 de operación, siempre trabajando sobre la razón estequiométrica. El resumen de los cambios realizados y los resultados obtenidos se encuentra en la Tabla 18.

Tabla 18: Remoción de tiosulfato y generación de sulfato para las diferentes razones S/N estudiadas

DÍAS DE OPERACIÓN	RAZÓN S/N	% EXCESO AZUFRE	% REMOCIÓN S ₂ O ₃ ⁻²		CONCENTRACIÓN SO ₄ ⁻² [mg/L]	
			Promedio	Máxima	Promedio	Máxima
29 - 60	4,6	60%	24,28%	46,60%	900,126	2.082,284
61 - 86	3,9	35%	27,21%	59,92%	784,896	2.299,052
87 - 105	3,4	20%	27,25%	61,71%	923,742	2.446,392

La razón a la cual se obtuvieron mejores resultados para esta VCN corresponde a la con menor porcentaje en exceso, 3,4 [g S/s N], con un promedio de 27% y alcanzando una remoción máxima de 61,71%. Se continúa operando con esta relación S/N constante y se comienza a aumentar la VCN nuevamente, alcanzando la remoción máxima de tiosulfato a VCN 1,1 [kg N-NO₃⁻/m³/d] con un 66,15%.

A pesar del aumento experimentado, el promedio de remoción de S₂O₃⁻² se mantiene bajo con un 28%, esto se puede deber a la alta relación C/N utilizada (C/N=3,0), porque cuando existe exceso de acetato las bacterias desnitrificantes heterótrofas tienden a dominar a las autótrofas (Chen *et al.*, 2008). El crecimiento equilibrado de ambos grupos de bacterias en el reactor no es fácil de mantener, debido a las tasas de crecimiento muy diferentes (Show *et al.*, 2013).

Por otra parte, el sulfato es un producto esperado del proceso y las concentraciones obtenidas durante la operación del reactor se indican en la Figura 17.

Las mediciones al igual que las de tiosulfato son bastante variables, con un promedio de 714 [mg SO₄⁻²/L] y un máximo de 2.446,392 [mg SO₄⁻²/L], que corresponden a 238 [mg S-SO₄⁻²/L] y 816,483 [mg S-SO₄⁻²/L] respectivamente. Pero a pesar de esto en la Tabla 18 se observa que la razón S/N 3,4 no solo presenta los valores más elevados para la remoción de tiosulfato, sino también lo más elevados en la generación de sulfato, lo que coincide con la tendencia esperada.

Se ha reportado la inhibición parcial de las BDA a concentraciones de 500 [mg S-SO₄⁻²/L] (Campos *et al.*, 2009), valor que es superado en algunas ocasiones durante la operación, sin embargo no se percibe el efecto en la remoción de nitrato.

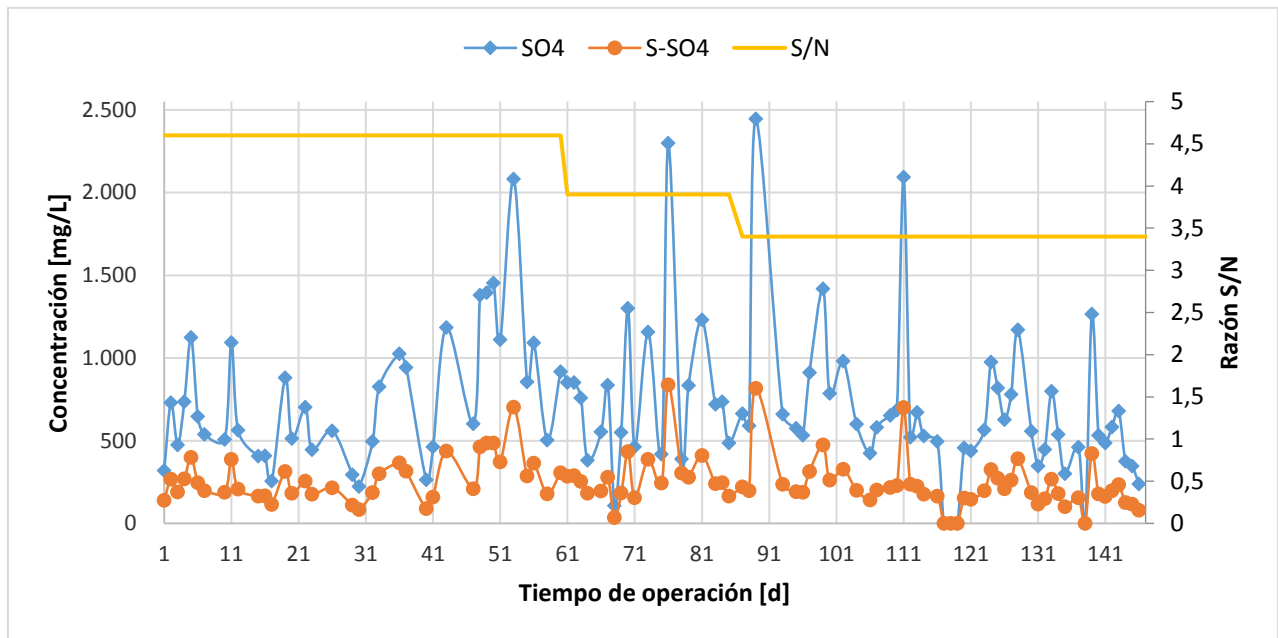


Figura 17: Concentración de SO_4^{2-} y $S-SO_4^{2-}$ en [mg/L] en el efluente con respecto a la razón S/N durante la operación

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La operación continua del reactor UAF bajo condiciones anóxicas y utilizando Ril sintético se logró realizar con éxito durante 147 días, manteniendo una temperatura y pH adecuados. Se corroboró experimentalmente que existen condiciones que permiten la coexistencia de microorganismos desnitrificantes autótrofos y heterótrofos, permitiendo llevar a cabo la desnitrificación simultánea en el reactor.

