

UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAISO – CHILE



**Estudio de la influencia de aditivos en procesos de nitrificación y
desnitrificación heterótrofa.**

Memoria de titulación para optar al título de
Ingeniero Civil Químico

Carlos Alberto Basáez Puyol

Profesora Guía: Dra. Lorna Guerrero S.
Profesora Co-Referente: M.Cs. Andrea Barahona L.

Abril 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): Memoria o trabajo de título; Tesis de Postgrado;

Título del trabajo: Estudio de la influencia de aditivos en procesos de nitrificación y desnitrificación heterótrofa.

Nombre del candidato(a): Carlos Alberto Basaez Puyol

Carrera / Grado: Ingeniería Civil Química

Campus: Casa Central Valparaíso ; Departamento: Ingeniería Química y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Lorna Herrera Guerrero Saldes, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL

El trabajo **NO** contiene información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.


El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (embargo) por:

6 meses; 12 meses; 2 años; 3 años; 5 años; 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: _____ ; Firma: 

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 20-08-2025 ; Firma: 

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

Agradecimientos

Esta sección está dedicada a las personas que me han acompañado en esta larga travesía, me han guiado y acompañado en estos largos años.

Agradecer a mis abuelos que siempre han estado para mí, aun cuando desaparezco de vez en cuando. A la “Chica” por inspirarme a buscar explorar siempre más en la vida. A Ana, por ser la mejor “no” hermana que pude haber querido en la vida. A mi madre, por inculcarme el salir adelante y no rendirme frente a los problemas de la cotidianidad. Sin ellos, no podría estar donde estoy ni tener la visión de futuro que quiero en mi vida.

A mis amigos del colegio, quienes durante los últimos 15 años se han convertido en mi segunda familia, y aun cuando no estuvieron tan cerca en este proceso, me transmitieron el apoyo independientemente de las adversidades, el tiempo y los problemas. A mis amigos de la universidad, que me trajeron muy buenos momentos y me hicieron conocer a algunas de las personas más maravillosas que he conocido.

Agradecer infinitamente a Sandra, quien se ha convertido en el amor de mi vida y me ha demostrado que no se necesitan grandes cosas para ser feliz. También agradecer a Ringo, que con su hermosura y compañía me motivo a sobrellevar los momentos duros de estos últimos años. De igual manera, agradecer a mi suegro, quien me alojo en su casa con mucho cariño y apoyo para llevar a cabo el termino de mi etapa universitaria

Agradezco también a mis profesoras guías Lorna y Andrea junto a Paloma, por darme el apoyo y guía a lo largo de la realización de la memoria. Si no hubiera elegido algún tema en tratamiento de RILes, sinceramente dudo haber podido elegir algún tema que me hubiera motivado a cerrar mi paso universitario.

Resumen

Con el advenimiento de la revolución industrial, la concentración de la población, la actividad humana y el empleo de combustibles fósiles como nuevas formas de energía, los ciclos biogeoquímicos como el del nitrógeno se han visto radicalmente alterados, desatando problemáticas ambientales y fenómenos como la eutrofización de aguas, la lluvia ácida y el aumento de gases de efecto invernadero. El estudio de la acumulación de nitrógeno en la naturaleza se ha vuelto necesario para comprender y remediar el efecto de la acción humana, especialmente en cuerpos de agua, lo que afecta negativamente la salud de los ecosistemas y las comunidades.

En esta investigación se estudió el efecto de dos potenciadores biológicos aplicados con éxito en reactores biológicos anaerobios, en los procesos de nitrificación y desnitrificación. Estos potenciadores o aditivos están constituidos principalmente por compuestos vegetales como saponinas de quillay, entre otros. Los potenciadores se denominan S1 y S2, ya que debido a razones de confidencialidad no se puede dar más detalle de ellos.

La remoción de nitrógeno convencional por medio de la nitrificación consiste en la oxidación biológica del nitrógeno amoniacal en condiciones aerobias a nitrito y posteriormente nitrato, mientras que, la desnitrificación, corresponde a la reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso en condiciones anaerobias, donde al utilizar una fuente de carbono como dador de electrones se denomina heterótrofa.

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron tres reactores secuenciales *batch* (SBR) de 1,6 [L] de volumen a 35 [°C], utilizando 0,5[L] de inóculo enriquecido y 1 [L] de agua residual, acorde a las necesidades nutricionales específicas de los procesos nitrificante y desnitrificante a evaluar. Cabe destacar que los procesos de nitrificación y desnitrificación se llevan a cabo simultáneamente en los SBR. Este estudio, se realizó utilizando un reactor de control (sin aditivos), un reactor con el aditivo potenciador S1 y el último con el aditivo S2. La metodología de estudio consistió en llevar a cabo ciclos operacionales con concentraciones crecientes de potenciadores (entre los 0 a 100 [mg/L]), con el fin de evaluar los efectos de estos en los parámetros de remoción de nitrógeno. Al término de cada ciclo el reactor se decantaba y alimentaba para dar comienzo a una nueva medición.

La operación de la nitrificación se llevó a cabo utilizando un tiempo de residencia de 4 días, con un rango de pH de 7,0 – 7,4, el cual era regulado por medio de un tampón fosfato salino y una concentración en exceso estequiométrica de oxígeno disuelto (entre los 4 a 6 [mg/L]), por medio de una bomba de aire. Los ciclos de la desnitrificación heterótrofa se realizaron utilizando un tiempo de residencia de 3 días y un pH operacional de 7,3 – 7,7, donde se empleó acetato de potasio como fuente dadora de electrones.

Como resultado, se obtuvo que la presencia de los potenciadores disminuyó la disponibilidad de oxígeno disuelto y afectó la oxidación de amonio, obteniendo rendimientos de un 60,5% en el reactor con el S1 y 82,79% en el reactor con el S2, frente a la tasa de eficiencias de un 96,5% del control en concentraciones de 100 [mg/L].

En la desnitrificación los resultados fueron similares, obteniendo tasas de reducción de nitrato de un 84,27 % y 80,96 % en los reactores con potenciadores S1 y S2 respectivamente, frente al rendimiento de 94,13% del reactor de control al utilizar una concentración de 100 [mg/L] de aditivos.

No se observaron mejoras en la tasa de remoción de nitrógeno a concentraciones más bajas de los potenciadores en ambos procesos, mientras que, se obtuvo acumulación de nitrito en la nitrificación y acumulación de carbono en la desnitrificación en altas concentraciones.

Índice de Contenidos

1	Introducción y objetivos	7
1.1.	Antecedentes	7
1.2.	Objetivos generales	8
1.3.	Objetivos específicos	8
2	Marco teórico	9
2.1	Ciclos biogeoquímicos	9
2.2	Nitrógeno	9
2.2.1	Ciclo del nitrógeno.....	10
2.3	Nitrificación.....	13
2.4	Desnitrificación	15
2.5	Factores que influyen en la nitrificación y desnitrificación	18
2.5.1	Sustratos y contaminantes	18
2.5.2	Temperatura	20
2.5.3	Potencial de hidrogeno.....	21
2.5.4	Oxígeno disuelto.....	22
2.6	Alteraciones en el ciclo del nitrógeno.....	23
2.6.1	Acumulación de nitrógeno en ecosistemas.	23
2.6.2	Contaminación por acumulación de nitrógeno.	25
2.7	Metabolismo y crecimiento microbiano.	26
2.7.1	Etapas del crecimiento microbiano.....	26
2.7.2	Cinética microbiana y enriquecimiento en sistemas por lote.....	28
3	Metodología, enriquecimiento y operación.	30
3.1	Materiales y montaje de reactores.	30
3.2	Métodos analíticos y parámetros operacionales.....	35
3.3	Puesta en marcha.	36
3.3.1	Fase de enriquecimiento.....	36
3.3.2	Fase de estabilización	37
3.4	Filosofía de operación y parámetros experimentales.....	38
3.4.1	Medidas Correctivas.....	39
4	Resultados y Discusiones	40
4.1	Enriquecimiento Nitrificación.....	40
4.2	Enriquecimiento desnitrificación.	43

4.3	Fase de evaluación y determinación de la influencia de los aditivos	45
4.3.1	Nitrificación.....	45
4.3.2	Desnitrificación.....	51
4.4	Discusiones:	56
4.4.1	Nitrificación.....	56
4.4.2	Desnitrificación	56
5	Conclusiones	57
6	Referencias.....	58
7	Anexos	61
7.1	Anexo A: Metodologías de determinación por espectrofotometría.	61
7.1.1	Determinación de amonio.....	61
7.1.2	Determinación de nitrito.....	62
7.1.3	Determinación de nitrato.	63
7.2	Anexo B: Metodología de determinación de suspendidos volátiles.....	64
7.2.1	Procedimiento:	64
7.3	Anexo C: Metodología de determinación de carbono orgánico.....	65
7.4	Anexo D: Cálculos.....	65
7.4.1	Balance de nitrógeno:	65
7.4.2	Porcentajes de acumulación de nitrito, oxidación de nitrito, acumulación y oxidación de amonio, junto a reducción de nitrato:	65

Índice de Figuras

Figura 1	Incorporación de compuestos inorgánicos nitrogenados y las principales proteínas involucradas en la síntesis de precursores de compuestos nitrogenados orgánicos	11
Figura 2	Proceso catabólico de AOB, junto a los complejos 3 y 4 de la cadena transportadora de electrones y los citocromos (Cyt) que participan en el proceso metabólico.	13
Figura 3.	Ciclo biogeoquímico del nitrógeno y sus principales enzimas involucradas	17
Figura 4.	Rango de temperaturas óptimas para el crecimiento de bacterias AOB, NOB y zona de desactivación selectiva de AOB/NOB por temperatura	20
Figura 5.	Porcentaje de amonio libre en función del pH [-].	21
Figura 6.	Esquema del ciclo del nitrógeno atmosférico y acuático, junto a las fuentes antropogénicas que afectan a este.	24
Figura 7.	Esquematación de los procesos anabólicos y catabólicos, junto a su relación con la molécula de energía ATP.	26

Figura 8. Fases del crecimiento Bacteriano	27
Figura 9. Esquema comparativo del proceso de nitrificación-desnitrificación convencional frente al de desnitrificación parcial-desnitrificación	29
Figura 10. Etapas en el ciclo de operación de un reactor SBR	30
Figura 11. Reactor de Nitrificación	32
Figura 12. Reactor de Desnitrificación.....	32
Figura 13. Fotografía de los reactores de Desnitrificación, con el agitador mecánico incorporado .	33
Figura 14. Fotografía de reactor de nitrificación y las mangueras de suministradoras de aire.	33
Figura 15. Fotografía del interior del reactor de nitrificación destacando los dosificadores de aire de piedra.....	34
Figura 16. Variación de pH a lo largo de la fase de enriquecimiento en nitrificación, considerando las primeras 5 semanas.	41
Figura 17. Balance de nitrógeno en fase de enriquecimiento nitrificante	42
Figura 18. Variación de pH en el reactor madre en la fase de enriquecimiento de desnitrificación.	44
Figura 19. Concentración de compuestos nitrogenados en fase de enriquecimiento de desnitrificación.	44
Figura 20. Concentración de amonio en afluentes y efluentes a lo largo de la fase de operación de nitrificación.	46
Figura 21. Remoción total de nitrógeno en el proceso de nitrificación.	47
Figura 22. Evolución de nitrito y nitrato a diferentes concentraciones del aditivo S1.	47
Figura 23 Evolución de nitrito y nitrato a diferentes concentraciones del aditivo S2.	48
Figura 24. Perfil de nitrito a lo largo de la fase de evaluación	48
Figura 25. Concentración diaria de oxígeno disuelto durante fase de operación	49
Figura 26. Potencial de hidrogeno a lo largo de la fase de operación en nitrificación.....	50
Figura 27. Evolución de la concentración de biomasa en la nitrificación	50
Figura 28. Concentración de nitrato en fase de operación.	51
Figura 29. Concentración de nitrito en fase de evaluación de desnitrificación.	52
Figura 30. Variación de pH durante la fase de evaluación de desnitrificación.	52
Figura 31. Rendimiento de reducción de nitrato (porcentaje)	53
Figura 32. Concentración carbono total en los reactores durante fase de evaluación.....	54
Figura 33. Concentración de carbono orgánico total (TOC)	55
Figura 34. Concentración de carbono inorgánico (CI).....	55

Índice de Tablas

Tabla 1. Características fisicoquímicas del nitrógeno.	9
Tabla 2. Especies nitrogenadas que participan en la nitrificación.	14
Tabla 3. Enzimas reductoras del proceso de desnitrificación.	17
Tabla 4. Ril sintético empleado en el proceso de nitrificación.....	30
Tabla 5. Ril sintético empleado en el proceso de desnitrificación	31
Tabla 6. Componentes micronutrientes de nitrificación	31
Tabla 7. Componentes micronutrientes de desnitrificación.....	31
Tabla 8. Subdivisiones y dimensiones de los reactores de nitrificación y desnitrificación.....	32
Tabla 9. Materiales empleados en la configuración experimental.	34
Tabla 10. Parámetros de control, variables, metodología y objetivo de medición.....	35
Tabla 11. Concentración de oxígeno disuelto dentro de los reactores de nitrificación.	37
Tabla 12. Concentración de aditivos añadidos (nitrificación)	38
Tabla 13. Concentración de aditivos añadidos (desnitrificación)	38
Tabla 14. Duración y ciclos de los periodos de las etapas de nitrificación y desnitrificación.....	40
Tabla 15. Promedio de eficiencia de remoción de sustrato principal en fase de estabilización.....	40
Tabla 16. Concentraciones de compuestos nitrogenados en fase de enriquecimiento nitrificante. ..	41
Tabla 17. Evolución de los sólidos suspendidos volátiles a lo largo del enriquecimiento.....	42
Tabla 18 Resultados Reactor Desnitrificante Fase de Enriquecimiento en la Desnitrificación	43
Tabla 19. Resultados experimentales de la nitrificación bajo influencia de aditivos.	45
Tabla 20. Aditivos añadidos en los ciclos operacionales.	51
Tabla 21. Porcentaje de remoción de nitrato.	53
Tabla 22. Evolución del porcentaje de remoción de carbono orgánico.	54

1 Introducción y objetivos

1.1. Antecedentes

Con el advenimiento de la revolución industrial, la concentración de la población, la actividad humana y el empleo de combustibles fósiles como nuevas formas de energía, los ciclos biogeoquímicos, entre ellos el del nitrógeno, se han visto radicalmente alterados, desatando problemáticas ambientales y fenómenos como la eutrofización de aguas, la lluvia ácida y el aumento de gases de efecto invernadero (White, 2017). Si bien, durante las últimas décadas ha tomado importancia mediática la contaminación atmosférica y el efecto que esta provoca en la población y los ecosistemas, el estudio de la acumulación de nitrógeno en la naturaleza se ha vuelto necesario para comprender y remediar el efecto de la acción humana, especialmente en cuerpos de agua, lo que afecta negativamente la salud de los ecosistemas y las comunidades humanas (Vries, 2021).

Dentro de los tratamientos de nitrógeno en aguas residuales, destacan dos tecnologías sumamente estudiadas y masificadas debido a sus altas eficiencias como también relativos bajos costes operacionales (Brozincevic *et al*, 2024), en las cuales participan cultivos y comunidades bacterianas. La nitrificación corresponde a la oxidación de amonio a nitrito y de nitrito a nitrato, empleando oxígeno como agente oxidante, donde, tanto el primer sustrato como el producto de esta reacción son altamente tóxicos para el medioambiente (*Plant Ecology*, 2019). La desnitrificación por otro lado corresponde a la reducción simultánea desde nitrato y/o nitrito hacia nitrógeno gaseoso, la cual se denomina heterótrofa si es que los microorganismos emplean fuentes de carbono como dador de electrones. Estos procesos, corresponden a un mecanismo importante en la eliminación de materia orgánica y el tratamiento de aguas en condiciones anóxicas (Burghate y Ingole, 2013).

En la presente investigación, se evaluará el efecto de dos aditivos o potenciadores en los procesos de nitrificación y desnitrificación, con el fin de determinar efectos en la eficiencia de remoción de nitrógeno y materia orgánica. La metodología consistirá en utilizar tres reactores SBR (*Secuencial batch reactor*), los cuales se inocularán con un lodo nitrificante y desnitrificante previamente enriquecidos. Los aditivos se añadirán a dos de estos reactores SBR y se denominarán S1 y S2 por razones de confidencialidad junto a un reactor de control que no tendrá aditivos. La operación se realizará variando la concentración de los aditivos entre las concentraciones de 0 a 100 mg/L y se evaluará la variación de los parámetros operacionales entre el reactor de control y los que poseen aditivos. Se ha de destacar, que las operaciones de nitrificación y desnitrificación serán independientes entre sí, permitiendo evaluar la influencia de los aditivos en la reducción de nitrato y nitrito a gas nitrógeno empleando acetato de sodio como fuente dadora de electrones. Además, se evaluará la oxidación de amonio y nitrito en el proceso de nitrificación, utilizando concentraciones de oxígeno en condiciones de exceso estequiométrico (4 a 6 mg/L).

1.2. Objetivos generales

Evaluación del efecto de aditivos en los procesos de nitrificación y desnitrificación heterótrofa empleando inóculos enriquecidos en reactores *batch* secuenciales (SBR).

1.3. Objetivos específicos

- Evidenciar efectos positivos o negativos en los parámetros que controlan los procesos de nitrificación y desnitrificación heterótrofa, provocados por la presencia de los aditivos (oxígeno disuelto, pH, sólidos suspendidos volátiles) al aumentar la concentración de estos durante varios ciclos operacionales
- Determinar variaciones en el consumo del sustrato principal, en las reacciones de nitrificación y desnitrificación (amonio o nitrato), contrastando la actividad microbiana con el reactor de control sin aditivos.
- Evaluar acumulaciones o consumo de productos intermedios, variaciones en el consumo de materia orgánica (desnitrificación) y cambios en la velocidad de reacción.

2 Marco teórico

2.1 Ciclos biogeoquímicos

Los ciclos biogeoquímicos, corresponden al flujo de materia y energía en el ambiente por medio de la participación de seres vivos, fenómenos fisicoquímicos y descomposición de materia orgánica. Estos, presentan factores bióticos (animales, plantas, materia orgánica viva) y abióticos (aire, agua, suelo, entre otros), que permiten la disponibilidad de nutrientes, moléculas y deposiciones minerales, a diversos seres vivos que requieren de ellos para su subsistencia (*Plant Ecology*, 2019). Junto con sentar las bases para el surgimiento de cadenas tróficas, los factores bióticos dependen de las formas de interacciones biológicas como la simbiosis, comensalismo, mutualismo, depredación, u otras que permitan mantener el equilibrio de ellas en la naturaleza; la relación entre los factores bióticos y abióticos mantiene el equilibrio “geoquímico” en los ecosistemas, permitiendo la existencia de los ciclos biogeoquímicos (White, 2017). Entre algunos de los ciclos que pueden ser mencionados se encuentran:

- Ciclo del Carbono
- Ciclo del Nitrógeno
- Ciclo del Agua
- Ciclo del Azufre
- Ciclo del fosforo

Se debe considerar que estos ciclos pueden ser modificados por la acción humana, alterando el equilibrio de estos a lo cual se le denomina interferencia antropogénica (Schlesinger y Bernhardt, 2013).

2.2 Nitrógeno

El nitrógeno (N), corresponde al quinto elemento de la tabla periódica con configuración electrónica $1s^2 2s^2 2p^3$, lo cual le permite tener 7 estados de oxidación posibles. En la naturaleza, está presente en todos los organismos formando parte de importantes macromoléculas, proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN), como también en el adenosín trifosfato (ATP), molécula que participa en la obtención de energía celular y el metabolismo (White, 2017).

Tabla 1. Características fisicoquímicas del nitrógeno.