Este tipo de reactores con biomasa adherida son relativamente sencillos de mantener y la zeolita chilena resultó ser un buen soporte microbiano, ya que su estructura porosa permite una buena adherencia de las bacterias permitiendo alcanzar altas velocidades de carga nitrogenada.

Se logró la remoción conjunta de los compuestos deseados con un máximo de remoción de nitrato de 99,69% a VCN 0,4 [kg N-NO₃/m³/d], de acetato de 94,39% a VCN 0,6 [kg N-NO₃/m³/d] y de tiosulfato de 66,15% a VCN 1,1 [kg N-NO₃/m³/d].

La remoción de nitrato se mantuvo alta durante toda la operación, con un promedio de 94%. Además, se obtuvieron buenas remociones a altas cargas nitrogenadas y bajos tiempos de residencia, alcanzando un 89% de remoción de nitrato a VCN de 2,0 [kg N-NO₃/m³/d] (máxima VCN operada) y TRH de 1,25 [h], lo que representa una tecnología estable.

La remoción de tiosulfato se mantuvo baja con un promedio de 28%, por lo que merece especial atención. Se modificó la razón S/N a VCN constante de 0,6 [kg N-NO₃/m³/d], obteniendo mejores resultados a medida que se disminuía el porcentaje en exceso. La mayor remoción de tiosulfato y mayor producción de sulfato se obtuvieron para una razón S/N de 3,4 [g S/g N], 20% en exceso de S.

La VCN recomendada para la remoción conjunta de estos tres compuestos de acuerdo a los datos obtenidos es de 0,6 [kg N-NO₃/m³/d], a la cual se alcanzaron remociones de 98,99% para el nitrato, 94,39% para el acetato y 61,71% para el tiosulfato.

Por lo tanto, se puede concluir que las condiciones proporcionadas en el reactor hacen posible la coexistencia de ambos tipos de microorganismos, convirtiéndola en una opción viable para el tratamiento de Riles con nitrato, tiosulfato y acetato. Pero inevitablemente unas bacterias se ven más favorecidos que otras y en este caso la desnitrificación simultánea se llevó a cabo mayormente vía desnitrificación heterótrofa que autótrofa.

5.2 Recomendaciones

De acuerdo a lo observado durante el estudio y a los resultados obtenidos se realizan las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones:

- ✓ Realizar mediciones en el efluente de productos intermediarios de las reacciones de nitrato y tiosulfato para poder realizar los balances correspondientes.
- ✓ Revisar y modificar el diseño del reactor para poder efectuar la toma de muestras gaseosas, ya que por problemas de presión al intentar sacar muestras para el análisis del gas con bolsas Tedlar estas se llenaban con agua.
- ✓ Continuar con el método de medición de acetato que resulta más certero y realizar mediciones de DQO soluble en lugar de total, ya que a medida que el caudal aumenta arrastra materia orgánica que interfiere en las mediciones.
- ✓ Cambiar de método o bien mejorar la técnica utilizada para la medición de tiosulfato, dado que los valores obtenidos son muy variables y sujetos a errores de medición, lo que puede afectar la representatividad de los datos.
- ✓ Buscar una nueva VCN óptima para la remoción de nitrato a una razón S/N con menor exceso de azufre y más cercana a la estequiométrica, comenzando por la óptima encontrada en la presente investigación: 3,4 [g S/s N].
- ✓ Buscar una relación C/N menor a 3,0 que permita el equilibrio entre las bacterias autótrofas y heterótrofas, para así aumentar la remoción de azufre sin perjudicar la de materia orgánica. O bien, cambiar la razón H/A aumentando la cantidad de bacterias autótrofas.

CAPÍTULO 6: REFERENCIAS

- Aguirre, J. P. (2014). Diseño y puesta en marcha de un reactor UASB híbrido para la desnitrificación simultánea autótrofa y heterótrofa. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Ambiental y al grado académico de Magíster en Ciencias de la Ingeniería Química, UTFSM, Valparaíso, Chile.
- An, S., Tang, K., Nemati, M. (2010). Simultaneous biodesulphurization and denitrification using an oil reservoir microbial culture: Effects of sulphide loading rate and sulphide to nitrate loading ratio. *Water Research*, 44(5), 1531–1541.
- APHA. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC: APHA, AWWA, WEF.
- Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (2016). Recuperado en noviembre del 2016, de: www.leychile.cl
- Borkenstein, C. G., Fischer, U. (2006). Sulfide removal and elemental sulfur recycling from a sulfide-polluted medium by *Allochrochromatium vinosum* strain 21D. *International Microbiology*.
- Campos, J. L., Carvalho, S., Portela, R., Mosquera-Corral, A., Méndez, R. (2008). Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. *Bioresource Technology*, 99(5), 1293–1299.
- Campos, J. L., Fernández, I., Fajardo, C., Seca, I., Pampín, R. (2009). Procesos avanzados de eliminación de nitrógeno : nitrificación parcial , Anammox , desnitrificación autótrofa.
- Cardoso, R. B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E. R., Gomez, J., Field, J. A. (2006). Sulfide Oxidation Under Chemolithoautotrophic Denitrifying Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 148–1157.
- Chen, C., Ren, N., Wang, A., Yu, Z., Lee, D. J. (2008). Simultaneous biological removal of sulfur, nitrogen and carbon using EGSB reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), 1057–1063.
- Chesworth, W. (2007). Encyclopedia of Soil Science. encyclopedia of Earth Sciences Series, University of Canada. *Springer*.
- Ciudad, G. (2007). Nitrificación-desnitrificación vía nitrito en reactores de discos rotatorios bajo dos modalidades de operación: continua y secuenciada. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de La Frontera.
- Claus, G., Kutzner, H. J. (1985). Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 283–288.
- Espinoza, J., Revah, S., Le Borgne, S. (2010). Rutas Metabólicas De Oxidación Del Azufre En Bacterias Quimiolitioautótrofas , Relevancia Ambiental Y Biotecnología. *Mensaje Bioquímico*, XXXIV, 101–120.
- Fajardo, C., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L., Méndez, R. (2008). Depuración conjunta de aguas ricas en nitratos y efluentes con compuestos reducidos del azufre. *Retema, Revista Técnica de Medio Ambiente*

- (127), 38-51.
- Fajardo, C. (2011). Autotrophic denitrification for treatment of wastewater with high concentration of sulphur and nitrogen compounds. Memoria para optar al grado de Doctor de Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Fdz-Polanco, F., Fdz-Polanco, M., Garcia, P. A., Villaverde, S., Uruen, M. A. (2001). New process for simultaneous removal of nitrogen and sulphur under anaerobic conditions. *Water Research*, 35(4), 1111–1114.
- Gadekar, S., Nemati, M., Hill, G. A. (2006). Batch and continuous biooxidation of sulphide by *Thiomicrospira* sp. CVO: Reaction kinetics and stoichiometry. *Water Research*, 40(12), 2436–2446.
- Garrido, P. (2016). Operación de reactor anaerobio de lecho fijo de flujo ascendente para desnitrificación autótrofa a partir de nitrito. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Ambiental, UTFSM, Valparaíso, Chile.
- Gee, C. S., Kim, J. S. (2004). Nitrite accumulation followed by denitrification using sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 49(5–6), 47–55.
- Gommers, P., Bijleveld, W., Gijs, J. (1988). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor. *Water Research*, 1075–1083.
- Gu, J. D., Qiu, W., Koenig, A., Fan, Y. (2004). Nitrate removal from saline water through autotrophic denitrification by the bacterium *Thiobacillus denitrificans* MP-1. *Water Science and Technology*, 49(5–6), 105–112.
- Guerrero, L., Aguirre, J., Barahona, A., Huiliñir, C., Montalvo, S. (2016). Eliminación de nitrato, azufre y materia orgánica compleja mediante desnitrificación simultánea autótrofa y heterótrofa, 67–75.
- Harris, D. (2007). Análisis químico cuantitativo (sexta edición). *Reverté*.
- Harrison, J. A. (2003). The Nitrogen Cycle Of Microbes and Men. *Visionlearning*, 2–7.
- Hernández. (2014). Diseño y puesta en marcha de un filtro anaerobio para la desnitrificación autótrofa a partir de nitrato. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Ambiental, UTFSM, Valparaíso, Chile.
- Janssen, A. J., Ruitenberg, R., Buisman, C. J. (2001). Industrial applications of new sulphur biotechnology. *Water Sci. Technol.*, 44(8), 85–90.
- Jeria, D. (2016). Puesta en marcha de un reactor EGSB para la desnitrificación autótrofa-heterótrofa simultánea, eliminación de nitrógeno azufre y materia orgánica. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico, UTFSM, Valparaíso, Chile.
- Kämpfer, P., Denger, K., Cook, A. M., Lee, S. T., Jäckel, U., Denner, E. B. M., Busse, H. J. (2006). *Castellaniella* gen. nov., to accommodate the phylogenetic lineage of *Alcaligenes defragrans*, and proposal of *Castellaniella defragrans* gen. nov., comb. nov. and *Castellaniella denitrificans* sp. nov. *International*