Numero atómico	7
Peso molecular [g/mol]	14,0067
Estados de oxidación	-3,1,0,1,2,3,5
Características físicas	Incoloro, inodoro, insípido

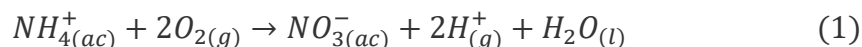
Dentro de las principales estructuras moleculares que integra el nitrógeno, pueden mencionarse:

- Moléculas inorgánicas: Los nitruros y sus diversos compuestos que integran al nitrógeno oxidado -3 (N^{-3}), conformando una amplia variedad de compuestos y aleaciones metálicas, mediante enlaces iónicos y covalente con metales. Óxidos de nitrógeno (NO_x), ácido nítrico y sus esteres (nitratos y nitritos), complejos de dinitrógeno, nitrógeno amoniacal y óxidos de nitrógeno (Bioquímica , 2020)
- Moléculas orgánicas: Simbolizado por su estructura $C - NH_2$, estos están presentes en infinitas formas y estructuras orgánicas, conformando parte de gran parte de las estructuras biológicas, como la molécula de ATP y ácidos nucleicos (ARN y ADN), proteínas, hormonas, vitaminas, entre otros. La participación del nitrógeno en la química orgánica es esencial, ya que conforma parte de grupos funcionales básicos como las aminas, amidas, compuestos azoicos y nitro (Bioquímica , 2020).

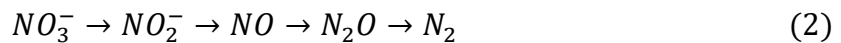
2.2.1 Ciclo del nitrógeno

Dentro de los ciclos biogeoquímicos, el ciclo del nitrógeno describe las transformaciones de este elemento en la naturaleza, junto con su transferencia y deposición en ecosistemas terrestres, acuáticos y atmosféricos y su uso en la biosfera global. Gran parte del nitrógeno se encuentra en una forma no biodisponible para la mayoría de los organismos, estando aproximadamente el 50% de este en su forma atmosférica (N_2), mientras que la mayor parte de la cantidad restante es contenida en rocas del manto terrestre en forma de amonio (NH_4^+) y silicatos (White, 2017). Este nitrógeno mineral, posee una baja reactividad, lo que dificulta su uso para organismos terrestres, bacterias y plantas. Por este motivo, para el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (o ciclo del nitrógeno), se considera como fuente principal solamente el nitrógeno atmosférico (*Plant Ecology*, 2019), el cual es difícil de asimilar para plantas y organismos terrestres y acuáticos, condicionando el uso de este para la vida de la biosfera en el metabolismo personal de ella. Los procesos de transformación del nitrógeno en este ciclo se pueden resumir en:

1. Nitrificación: En esta etapa, se lleva a cabo la oxidación de amoniaco (NH_3) presente en los ecosistemas por medio de bacterias oxidantes de amoniaco, empleando oxígeno como principal fuente oxidante. La nitrificación, se llevan a cabo en dos reacciones consecutivas, produciendo nitrito (NO_2^-) y consecutivamente nitrato (NO_3^-), siendo empleados por las bacterias para realizar su respiración celular (Bradley y Hass, 2020). La nitrificación permite remover el amoniaco de cuerpos acuosos y terrestres, evitando la evaporación de este a la atmosfera (Corruchaga *et al.*, 2022) junto con entregar nitrato útil para las plantas en suelos terrestres. Esta etapa, puede ser resumida en la siguiente reacción global.



2. Desnitrificación: Contempla al proceso de reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) y luego nitrógeno gaseoso (N_2), denominándose desnitrificación biológica si es efectuado por bacterias (Burghate y Ingole, 2013). Estas bacterias, emplean ambas fuentes nitrogenadas junto a un dador de electrones para realizar respiración celular y crecimiento, con la participación de enzimas reductasas en condiciones anoxicas. Los dadores de electrones se dividen en orgánicos (ácidos orgánicos, alcoholes. Compuestos aromáticos, entre otros) e inorgánicos (hidrogeno, compuestos reducidos con sulfuro, hierro y sulfuros de hierro), clasificando la reacción en heterótrofa o autótrofa respectivamente (Pang y Wang, 2021). La etapa de desnitrificación se puede describir en la siguiente secuencia.



3. Asimilación: También denominado “inmovilización”, consiste en la formación de compuestos nitrogenados orgánicos a partir de especies nitrogenadas inorgánicas. Este proceso es realizado principalmente por bacterias y plantas, permitiendo el acceso a otros organismos que no pueden emplear el nitrógeno inorgánico, en forma de aminoácidos, lípidos u otros tipos de biomoléculas orgánicas. Este mecanismo de transformación de materia se caracteriza en la siguiente reacción no consecutiva (Wohlleben *et al.*, 2011).

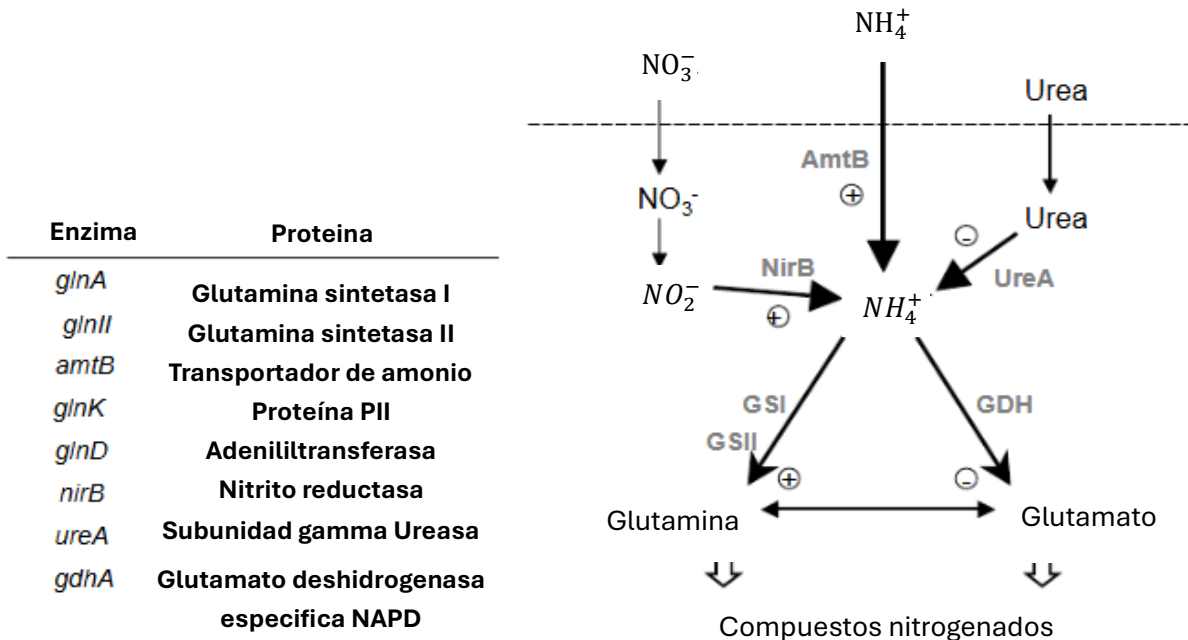
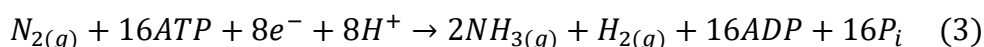
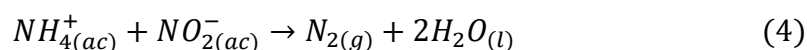


Figura 1 Incorporación de compuestos inorgánicos nitrogenados y las principales proteínas involucradas en la síntesis de precursores de compuestos nitrogenados orgánicos
Fuente: (Wohlleben *et al.*, 2011)

4. Mineralización: Supone el proceso inverso al mecanismo de asimilación, donde por medio de bacterias heterótrofas ocurre la transformación de compuestos nitrogenados orgánicos a nitrógeno amoniacal (NH_4^+). La etapa de mineralización o “amonificación”, conlleva a la conversión de materia orgánica hacia la nitrificación, actuando como un mecanismo de ingreso de amonio hacia los ecosistemas, al reciclar la materia orgánica presentes en ellos (White, 2017).
5. Fijación: Corresponde a la transformación de nitrógeno atmosférico (N_2) por medio de bacterias reductoras y energía en amoniaco (NH_3), que se encuentran en las raíces de algunas plantas (especialmente leguminosas). A esta conversión, se le denomina “fijación biológica de nitrógeno” (siglas BNF en inglés) permitiendo incorporar nitrógeno a la biosfera en forma de amoniaco (*Plant Ecology*, 2019). La reacción biológica que describe a esta transformación de materia corresponde a la siguiente.



6. Anammox: También denominada “oxidación anaerobia de amonio” (*anaerobic ammonium oxidación*), consiste en la oxidación de este compuesto empleando nitrito (NO_2^-) como donante de electrones. A diferencia de la nitrificación, esta reacción requiere de una condición anóxica, ya que el oxígeno presenta un potencial de oxidación de amonio (NH_4^+), frente a la reducción de este por nitrito (Burghate y Ingole, 2013). El mecanismo de reacción contempla una reacción oxido/reducción conmutativa, donde los dos compuestos nitrogenados cambian de estado de oxidación, formando nitrógeno gaseoso (N_2). El mecanismo por el cual esta reacción se lleva a cabo fue descubierto a mediados y fines de los años 90, incluyendo a este proceso biológico en el ciclo del nitrógeno. Se presume que este mecanismo es responsable de la generación de un 30 a 50% del nitrógeno producido en los ecosistemas marinos (Huy Quoc Anh *et al.*, 2015). La reacción global que describe a este mecanismo se resume de la siguiente ecuación química.



El equilibrio del ciclo del nitrógeno puede ser alterado por una serie de acciones antropogénicas, como la generación de amoniaco industrial a través del proceso de fijación de Haber-Bosh (HBNF) y la contaminación de cursos de agua por escurrimiento de fertilizantes sintetizados de este, la generación de compuestos de nitrógeno oxidados (NOx) producidos en la combustión de motores a alta temperatura, o degradación de compuestos químicos de origen industrial (Gu *et al.*, 2013).