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(4), 815–819.
- Karanasios, K. A., Vasiliadou, I. A., Pavlou, S., Vayenas, D. V. (2010). Hydrogenotrophic denitrification of potable water: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1–3), 20–37.
- Khin, T., Annachhatre, A. P. (2004). Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*, 22(7), 519–532.
- Kim, I. S., Son, J. H. (2000). Impact of COD/N/S ratio on denitrification by the mixed cultures of sulfate reducing bacteria and sulfur denitrifying bacteria. *Water Science and Technology*.
- Kimura, K., Nakamura, M., Watanabe, Y. (2002). Nitrate removal by a combination of elemental sulfur-based denitrification and membrane filtration. *Water Research*, 36(7), 1758–1766.
- Lens, P. N. L., Kuenen, J. G. (2001). The biological sulfur cycle: Novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*, 44(8), 57–66.
- Li, W., Zhao, Q. liang, Liu, H. (2009). Sulfide removal by simultaneous autotrophic and heterotrophic desulfurization-denitrification process. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2–3), 848–853.
- Liu, F., Huang, G., Fallowfield, H., Guan, H., Zhu, L., Hu, H. (2014). Study on Heterotrophic-Autotrophic Denitrification Permeable Reactive Barriers (HAD PRBs) for In Situ Groundwater Remediation. *Water Science and Technology*, 27-60.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. (2006). Brock Biology of Microorganisms (11 th edit).
- Metcalf, Eddy. (1998). Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento vertido y reutilización. (tercera edición). *Mc Graw--Hill*.
- Ministerio del Medio Ambiente (MMA) (2016). recuperado en noviembre del 2016, de: www.mma.gob.cl
- Montalvo, S., Guerrero, L. (2003). Tratamiento anaerobio de residuos (1era edición). Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.
- Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., Angeles de la la Rubia, M. (2012). Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. *Applied Clay Science*, 58, 125–133.
- Moon, H. S., Ahn, K. H., Lee, S., Nam, K., Kim, J. Y. (2004). Use of autotrophic sulfur-oxidizers to remove nitrate from bank filtrate in a permeable reactive barrier system. *Environmental Pollution*, 129(3), 499–507.
- Moraes, B. S., Foresti, E. (2012). Determination of the intrinsic kinetic parameters of sulfide-oxidizing autotrophic denitrification in differential reactors containing immobilized biomass. *Bioresource Technology*, 104, 250–256.
- Moraga, S. (2016). Puesta en marcha de un reactor anaerobio de lecho fijo con flujo ascendente para remover azufre, nitrato y materia orgánica a través de la desnitrificación simultánea. Memoria para optar al título

- de Ingeniero Civil Ambiental, UTFSM, Valparaíso, Chile.
- Muñoz, C. (2015). Operación de un reactor anaerobio de lecho fijo desnitrificante autótrofo para la remoción simultánea de azufre y nitrógeno a partir de nitrato. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Ambiental, UTFSM, Valparaíso, Chile.
- Navarro, J. (2008). Diseño , construcción y evaluación de filtros anaerobios de flujo ascendente para el tratamiento de las aguas residuales provenientes de la lavandería y del casino en el campamento Payoa de Petrosantander (Colombia) Inc, 53.
- Offre, P., Spang, A., Schleper, C. (2013). Archaea in biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67, 437–57.
- Oh, S.-E., Kim, K.-S., Choi, H.-C., Cho, J., Kim, I. S. (2000). Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulfur bacteria, 59–68.
- Oh, S. E., Bum, M. S., Yoo, Y. B., Zubair, A., Kim, I. S. (2002). Nitrate removal by simultaneous sulfur utilizing autotrophic and heterotrophic denitrification under different organics and alkalinity conditions: Batch experiments. *Water Science and Technology*, 47(1), 237–244.
- Peirano, C. (2016). Remoción biológica de azufre , nitrógeno y carbono mediante desnitrificación autótrofa-heterótrofa simultánea. Tesis para optar al grado académico de Magister en Ciencias de la Ingeniería Química, UTFSM, Valparaíso, Chile.
- Perez, J. (1998). Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis para optar al grado de Magíster en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México.
- Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E., Gomez, J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*, 38(14–15), 3313–3321.
- Rivera, P., & Barahona, A. (2016). Protocolos de trabajo Laboratorio de Riles. Laboratorio de tratamiento de Riles, Universidad Técnica Federico Santa María.
- Robertson, L., Kuenen, G. (1992). Nitrogen removal from water and waste. Kluwer Laboratory for Biotechnology, Delft University of Technology, The Netherlands.
- Rodríguez, P. (2016). Puesta en marcha y operación de un reactor UASBF híbrido para desnitrificación simultánea autótrofa y heterótrofa. Memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico, UTFSM, Valparaíso, Chile.
- Sánchez, J., Sanabria, J. (2009). Metabolismos microbianos involucrados en procesos avanzados para la remoción de Nitrógeno , una revisión prospectiva. *Rev. Colomb. Biotecnol.*
- Servicio de Evaluación Ambiental (SEA) (2016). Recuperado en noviembre de 2016, de: www.sea.gob.cl
- Show, K. Y., Lee, D. J., Pan, X. (2013). Simultaneous biological removal of nitrogen-sulfur-carbon: Recent

- advances and challenges. *Biotechnology Advances*, 31(4), 409–420.
- Sistema Nacional de Información Ambiental (SINIA) (2016). Recuperado en noviembre del 2016, de: www.sinia.cl
- Syed, M., Soreanu, G., Falletta, P., Beland, M. (2006). Removal of hydrogen sulfide from gas streams using biological processes - A review. *Canadian Biosystems Engineering*, 48(2.1-2.14), 2.1-2.14.
- Tandukar, M., Pavlostathis, S. G., Cervantes, F. J. (2009). Autotrophic denitrification for the removal of nitrogenous and sulphurous contaminants from wastewaters. *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution* (pp. 319–365). IWA, London.
- Tang, K., An, S., Nemati, M. (2010). Evaluation of autotrophic and heterotrophic processes in biofilm reactors used for removal of sulphide, nitrate and COD. *Bioresource Technology*, 101(21), 8109–8118.
- Torrentó, C., Cama, J., Urmeneta, J., Otero, N., Soler, A. (2010). Denitrification of groundwater with pyrite and *Thiobacillus denitrificans*. *Chemical Geology*, 278(1–2), 80–91.
- Volokita, M., Belkin, S., Abeliovich, A., Soares, M. I. M. (1996). Biological denitrification of drinking water using newspaper. *Water Research*, 30(4), 965–971.
- Yamamoto-Ikemoto, R., Komori, T., Nomura, M., Ide, Y., Matsukami, T. (2000). Nitrogen removal from hydroponic culture wastewater by autotrophic denitrification using thiosulfate. *Water Science and Technology*.

ANEXOS

A. CURVA CALIBRACIÓN BOMBA DE ALIMENTACIÓN

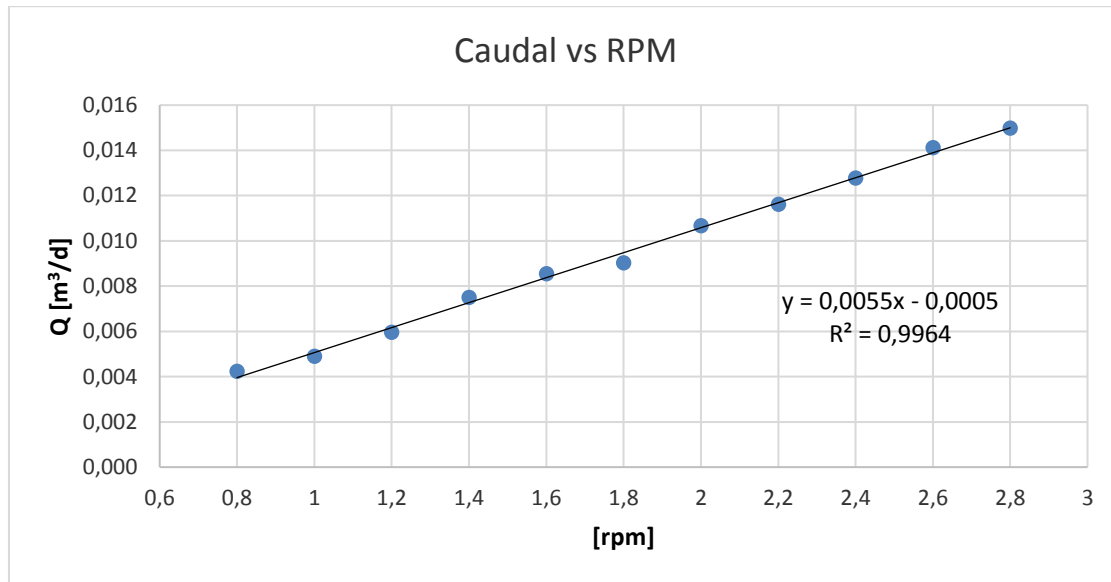


Figura 18: Curva de calibración de la bomba de alimentación

B. NITRATO: ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

(APHA, 2012; Rivera y Barahona, 2016)

El nitrato presente tanto en la alimentación como en el efluente fue determinado mediante el espectrofotómetro presente en el laboratorio, mediante el cual se mide su absorbancia con luz ultravioleta. La longitud de onda utilizada para determinar el nitrato en aguas que presentan baja carga orgánica es de 220 nm, ya que la materia orgánica no absorbe a esa magnitud, luego ese valor es corregido por otra medición a 275 nm, dado que a esa longitud absorbe solo la materia orgánica y no el nitrato. En este caso se realizó una pequeña modificación de acuerdo a lo descrito por la metodología estándar, registrándose a 205 nm en vez de a 220 nm, para evitar las interferencias del tiosulfato.

A 50 ml de muestra se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico 1 N para eliminar posibles interferencias, se mezcla y se mide en celdas de cuarzo frente a un blanco, el cual es preparado solo con agua destilada y HCl. La curva de calibración verifica la ley de *Lambert-Beer* hasta 1 [mg N/L]. Por lo tanto, para que las muestras se encuentren dentro de la curva fue necesario considerar diluciones, correspondientes a 0,1:50 para la alimentación y 1:50 para el efluente.

Equipos y materiales:

- Espectrofotómetro UV-VIS.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Material de uso común en laboratorio.

Reactivos:

- Agua destilada o desionizada (exenta de nitrato).
- Ácido Clorhídrico (HCl) 1 N.
- Solución patrón NO_3^- (1000 mg/L) o Nitrato de Potasio (KNO)

Curva de calibración:

Para realizar la curva de calibración del espectrofotómetro para el nitrato es necesario preparar una solución stock de nitratos. Se pipetea 1 mL de la solución patrón de NO_3^- y se afora a 100 mL, si no se cuenta con solución patrón se debe secar nitrato de potasio (KNO_3) en el horno a 105°C durante 24 horas, luego se disuelven 0,7218 g en agua y se diluye a 1 L (concentración = 10 mg/L).

A continuación, se toman 100 mL de la solución anterior y se diluyen a 1 L de agua destilada para obtener la solución intermedia de nitratos. Finalmente, mediante volúmenes conocidos de esta solución se preparan los estándares de calibrado en un rango de 0 a 7 [mg N- NO_3^- /L] y se miden en el espectrofotómetro frente a un blanco al igual que las muestras (1 mL=100 microgramos N- NO_3^-).

Se recomienda el análisis de inmediato de las muestras, de lo contrario congelar no más de 4 días.