2.3 Nitrificación

La nitrificación es usualmente realizada por un proceso microbiológico de dos etapas, donde inicialmente se lleva a cabo la oxidación de amonio (NH_4^+) por medio de bacterias oxidantes de amonio (AOB) y arqueas oxidantes de amonio (AOA), con el fin de obtener energía útil para su metabolismo. De estas dos clases de microorganismos, la familia de los más estudiados corresponde a las bacterias oxidantes de amonio (AOB), donde las más abundantes son las bacterias *Nitrosomonas*, seguidas de la familia de las *Nitrosospira* (Li, Kappor *et al.*, 2015), las cuales en condiciones aerobias oxidan el amonio disuelto en el medio empleando la enzima amonio monooxigenasa (AMO).

Las AOB oxidan amoniaco (NH_3) a nitrito (NO_2^-), formando hidroxilamina (NH_2OH) como intermediario, el cual es posteriormente oxidado en nitrito (NO_2^-). Esta oxidación, permite a las *Nitrosomonas* y otras bacterias AOB e integrar energía útil para el crecimiento celular y metabolismo (González-Cabaleiro *et al.*, 2018). En la Figura 2, se observan los mecanismos de oxidación del amonio e hidroxilamina dentro del periplasma de las bacterias AOB.

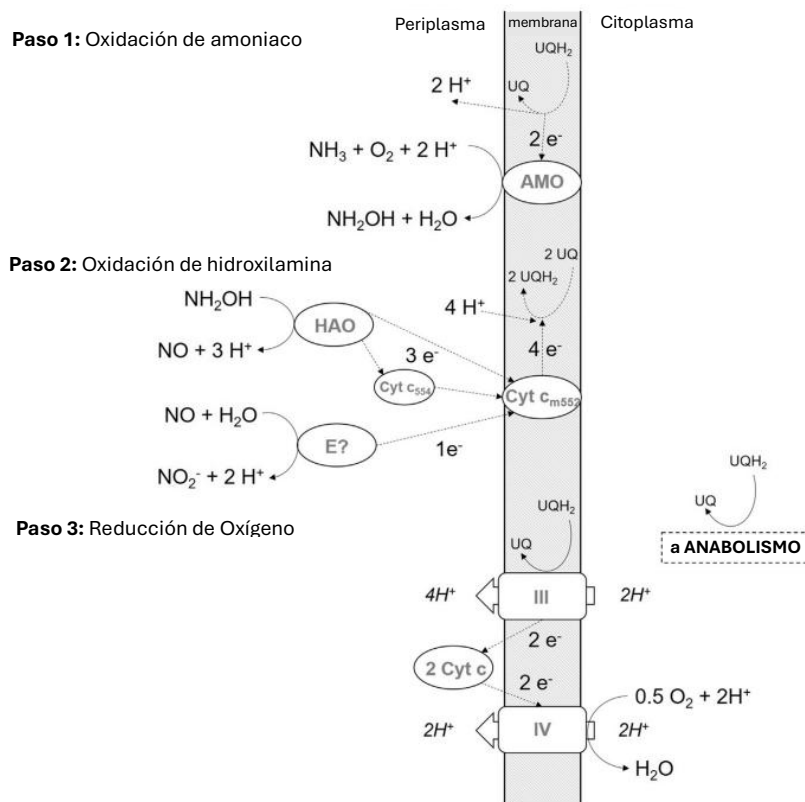


Figura 2 Proceso catabólico de AOB, junto a los complejos 3 y 4 de la cadena transportadora de electrones y los citocromos (Cyt) que participan en el proceso metabólico. (González-Cabaleiro *et al.*, 2018)

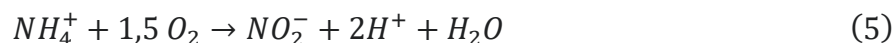
Los estados de oxidación, la fórmula química y el nombre de las especies nitrogenadas que participan en la nitrificación se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 2. Especies nitrogenadas que participan en la nitrificación.
Elaboración Propia

Formula química	Estado de oxidación	Nombre
NH_4^+	-3	Amonio
NO_2^-	3	Nitrito
NO_3^-	5	Nitrato

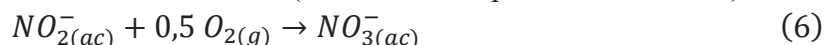
La primera etapa de la nitrificación, se le denomina nitrificación primaria (o parcial) y se puede resumir en la siguiente reacción estequiométrica.

- Reacción de nitrificación primaria (llevada a cabo por bacterias AOB).



El subproducto de la nitrificación denominado nitrito (NO_2^-), es oxidado por bacterias oxidantes de Nitrito (NOB) siendo las más predominantes las *Nitrobacter*, que llevan a cabo la segunda etapa de la nitrificación, por medio de la enzima nitrito oxidasa (Bradley *et al.*, 2020). La reacción de oxidación de nitrito corresponde a la siguiente.

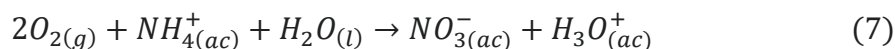
- Reacción de nitrificación secundaria (llevada a cabo por bacterias NOB).



Se debe considerar que tanto la reacción de amonio oxidación y nitrito oxidación son consecutivas, sin embargo, también pueden ocurrir en simultaneo, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno presente en el medio (Bradley *et al.*, 2020). La nitrificación secundaria de los NOB requiere estequiométricamente de una menor cantidad de oxígeno frente las bacterias AOB que son más afines al oxígeno (González-Cabaleiro *et al.*, 2018), sin embargo, la conversión de amonio a nitrito es más lenta, lo que conlleva a que en plantas de tratamiento de aguas de desecho se presenten bajas concentraciones de nitrito al ser virtualmente convertido a nitrato (Chen *et al.*, 2020). Por este motivo, la oxidación de amonio es el limitante fundamental que gobierna a la reacción de nitrificación total.

La acumulación de fuentes nitrogenadas en el ecosistema, especialmente en aguas potables, es dañina para la salud humana, donde la acumulación de nitrato puede ocasionar condiciones fatales como la metahemoglobinemia (conocida como síndrome del bebe azul), afectando la distribución de oxígeno en el neonato (Vries, 2021).

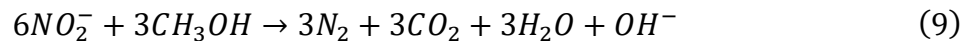
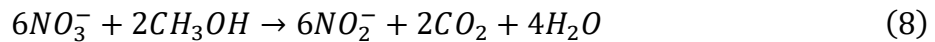
Finalmente, la reacción global que describe al proceso de nitrificación total queda expresada en la siguiente ecuación química.



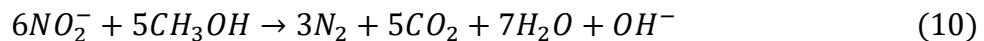
2.4 Desnitrificación

La desnitrificación, corresponde a un proceso de reducción de las fuentes nitrogenadas nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-) e intermediarios subsecuentes hacia nitrógeno gaseoso (N_2). Este proceso es altamente eficiente, alcanzando tasas de remoción de nitrato (NO_3^-) de hasta un 100% (Brozincevic *et al.*, 2024), dependiendo del donador de electrones al ser realizado por bacterias desnitrificantes. La utilización de materia orgánica como donador de electrones se denomina desnitrificación heterótrofa, mientras que si se emplean fuentes inorgánicas se denomina autótrofa. En la desnitrificación heterótrofa, la materia orgánica es oxidada y actúa como dador de electrones, la cual puede ser empleada como energía en el metabolismo y participa en el crecimiento bacteriano (Burghate y Ingole, 2013). Este proceso, a diferencia de la nitrificación, es efectivo a bajas cantidades de oxígeno disuelto en el medio, ya que la presencia de este inhibe la producción de enzimas reductasas de nitrato y nitrito, impidiendo la reducción de estos compuestos (Pang y Wang, 2021).

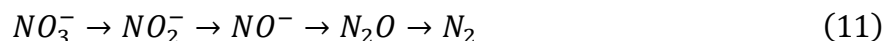
La fuente de carbono a emplear para el proceso de desnitrificación heterótrofa, varía en base a la biodisponibilidad de ésta presente en el medio, dentro de las cuales se encuentran: moléculas orgánicas de bajo peso molecular, como ácidos grasos (acetato, piruvato, butirato), alcoholes (etanol, metanol, glicerol), sacáridos (glucosa, lactosa), compuestos aromáticos (benzeno, pyreno, PAHs), o metano, como también moléculas orgánicas de alto peso molecular (biopolímeros, materiales de celulosa o hemicelulosa, polímeros sintéticos) (Brozincevic *et al.*, 2024). En procesos controlados de remoción de nitrógeno, la adición de metanol a las aguas residuales potencia el proceso de desnitrificación, debido a la afinidad que poseen las bacterias desnitrificantes, permitiendo obtener un relativo bajo costo y un fácil control de este proceso (Brozincevic *et al.*, 2024). La reacción de desnitrificación de nitrato y nitrito en presencia de metanol como aceptor de electrones, queda descrita en las siguientes ecuaciones químicas.



Sumando la ecuación (8) y (9), se obtiene la ecuación global de desnitrificación, empleando metanol como fuente aceptora de electrones:



La reducción por etapas de nitrato a gas nitrógeno, ocurre en las siguientes sucesiones.



Existe una gran cantidad de bacterias desnitrificantes afines a distintas condiciones del medio entre ellos pH, cantidad de luz, tipo de dador de electrones entre otros, permitiendo su adaptación a diferentes ecosistemas. Estas bacterias se agrupan en diferentes clasificaciones, donde la principal característica recae en el compuesto que dona los electrones, caracterizando a las bacterias en autótrofas o heterótrofas (fuentes inorgánicas u orgánicas dadoras de electrones) e incluso mixotróficas, en el caso de ser capaces de emplear ambas (González *et al.*, 2006). Debido a la diversidad de dadores de electrones, los organismos desnitrificantes poseen una gran diversidad y distribución, donde estos pueden ser organizados mayoritariamente, dentro de los tres siguientes grupos (Karanasios *et al.*, 2010).

- Heterótrofos: *Hyphomicrobium*, *Paracoccus*, *Azoarcus*, *Thauera*, *Pseudomonas*, *Acidovorax* y *Comamonas*
- Mixotróficos: *Paracoccus*, *Pseudomonas* y *Paracoccus*, las cuales, son empleadas preferentemente en reactores autótrofos con suministro de hidrogeno
- Autótrofos: *Thiobacillus* y *Sulfurimonas* son encontradas en reactores autótrofos que emplean sulfuro como dador de electrones, como también las *Gallionellaceae*, las cuales desnitrifican empleando Fe^{+2} como dador de electrones, durante este proceso (Tian y Yu, 2020)

Si bien, estos desnitrificadores son capaces de realizar la reducción completa del nitrato a nitrógeno atmosférico, existen bacterias como las *Rhodococcus* que reducen parcialmente el nitrato, al no poseer la enzima reductora “óxido nítrico reductasa”, liberando N_2O como elemento terminal del proceso (Pang y Wang, 2020)

Las reducciones de los compuestos de nitrógeno son distintas en cada paso, donde, la diferencia en los sistemas de agrupaciones enzimáticas (reductasas), no siempre se obtienen todos los intermediarios, por lo cual dependerá de la materia orgánica, las enzimas y familias de microorganismos presentes que participan en cada reacción. Estas familias de microorganismos pueden coexistir entre si degradando compuestos orgánicos (en el caso de las heterótrofas) que pueden ser empleados por otro tipo de desnitrificadoras, habitando en sistemas comensalita e incluso simbióticos (Pang y Wang, 2020), permitiendo la existencia de colonias mixotróficas dependiendo de la concentración de las especies dadoras de electrones y sustratos presentes en el medio.

En la Tabla 3 se observan las principales enzimas que participan en la reducción de todos los intermediarios de nitrógeno en la desnitrificación, junto a los electrones ganados por las especies en cada paso.

Tabla 3. Enzimas reductoras del proceso de desnitrificación.

Nombre de enzima	Nomenclatura	Electrones ganados	Compuesto reducido
Nitrato reductasa	NaR	2	NO_3^-
Nitrito reductasa	NiR	1	NO_2^-
Óxido nítrico reductasa	NoR	1	NO
Óxido nitroso reductasa	NoS	1	N_2O

Se debe considerar que estas enzimas, permiten la oxidación de la materia orgánica interactuando con la coenzima NAD(P), lo que permite llevar a cabo la oxidación de materia y reducción de los compuestos nitrogenados, produciendo además de nitrógeno gaseoso (N_2), dióxido de carbono (CO_2) como productos (González *et al.*, 2006). En la Figura 3, se resumen las etapas del ciclo del nitrógeno, junto a las enzimas involucradas y los estados de oxidación de los intermediarios.

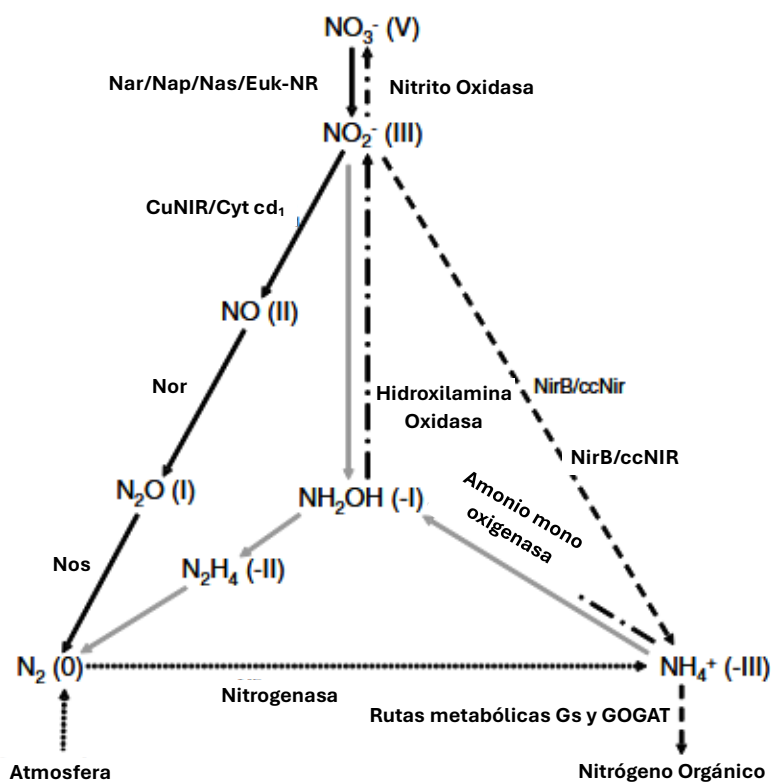


Figura 3. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno y sus principales enzimas involucradas (González *et al.*, 2006)

2.5 Factores que influyen en la nitrificación y desnitrificación

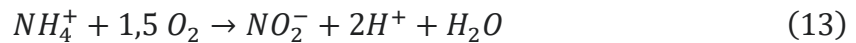
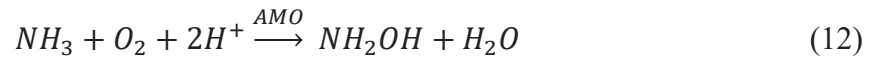
Para que las bacterias nitrificantes y desnitrificantes puedan crecer y realizar sus procesos biológicos, ciertos factores físicos y especies químicas son requeridas.

2.5.1 Sustratos y contaminantes

2.5.1.1 Amonio

Si bien, existe evidencia de que las bacterias nitrificantes AOB pueden emplear pequeñas cantidades de carbono inorgánico (bicarbonato de sodio y dióxido de carbono), fructosa o piruvato bajo condiciones anóxicas (Ward *et al.*, 2011), la generación de energía requerida para el metabolismo y crecimiento de las bacterias AOB requiere del uso de amonio. Por este motivo, uno de los factores más determinantes del proceso de nitrificación corresponde a la concentración de este compuesto nitrogenado.

Para que la reacción de nitrificación pueda llevarse a cabo, el amonio debe encontrarse en su forma no ionizada de amoniaco (NH_3), la cual se encuentra en menor cantidad frente a su forma ionizada (NH_4^+), donde a pH 7, solo un 0,6% se encuentra disponible como amoniaco libre, también llamado FA (*Free ammonia*), limitando la velocidad de la reacción de amonio oxidación (González-Cabaleiro *et al.*, 2018). La ecuación química que describe a la oxidación de amonio oxidación y la nitrificación parcial se presenta a continuación.



Como se observa, la alcalinidad del medio se verá afectada a lo largo de la nitrificación, producto de la generación de iones de hidrogeno (H^+), limitando la concentración de FA. Yu, *et al.*, caracterizaron la concentración de amoniaco libre en reactores SBR, obteniendo la siguiente ecuación para el cálculo, dependiendo del pH del medio y su temperatura (T) en grados Celcius (Yu *et al.*, 2021).

$$FA \left[\frac{mg}{L} \right] = \frac{17}{14} \cdot \frac{NH_4^+ - N \cdot 10^{pH}}{10^{pH} + e^{\frac{6344}{273+T}}} \quad (14)$$

Si bien el metabolismo de las AOB requiere de amonio para poder llevar a cabo su respiración celular, las *Nitrosomonas* se encuentran entre las AOB que poseen una gran afinidad por este compuesto, lo que les permite sobrevivir en ecosistemas con bajas concentraciones (Zhang *et al.*, 2009). Por el contrario, se ha registrado que concentraciones de FA sobre 10 – 150 mg/L, puede llevar a una inhibición de este compuesto (Kim *et al.*, 2008).

2.5.1.2 Nitrito

La presencia y acumulación de nitrito, es problemática para los cultivos microbianos, y en general para la actividad bacteriana. La acumulación de nitrito puede inhibir y ralentizar el metabolismo en concentraciones relativamente bajas (sobre 10 de mM de nitrito). En la nitrificación, la presencia de nitrito inhibe la asimilación de oxígeno y fosforilación oxidativa en las colonias de bacterias AOB y NOB, en concentraciones del rango de 10 a 100 mM (Yaurbrough *et al.*, 1980), donde concentraciones entre 10 a 20 mM, pueden afectar la actividad bacteriana a nivel genómico, disminuyendo la codificación y concentración de mRNAs para las enzimas de colonias bacterianas como las *Nitrosospira europaea* Y *Nitrosospira multiformis* (Cua y Stein, 2011).

En la desnitrificación la competencia por sustratos en las reductasas puede generar acumulación de nitrito y óxido nitroso (N_2O), desencadenando acumulación de colonias selectivas de reductasas e inhibiendo el desarrollo de otras. En comunidades de bacterias reductoras, la acumulación puede darse por bacterias denominadas “respiradoras de nitrato”, las cuales poseen una cinética de crecimiento mayor frente a las “denitrificantes reales”, las cuales pueden realizar la reducción completa de nitrito y nitrato a gas dinitrogeno (Albina *et al.*, 2019).

2.5.1.3 Nitrato

En la desnitrificación, la concentración de nitrato limitara el crecimiento de colonias desnitrificantes. La presencia en exceso de este compuesto no afecta directamente al metabolismo de las colonias nitrificantes, sin embargo, altas concentraciones podrían generar acumulaciones de nitrito, afectando la actividad enzimática de la colonia bacterianas. Se ha evidenciado que, bajo concentraciones a los 100 mM de nitrato la acumulación de nitrito podría generar acumulaciones entre un 40 y 70%, mientras que concentraciones mayores entre 100 a 300 mM de nitrato podrían generarse acumulaciones de nitrito de un 90% o más, disminuyendo sustancialmente la reducción bacteriana de nitrato (Albina *et al.*, 2019).

2.5.1.4 Fuente de Carbono Orgánica

La importancia del tipo de carbono orgánico a usar en la desnitrificación heterótrofa recae en la afinidad que presenta este compuesto a entregar electrones, siendo los más empleados y con mayor rendimiento reductor el metanol, etanol y ácido acético debido a su relativo bajo peso molecular y emplearse en una fase líquida con alto contacto molecular. En caso de existir presencia de oxígeno disuelto en el medio, el requerimiento de estos compuestos aumenta, debido a la biodegradabilidad de ellos frente al oxígeno (Pang y Wang, 2021).