C. NITRITO: ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

(APHA, 2012; Rivera y Barahona, 2016)

El nitrito presente en la descarga fue determinado mediante el espectrofotómetro presente en el laboratorio, mediante el cual se mide su absorbancia. Se fundamenta en base a la formación de un colorante azo purpura rojizo, el cual se produce en un pH ácido por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con N-(1-Naftil)-etilendiamina dihidroclorada (diclorhidrato de NED).

El rango de aplicación de este método va desde los 10 a 1000 [$\mu\text{g}/\text{L}$] y la longitud adecuada para su determinación es a 543 nm.

A 50 mL de muestra se le agregan 2 mL de reactivo de color (reactivo de NED), se mezcla y se deja actuar por 10 minutos. Luego se mide en celdas de 1 cm de paso óptico frente a un blanco, el cual es preparado reemplazando la muestra por agua destilada. El sistema de color obedece la ley de *Lambert-Beer* hasta 180 $[\mu\text{g/L}]$. Por lo tanto, para que las muestras se encuentren dentro de la curva es necesario considerar diluciones, en este caso 3:25.

Equipos y materiales:

- Espectrofotómetro UV-VIS.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Material de uso común en laboratorio.

Reactivos:

- Agua destilada o desionizada (exenta de nitrito).
- Ácido fosfórico (H_3PO_4)
- Sulfanilamida
- Permanganato de potasio (KMnO_4)
- N-(1-Naftil)- etilendiamina dihidroclorada
- Solución patrón NO_2^-

Preparación del reactivo:

Para la preparación del reactivo de color se disuelven 100 mL de ácido fosfórico al 85% en 800 mL de agua destilada y se agregan 10 gramos de sulfanilamida, una vez disuelto completamente se agrega 1 g de N-(1-Naftil)-etilendiamina dihidroclorada y se afora a 1 litro.

Curva de calibración:

Para realizar la curva de calibración del espectrofotómetro para el nitrito es necesario preparar una solución stock de nitrito, para la cual se pipetea 0,1 mL de la solución patrón de NO_2^- (1000 mg/L) y se afora a 500 mL, con lo que se obtiene una solución con concentración de 200 $[\mu\text{g/L}]$ (preparar en el momento). En caso de no contar con solución patrón, se disuelven 1,232 g de NaNO_2 (1 mL=250 μg), previamente secado a 105°C por una hora, al menos y después 20 minutos en desecador y ser retrovalorado con permanganato de potasio. Aforar a 1000 mL.

Se recomienda analizar dentro de un plazo máximo de 48 horas para prevenir la conversión bacteriana de nitrito a nitrato, refrigerada a 4°C, de lo contrario congelar no más allá de 1-2 días.

D. DQO: ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS / VOLUMETRÍA POR REFLUJO CERRADO

(APHA, 2012; Rivera y Barahona, 2016)

La demanda química de oxígeno (DQO) se define como la cantidad de un oxidante específico que reacciona con la muestra bajo condiciones controladas, esta cantidad se expresa en términos de su equivalencia en oxígeno.

El procedimiento consiste en agregar en un tubo de DQO 1,5 mL de solución digestora y posteriormente 3,5 mL de solución catalítica, la cual debe ser agregada cuidadosamente por las paredes del tubo para evitar su mezcla y lograr observar la separación de fases. Luego se agregan 2,5 mL de muestra, en este caso se utilizó una dilución de 2:50 tanto para la alimentación como para la descarga, ya que para valores de DQO sobre 900 ppm es necesario la dilución de la muestra. Además, se realizan blancos para compararlos con los tubos digeridos, a los cuales en vez de muestra se les agrega 2,5 mL de agua destilada. Se sellan los tubos con teflón, se cierran herméticamente con las tapas, se agitan y se colocan en un digestor previamente calentado a 150°C por 2 horas, transcurrido ese tiempo se dejan enfriar a temperatura ambiente. Para la DQO soluble es el mismo procedimiento, pero se debe filtrar la muestra previamente.

Por sus propiedades químicas, el oxidante utilizado es dicromato. Cuando una muestra es digerida, el ion dicromato oxida la materia orgánica presente en la muestra, esto resulta en un cambio del cromo en estado hexavalente (Cr^{+6}) a un estado trivalente (Cr^{+3}).

Para la conservación y almacenamiento de las muestras si aún no se ha realizado la digestión se recomienda refrigerar la muestra previa acidificación con unas gotas de ácido sulfúrico concentrado (duración máxima de 5 días entre 2 a 5°C), de lo contrario congelar sin acidificar. Para el caso en que se haya realizado la digestión se puede mantener refrigerada hasta un máximo de 4 semanas.

Solución digestora:

Se disuelven en 500 mL de agua destilada: 10,216 g de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) previamente secado por 2 horas a 105°C, 167 mL de ácido sulfúrico concentrado y 33,3 g de sulfato de mercurio (HgSO_4). Dejar enfriar y aforar.

Solución catalítica:

Se disuelven en 1 L de ácido sulfúrico 10,7 g de sulfato de plata (AgSO_4), agitar por 48 horas.

D.1. Espectrofotometría UV-VIS (Rivera y Barahona, 2016)

Equipos y materiales:

- Tubos digestores.
- Digestor (150°C)
- Espectrofotómetro UV-VIS.
- Celdas plásticas de 1 cm de paso óptico.
- Material de uso común en laboratorio.

Reactivos:

- Agua destilada o desionizada (exenta de nitrito).
- Solución catalítica.
- Solución digestora.

Se prepara una solución patrón de DQO, para lo cual se disuelven 0,1 g de Ftalato ácido de potasio ligeramente aplastado y secado a 105°C hasta peso constante. Esta solución tiene una concentración de 1176 mg DQO aproximadamente, con lo que se calculan los volúmenes de solución patrón y se realiza la preparación de los tubos y digestión como se mencionó anteriormente.

Luego se realiza la medición espectrofotométrica a 605 nm, traspasando cuidadosamente el contenido de los tubos a las celdas y contrastando con el blanco correspondiente. Muestras y estándares se tratan de la misma manera. Medir a temperatura ambiente.

D.2. DQO: Volumetría por reflujo cerrado (APHA, 2012)

Equipos y materiales:

- Tubos digestores.
- Digestor (150°C)
- Bureta graduada 50 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 50 mL.
- Material de uso común en laboratorio.

Reactivos:

- Agua destilada o desionizada (exenta de nitrito).
- Solución catalítica.
- Solución digestora.
- Ferroína (indicador).
- Sulfato de hierro II y amonio (FAS)

Preparación reactivos:

Para la solución de sulfato ferroso amoniacal (FAS) 0,0250 N se disuelven 9,8 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 500 mL de agua destilada, añadir cuidadosamente 20 mL de H_2SO_4 concentrado. Dejar enfriar y aforar a 1 L. Esta solución debe ser valorada con solución patrón de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

Luego para la solución de ferroína (indicador) se disuelven 1,486 g de sulfato de fierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en 50 mL de agua destilada. Aforar a 100 mL.

Para medir se traspasa el contenido de los tubos a temperatura ambiente cuantitativamente a matraces Erlenmeyer de 50 mL enjuagando los tubos con pequeñas porciones de agua destilada. Se agrega al matraz una gota de indicador ferroína y se valora con FAS 0,0250 N hasta el viraje del indicador a rojo. Realizar el mismo procedimiento para los blancos.

Valoración FAS:

Se pipetea 10 mL de la solución patrón de dicromato 0,0250 N, se agregan 3 mL de H_2SO_4 , una gota del indicador y se titula de la misma manera que los anteriores. Anotar el gasto y calcular según lo siguiente:

$$N_{FAS} = \frac{10 \cdot N_{\text{patrón dicromato}}}{V_{FAS}}$$

Finalmente,

$$DQO \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = \frac{(V_{\text{blanco}} - V_{\text{muestra}}) \cdot 8000 \cdot N_{FAS} \cdot FD}{2,5}$$

E. TIOSULFATO: TITULACIÓN YODOMETRICA

(Harris, 2007; Rivera y Barahona, 2016)

La determinación del tiosulfato presente tanto en la alimentación como en la descarga se realizó por yodometría (valoración oxido-reducción). Este corresponde a un método volumétrico indirecto en que se determina los oxidantes al hacerlos reaccionar con un exceso de iones de yoduro, con lo cual se cuantifica el yodo liberado con un reductor estándar, como lo es el tiosulfato de sodio.

La muestra previamente filtrada en el caso de la descarga, se coloca en un matraz Erlenmeyer y se titula con una solución de yodo 0,1 N hasta percibir un cambio de incoloro a amarillo. Posteriormente se agregan 3 gotas de la solución de almidón y se valora con tiosulfato de sodio 0,1 N hasta que varíe a incoloro nuevamente. Lo último para eliminar el exceso de yodo.

Equipos y materiales:

- Buretas de 30 mL para yodo y tiosulfato.
- Matraces Erlenmeyer de 50 mL.
- Material de uso común en laboratorio.

Reactivos:

- Agua destilada o desionizada.
- Tiosulfato de Sodio pentahidratado 0,1 N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
- Cloroformo (CHCl_3).
- Yoduro de Potasio 10% (KI).
- Yodato de Potasio 0,1 N (KIO_3).
- Solución yodo 0,1 N.
- Solución almidón al 1%.

Solución tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$):

Se pesa en la balanza 25 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y se transfieren a una botella ámbar de 1 L mediante embudo utilizando agua recién hervida y enfriada. Se agregan 10 gotas de cloroformo y se lleva a volumen, se homogeniza y se deja reposar un par de días para su posterior estandarización.

Solución yodo 0,1 N:

Se pesan 20 g de yoduro libre de yodato en 30-40 mL de agua destilada en matraz aforado de 1 L con tapa esmerilada. Luego se pesan en la balanza 12,7 g de yodo resublimado sobre vidrio reloj y se traspasa

cuantitativamente al matraz de aforo. Se tapa y se deja en agitación hasta que el yodo se haya disuelto, se deja en reposo por 20 minutos y se lleva a aforo. Conservar en lugar frío y oscuro.

Solución almidón:

Se realiza una pasta con 1 g de almidón soluble y una pequeña cantidad de agua y se agrega con buena agitación, 100 mL de agua a ebullición y se hierve durante un minuto. Se deja enfriar y se agregan 3 g de yoduro de potasio.