2.5.2 Temperatura

La temperatura puede influir en las reacciones biológicas por medio de dos formas: incidiendo en la velocidad a la cual las reacciones enzimáticas son llevadas a cabo, junto con afectar la tasa de difusión de los sustratos en los procesos de remoción de nitrógeno hacia las células.

Para el proceso de nitrificación, los rangos de temperatura óptimos para cultivos puros de colonias nitrificantes se encuentran sobre los 20 °C (Zhang *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2021), donde los investigadores han demostrado que las reacciones de la formación de nitrato son inhibidas a bajas temperaturas, originando acumulación de nitrito en el medio.

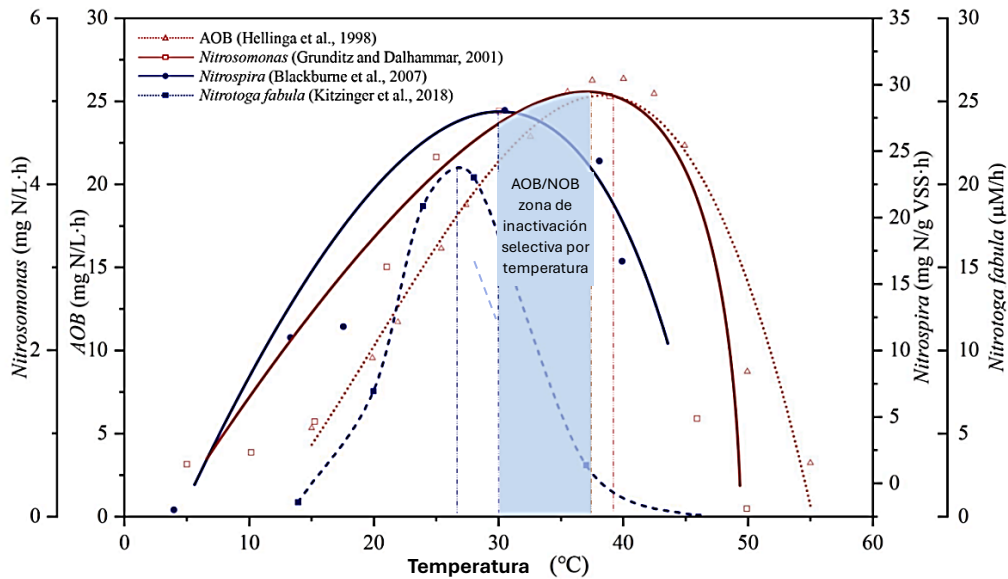


Figura 4. Rango de temperaturas óptimas para el crecimiento de bacterias AOB, NOB y zona de desactivación selectiva de AOB/NOB por temperatura (Yu *et al.*, 2021).

Para cultivos nitrificantes mixto el rango de temperatura operacional determina la tasa de consumo de amonio, así como la generación de nitrito dentro del reactor. Una temperatura de 35 °C permite limitar la tasa de crecimiento de las bacterias nitrito oxidante (NOB) frente a las bacterias amonio oxidante (AMO), permitiendo caracterizar el cultivo microbiano y evitar acumulaciones de nitrito dentro de un reactor SBR (Yu *et al.*, 2021). El efecto de la temperatura de las AMO es similar a las NOB a esta temperatura (Zhang *et al.*, 2009), por estos motivos y debido a que el mecanismo de oxidación realizado por las AMO es realizado de forma más lenta se propone en condiciones de colonias mixotróficas una temperatura óptima de operación de 35 °C.

La desnitrificación al igual que la nitrificación se ve afectada por la temperatura, sin embargo, el metabolismo puede funcionar desde temperaturas de 5 °C e incrementa linealmente hasta los 25-30 °C, alcanzando temperaturas de hasta 60 °C, con un óptimo operacional de 40 °C (Burghate y Ingole, 2013).

2.5.3 Potencial de hidrogeno

Como se mencionó anteriormente, el pH posee un efecto limitante en la liberación de amoníaco libre en el medio, donde, utilizando la ecuación 14, se obtiene el siguiente perfil de amoníaco libre dentro de un sistema cerrado, considerando 35 °C como temperatura de operación óptima en reactores SBR.

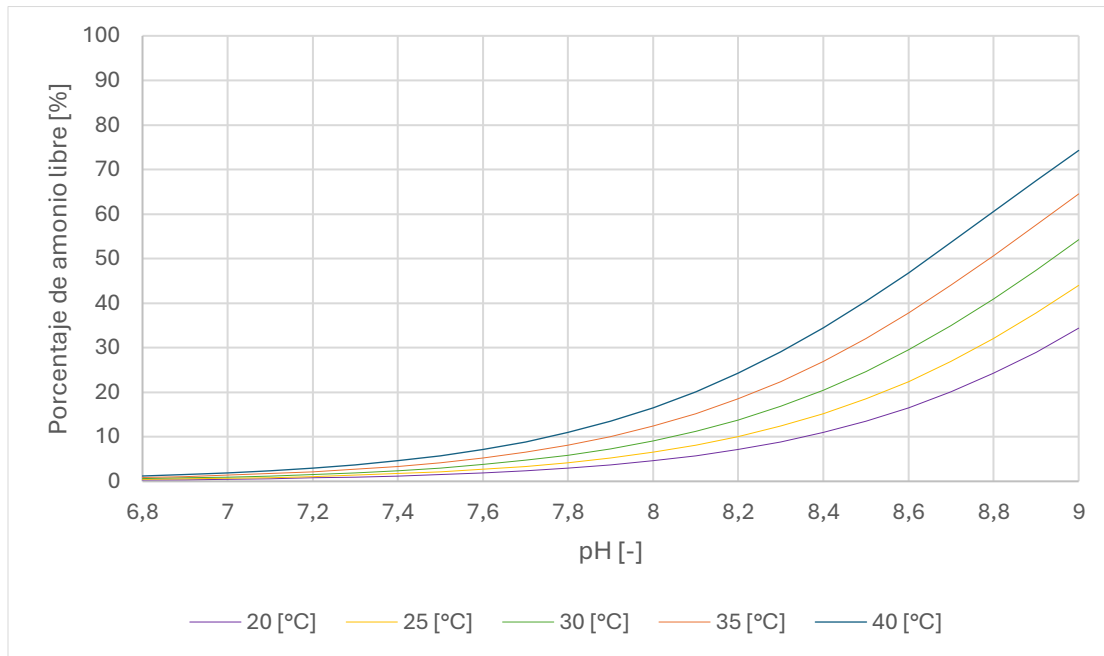


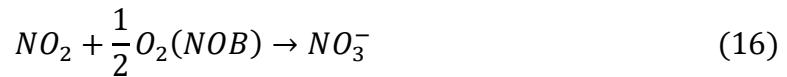
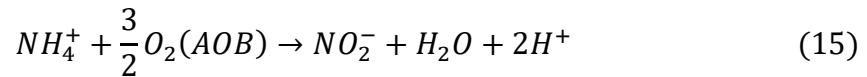
Figura 5. Porcentaje de amonio libre en función del pH [-].
(Elaboración propia)

Como se observa, la concentración de amonio libre aumenta a medida que el medio se vuelve alcalino, lo que acelera la tasa de oxidación de amonio y con ello la cantidad de nitrito disponible que es oxidada a nitrato. La mayoría de las bacterias nitrificantes poseen condiciones óptimas de crecimiento en pH de 7,5 a 8,0, sin embargo, estas pueden sobrevivir en condiciones muy alejadas de las óptimas (Zhang *et al.*, 2009). La generación de nitrato en la nitrificación estará regulada por el pH del medio, donde en condiciones más ácidas, la generación y consumo de nitrito se verá ralentizada (Bradley y Hass , 2020).

El efecto del pH en la desnitrificación recae directamente la tasa de generación de intermediarios que son reducidos directamente desde nitrato, afectando las enzimas y disponibilidad de electrones para llevar a cabo las reacciones de reducción. El aumento de pH conlleva a una acumulación de nitrito y limita la desnitrificación a una reacción parcial acumulando nitrito (Qian *et al.*, 2019). De la misma forma, un pH bajo o sobre el intervalo de 7,0 – 9,0, podría desatar escases de electrones disponibles para la reducción de intermediarios, desencadenando acumulación de N_2O , el cual es un importante contaminante de efecto invernadero (Pan *et al.*, 2012).

2.5.4 Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto (o *disolved oxigen*) también abreviado “DO”, corresponde a la cantidad de oxígeno disuelto en un cuerpo de agua expresado en unidades de concentración como partes por millón o miligramos por litro (ppm o mg/L). El oxígeno libre es esencial para el proceso de nitrificación ya que consiste en la molécula que las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* utilizan para llevar a cabo los procesos de oxidación de amonio y nitrito. Utilizando las ecuaciones estequiométricas, se obtiene que, para llevar a cabo el proceso de nitrificación completa son requeridas $4,57 \text{ mgO}_2/\text{mgN}$. El cálculo teórico se detalla a continuación.



Utilizando los coeficientes estequiométricos y el oxígeno requerido para ambas reacciones, se obtiene el siguiente calculo, considerando los pesos moleculares de las especies presentadas.

$$\text{O}_2 \text{ por mg de nitrógeno oxidado} = \frac{3}{2} \cdot \frac{32 \text{ mgO}_2}{14 \text{ mgN}} + \frac{1}{2} \cdot \frac{32 \text{ mgO}_2}{14 \text{ mgN}} \quad (17)$$

$$\text{O}_2 \text{ mg de nitrógeno oxidado} = 4,57 \frac{\text{mgO}_2}{\text{mgN}} \quad (18)$$

Debido a la afinidad del oxígeno por las bacterias AOB frente a las NOB (González-Cabaleiro *et al.*, 2018) y por la lentitud del mecanismo de oxidación de amonio frente al nitrato, la acumulación de nitrito ocurrirá en casos de baja concentración de oxígeno (Chen, *et al.*, 2020). Se debe considerar que para concentraciones bajo 1,5 mg/L de DO la acumulación de nitrito tiene lugar, por lo cual concentraciones de DO entre 4 – 5 mg/L se consideran predilectas para lograr una nitrificación total de amonio a nitrato sin acumulaciones e inhibiciones.

Como se intuye, al ser la desnitrificación un proceso anaerobio, se requiere de ausencia o muy baja cantidad de oxígeno disuelto en el medio para lograr una reducción efectiva, por lo cual, la ausencia de este compuesto permitirá la reducción de las especies nitrogenadas al no afectar la generación de enzimas reductasas y con ello permitir que la reducción de las especies nitrogenadas se lleve a cabo sin acumulaciones en el medio (Pang y Wang, 2021).

2.6 Alteraciones en el ciclo del nitrógeno.

2.6.1 Acumulación de nitrógeno en ecosistemas.

Si bien, la integración del nitrógeno al medio proviene principalmente desde el nitrógeno atmosférico, el ecosistema posee la capacidad de incorporar otras fuentes de nitrógeno que se encuentren acumuladas, ya sea en deposiciones de materia orgánica como también biomasa de organismos o heces de animales. Estas acumulaciones, son equilibradas en la naturaleza a partir de la interacción de las cadenas tróficas presentes en estas (microorganismos, plantas, animales, fauna terrestre y herbívoros), donde los procesos de amonificación (mineralización) y fijación permiten retirar e integrar nitrógeno presente en los ecosistemas, el cual es perdido al ser consumido por plantas, herbívoros o microorganismos.

El exceso de nitrógeno acuoso en el medio ambiente conlleva a la aparición de un fenómeno denominado “saturación de nitrógeno”, en el cual, la acumulación de amoníaco y nitrito se desplaza a zonas de tierra más bajas de la superficie terrestre, siendo retenido en parte el amoníaco al causar la liberación de cationes en zonas arcillosas (Plant Ecology, 2019), mientras que los nitritos y nitratos percolan y se depositan en cuerpos de agua subterráneos. A este fenómeno se le denomina “lixiviación de nitratos” y participa activamente en el transporte de nitrógeno entre ecosistemas.

El flujo de nitrógeno en la naturaleza puede verse afectado por la actividad humana, desencadenando acumulaciones en las distintas etapas de este y alterar la acumulación de nitratos y nitritos en disposiciones terrestres, acuosas y aéreas. Las interferencias antropogénicas en el ciclo del nitrógeno conllevan a modificar la estabilidad del equilibrio, donde se pueden considerar las siguientes fuentes:

- Fuentes acuosas: La deposición de nitratos y nitritos generan problemas de “eutrofización”, donde los sistemas acuáticos comienzan a sufrir hipoxia, alterando la biodiversidad en los ecosistemas al proliferar algas y plantas que conllevan a la degradación de sistemas acuáticos (White, 2017). Esto, se ve agravado por la dispersión de los contaminantes nitrogenados, especialmente nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-), los cuales resultan tóxicos para los organismos presentes. La acumulación de estos compuestos en aguas potables, generan graves problemas a la salud (Spalding y Exner, 1993).
- Fuentes aéreas: Desde los periodos preindustriales, las emisiones de contaminantes nitrogenados (NH_3 , NO_x , N_2O) han incrementado exponencialmente, debido principalmente a la conversión de fertilizantes en gases nitrogenados por medio de las bacterias presentes en los suelos (Plant Ecology, 2019), como también a la emisión de óxidos de nitrógeno (NO_x) durante la combustión de combustibles de origen fósil. Estos gases en la atmósfera son responsables de la aparición de smog fotoquímico y contribuyen al efecto de invernadero, especialmente del óxido nitroso (N_2O), que posee 298 veces la capacidad de retención de calor que el dióxido de carbono (CO_2),

que, aunque es relativamente inerte en la troposfera, posee un rol muy importante en la destrucción del ozono atmosférico junto a los óxidos de nitrógeno (NO_x) (Portmann *et al.*, 2012).

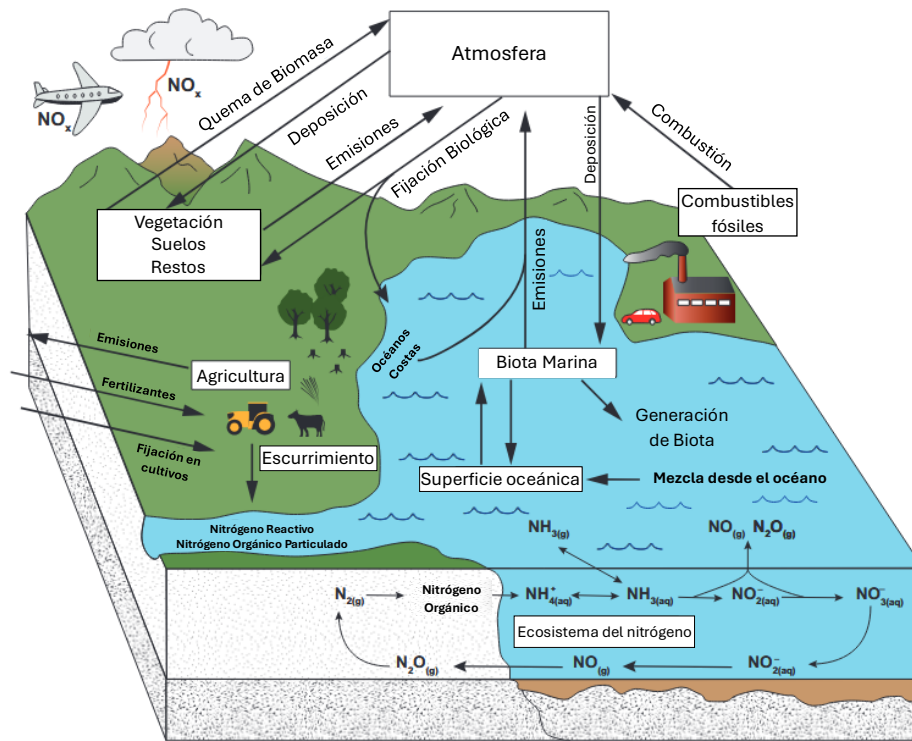


Figura 6. Esquema del ciclo del nitrógeno atmosférico y acuático, junto a las fuentes antropogénicas que afectan a este. (Schlesinger y Bernhardt, 2013)

Como se observa en la Figura 6, existen dos mecanismos por el cual pueden ingresar fuentes de nitrógeno de orígenes antropogénicas a los ecosistemas acuáticos y terrestres: la fijación biológica de nitrógeno ($N_2 \rightarrow NH_3$), la deposición de nitrógeno, el escurrimiento de nitrógeno de origen terrestre (Principalmente fertilizantes) y el nitrógeno orgánico integrado por medio de la mineralización (Nitrógeno Orgánico $\rightarrow NH_3$). Estos, por medio de los procesos de nitrificación y desnitrificación pueden ser eliminados de los medios acuosos y terrestres de forma natural¹.

Para el tratamiento de aguas con alta carga de nitrógeno, actualmente se emplean procesos de remoción de nitrificación y desnitrificación, dependiendo del origen, la composición de los compuestos contaminantes y la carga de materia orgánica presente en estas. Las industrias de tratamiento de aguas emplean sistemas biológicos denominados “Reactores biológicos”, que cuentan con las características de operar bajo parámetros y condiciones controladas, logrando altas tazas de remoción de nitrógeno (Pang y Wang, 2021), habilitando las condiciones de efluentes acuosos para ser aptas para el medio y consumo humano.

¹ Existen también escurrimientos de nitrito y nitrato por medios acuosos, los cuales emplean los mismos mecanismos de ingreso a los procesos de nitrificación y desnitrificación.

2.6.2 Contaminación por acumulación de nitrógeno.

La acumulación de nitrógeno en la naturaleza (ya sea provocada por fuentes antropogénicas o naturales) conlleva a la generación de ciertos contaminantes no deseados, alterando el equilibrio fisicoquímico de la biosfera alterando negativamente los ecosistemas acuáticos y terrestres. A continuación, se destacan algunos de los efectos más característicos que suelen ocurrir por este fenómeno (Vries, 2021):

- Impactos en suelos y ecosistemas terrestres: La acumulación de amonio conlleva a el debilitamiento de plantas frente a plagas y sequías, alterando la biodiversidad al proliferar plantas que utilizan grandes cantidades de nitrógeno frente a las nativas de la zona. La concentración de nitrógeno en sus diversas especies también provoca problemas en suelos problemas de acidificación y pérdida de nutrientes.
- Eutrofización y acidificación de cuerpos de ecosistemas acuáticos: La acumulación de nitrógeno en lechos de río, aguas superficiales y costas marítimas, permite la proliferación de fitoplancton, junto a micro y macroalgas (Eutrofización), lo cual limita la intensidad lumínica y crea zonas hipóxicas dañinas para la vida de organismos acuáticos y vegetación subacuática. La severidad de este efecto junto con la acidificación del medio puede desatar un colapso ecosistémico, alterando las comunidades bióticas que dependan de estos cuerpos de agua. Cabe destacar que estos fenómenos desplazan tanto a comunidades que se encuentran en diferentes niveles de las cadenas tróficas, como también sedimenta y puede alterar irreversiblemente los cuerpos de agua.
- Pérdida de calidad de aire y generación de gases de efecto de invernadero: La concentración de óxidos de nitrógeno en la troposfera provoca la síntesis de ozono, el cual es un gas de efecto invernadero que, al ser inhalado por el sistema respiratorio humano, lo cual genera la aparición de problemas respiratorios como el asma e incluso la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (WHO, 2003). La concentración de óxidos de nitrógeno (NO_x) y ozono también disminuye el rendimiento que se obtiene en la producción de alimentos de origen agrícola, al debilitar el metabolismo vegetal (*Plant Ecology*, 2019).