Para efectos de cálculo, conociendo el volumen de iodo agregado a la muestra se tienen los moles totales de iodo y al saber el iodo consumido por la solución de tiosulfatos como patrón primario se calculan los milimoles totales consumidos por la solución estándar. Al restar ambas cantidades se obtienen los milimoles consumidos por la muestra, de acuerdo con la siguiente relación:

$$1 [ml] I_2 = 0,1581 [g] Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$$

$$S_2O_3^{-2} \left[\frac{mg}{L} \right] = \left(\left(\frac{V_{I_2}}{1000} \cdot M_{I_2} \right) - \left(\frac{V_{S_2O_3^{-2}}}{1000} \cdot \frac{M_{S_2O_3^{-2}}}{2} \right) \right) \cdot \frac{PM_{S_2O_3^{-2}}}{V_M} \cdot 2 \cdot 10^6$$

Donde, V corresponde a volumen en [ml], M a molaridad [mol/L] (que en este caso corresponde a la mitad de la normalidad) y PM a peso molecular de los compuestos respectivos, además V_M es el volumen de la muestra.

Se recomienda que su almacenamiento refrigerado (4°C) no debe extenderse por más de 2 días, de lo contrario congelar por no más de 1 semana.

F. SULFATO: ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

(APHA, 2012; Rivera y Barahona, 2016)

El sulfato presente en las muestras fue determinado mediante el espectrofotómetro presente en el laboratorio, mediante el cual se mide su absorbancia. El ion sulfato precipita en medio ácido con cloruro de bario formando cristales de sulfato de bario de tamaño uniforme, cantidad que es proporcional a la concentración de sulfatos presentes en la muestra.

El rango de aplicación de este método es hasta 40 [mg/L] y la longitud adecuada para su determinación es a 420 nm, en caso de presentar una concentración mayor es necesario diluir. En este caso se realizaron diluciones de 1:50 tanto para la alimentación como para el efluente.

Los 50 mL de muestra ya diluida se transfieren a vasos precipitados de 100 mL, se adicionan 2,5 mL de solución acondicionadora y se agitan mediante varilla de vidrio. Luego se adiciona una punta de espátula de cristales de cloruro de bario y se agita nuevamente hasta la completa disolución de los cristales. Una vez disueltos se miden en el espectrofotómetro frente a un blanco, teniendo en cuenta que una medida crítica de este método es que debe ser leído antes de 5 minutos. La solución acondicionadora de sulfato proporciona un método de suspensión para los iones sulfatos al ser leídos en el espectrofotómetro, de no usarla precipitaría todo el analito al momento de la adición del cloruro de bario.

Equipos y Materiales:

- Espectrofotómetro UV-VIS.
- Celdas plásticas de paso óptico 1 cm.
- Material común de vidrio de uso en laboratorio.

Reactivos y soluciones:

- Solución trazable de sulfatos
- Cloruro de bario di hidratado
- Solución acondicionadora para sulfato

Solución acondicionadora:

La preparación debe ser en orden, agregando: 300 mL de agua destilada, 30 mL de HCl concentrado, 100 mL de alcohol isopropílico y 75 g de NaCl. Finalmente agregar 50 mL de glicerol medidos en probeta, mezclar todo y llevar a volumen final 500 mL con agua destilada.

Curva de calibración:

Para realizar la curva de calibración del espectrofotómetro para el sulfato se utilizó el método de adiciones estándar, en el cual se agregan volúmenes crecientes de solución trazable de sulfatos mediante bureta a matraces aforados de 100 mL para obtener al menos seis calibraciones entre los 0 y 40 mg/L.

No es necesario realizar una curva de calibración cada vez que se mide, basta con comprobar la validez de la existente. Para esto se prepara un patrón de 20 mg/L de la solución trazable de sulfatos y se lee como muestra normal, si el resultado presenta una desviación menor o igual al 10% se considera que la curva es válida.

Dado que ciertas bacterias pueden reducir el sulfato a sulfuro, especialmente en muestras contaminadas, se recomienda almacenar refrigerado a 6°C por un periodo máximo de 28 días.

G. ACETATO: CROMATOGRAFÍA DE SUPRESIÓN IÓNICA

Condiciones de operación:

- Equipo: Cromatógrafo Líquido (Marca Agilent Technologies, modelo 1100).
- Columna: Zorbax SB-Aq 4.6 mm ID x 150 mm (5 μ m)
- Fase Móvil: 1% ACN/99% [mM] NaHPO₄ (pH=2.0)
- Flujo: 1 [mL/min]
- Temperatura columna: 35°C
- Detector: UV (210 nm)

Para la determinación de ácido acético deben ser filtrados alrededor de 7 mL de muestra a través de una membrana de 0,45 μ m mediante la ayuda de una jeringa (filtro tipo pirinola) y luego ser ultracongeladas para su posterior análisis. Cabe destacar, que este procedimiento debe realizarse el mismo día en que es tomada la muestra, una vez congelada se almacenan varias muestras para su medición, en la cual se utiliza una columna Zorbax SB-Aq y un sistema de detección de diodo.

H. PH: POTENCIOMETRÍA (APHA, 2012)

Equipos y Materiales:

- pH Thermo Scientific Orion 370® LogR Meter
- Material común de vidrio de uso en laboratorio.

Reactivos y soluciones:

- Soluciones calibración buffer pH 4, 7 y 10.
- Agua destilada o desionizada.

Primero debe realizarse la calibración del pH-metro para los valores de los buffers, para lo cual se destapa el electrodo, se enjuaga, se seca y se introduce en la solución de calibración de interés. Repetir el mismo procedimiento con el siguiente buffer. Una vez listo sumergir el electrodo en la muestra de interés y esperar a que se estabilice la medición.