2.7 Metabolismo y crecimiento microbiano.

El metabolismo microbiano se caracteriza como el conjunto de procesos bioquímicos que realiza un microorganismo para integrar nutrientes y energía útil para ser empleada por los mecanismos biológicos. Dentro de estos procesos, son empleados compuestos y macromoléculas presentes en el medio, como las proteínas, los ácidos nucleicos, polisacáridos o lípidos entre otros; la sintetización de compuestos y moléculas se denomina anabolismo mientras que la degradación de catabolismo. El catabolismo descompone macromoléculas en compuestos más pequeñas, liberando energía útil en el proceso que puede ser almacenada en diversas moléculas (NAD, NADP, FAD, piruvato, glucógeno, ATP entre otros,) donde la más versátil y participe de gran parte del metabolismo corresponde al adenosín-trifosfato (ATP) (Chen *et al.*, 2020). Estas moléculas, son empleadas posteriormente en procesos anabólicos para integrar y sintetizar macromoléculas y estructuras celulares que requieran las células para sus actividades metabólicas.

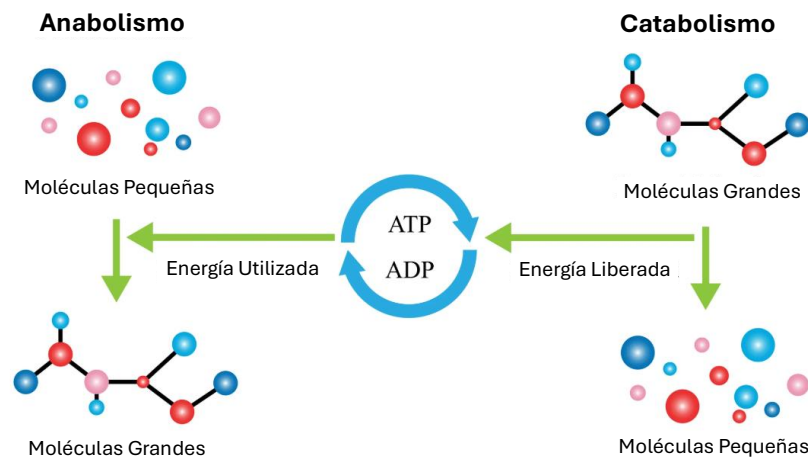


Figura 7. Esquemización de los procesos anabólicos y catabólicos, junto a su relación con la molécula de energía ATP.

2.7.1 Etapas del crecimiento microbiano

Para llevar a cabo un control efectivo de remoción de nitrógeno en tratamiento de efluentes, es requerida la comprensión del crecimiento microbiano en estos, junto con las condiciones ambientales y parámetros operacionales que influyen en ello. A los cultivos de microorganismos, se les puede atribuir el mismo tipo de respuesta que frente a organismos aislados, donde, en cada caso, las células emplearán los nutrientes del medio para aumentar en tamaño, replicar ADN y luego dividirse, incrementando el número de estas por medio de la denominada “división celular”. Por medio de este mecanismo celular, los microorganismos aseguran su existencia y proliferando colonias bacterianas que en sistemas cerrados se pueden caracterizar en cuatro etapas de desarrollo (Taylor y Aulton, 2022).

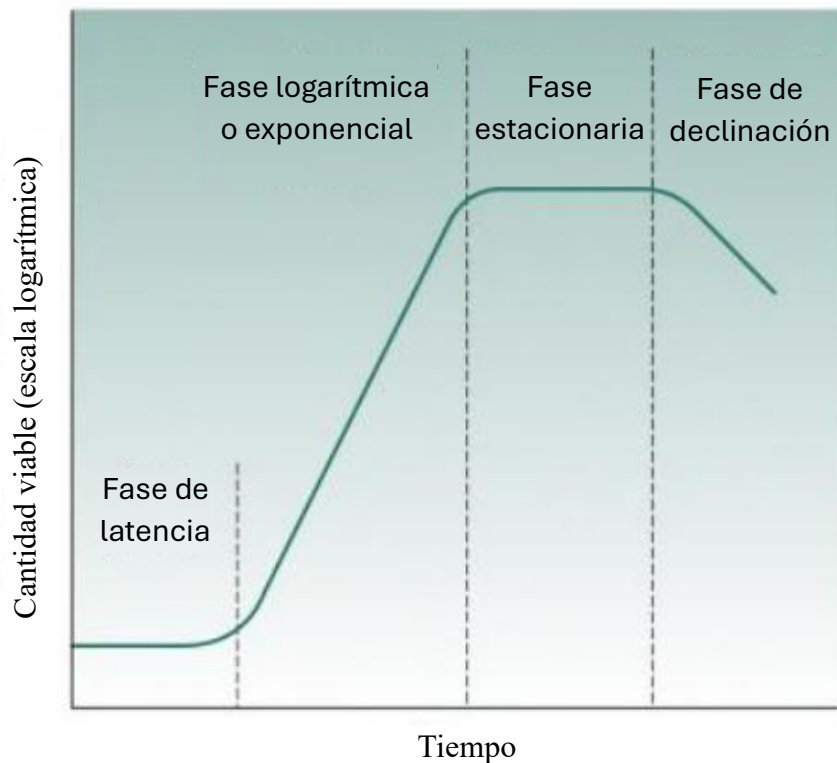


Figura 8. Fases del crecimiento Bacteriano
(Taylor y Aulton, 2022)

- Fase de latencia o “Lag”: Esta etapa describe una lenta reproducción microbiana en el medio luego de ser depositados o “inoculados” los microorganismos en el medio de cultivo. Durante esta fase, las bacterias se aclimatan al medio, asimilando lentamente los sustratos presentes en este.
- Fase logarítmica o exponencial: Luego de aclimatarse los microorganismos a los nutrientes y sustratos presentes en el medio, comienza un rápido crecimiento exponencial que lleva a un aumento de la comunidad bacteriana. La comunidad bacteriana en esta fase se encuentra en su mejor estado celular siempre y cuando las condiciones de temperatura, sustrato, nutrientes y condiciones fenotípicas sean óptimas para su metabolismo.
- Fase estacionaria o de meseta: El crecimiento acelerado de los microorganismos durante la fase logarítmica, modifica el medio en el cual se encuentra la colonia, donde, disminuye el sustrato disponible para estas además de acumularse sustancias tóxicas que se encuentran en el medio producto de la actividad metabólica. Estos factores, estancan el crecimiento de las células, causando la muerte de algunas de ellas mientras que otras crecen y se dividen. La población total se mantiene relativamente constante a medida se reproducen y mueren microorganismos.

- Fase de declinación o muerte: Eventualmente, la acumulación de compuestos tóxicos y la disminución de sustratos biodisponibles conllevan a una reducción del crecimiento bacteriano, y con ello un aumento en la tasa de muerte de las colonias presentes en el medio. Debido a esto, el cultivo entra en una fase de “declinación” disminuyendo la cantidad de microorganismos presentes, junto a una disminución de la actividad metabólica.

La comprensión de estas fases de crecimiento resulta esencial para identificar el estado en el cual se encuentran los microorganismos, principalmente durante las etapas de enriquecimiento y operación en procesos de remoción de nitrógeno por medio de la actividad bacteriana. El estudio y observación de la tasa de consumo de sustratos, como la conversión de estos a productos, serán los principales factores que analizar durante las etapas de crecimiento que se estén llevando a cabo durante la remoción de nitrógeno en un biorreactor.

2.7.2 Cinética microbiana y enriquecimiento en sistemas por lote.

Investigaciones experimentales han demostrado que los metabolismos celulares de nitrificación y desnitrificación pueden ser descritos por medio de la ecuación de Monod (Beccari *et al.*, 1978). Esta ecuación, permite describir empíricamente la relación que existe entre la tasa específica de crecimiento de un cultivo microbiano, en función del crecimiento máximo específico, junto a la concentración del sustrato y la biomasa presente en el medio. La ecuación de Monod se expresa en la ecuación 19.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(\frac{mgVSS}{mgVSS \cdot d} \right) \quad (19)$$

Donde:

μ = Tasa específica de crecimiento microbiano a concentración S de sustrato (d^{-1})

S = Concentración de sustrato en el medio

μ_{max} = Tasa de crecimiento específica bacteriana máxima (dependiente de la Temperatura)

K_S = Constante de Monod o velocidad de saturación media (concentración a la cual $\mu = \frac{1}{2}\mu_{max}$).

Si bien esta ecuación es aplicable para procesos continuos en eliminación de materia orgánica con baja concentración de sustratos (o solo un tipo de ellos), los procesos de nitrificación requieren tener en consideración ciertas modificaciones debido al mecanismo de estas reacciones.

La nitrificación, requerirá expandir esta ecuación, donde μ_{max} corresponde a la tasa de crecimiento máxima bacteriana (d^{-1}), O_2 la concentración de oxígeno disuelto (mgO_2/L), K_{O_2} la constante de afinidad por el oxígeno (mgO_2/L), S la concentración de sustrato (NH_4^+ para

las bacterias amonio oxidantes y NO_2^- para las nitrito oxidantes) (mgN/L), K_S la constante de afinidad por el sustrato (mgN/L), NH_3 a la concentración de amoniaco libre (el cual realiza una inhibición por sustrato mg/L), y K_{INH_3} la constante de inhibición por amonio libre (mgN/L), los cuales se relacionan y muestran en la ecuación 20. (Campos *et al.*, 2002)

$$\mu = \mu_{max} \cdot (T) \cdot \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{1}{1 + \frac{NH_3}{K_{INH_3}}} \quad (20)$$

Como se explicó anteriormente, la afinidad por el oxígeno por los microorganismos nitrito oxidantes es mayor a los nitritos oxidantes, lo cual explica el porque una baja concentración de DO afectaría al metabolismo de los primeros microorganismos, generando una acumulación de nitrito en el reactor. (Campos *et al.*, 2002)

Se debe considerar, que la oxidación de amonio es inhibida por concentraciones mayores de amonio libre que la oxidación de nitrito, por lo cual, la oxidación total a nitrato desde amonio se ve inhibida por el sustrato principal (amonio) y por producto (nitrito).

Adicionalmente, un aumento de temperatura incrementa la velocidad de la reacción como tal, debido a que la energía de oxidación de la reacción de amonio oxidación es mayor frente a la segunda etapa. Este fenómeno, se ve aumentado a temperaturas cercanas a los 30 grados, permitiendo realizar un proceso de oxidación selectivo dentro de los reactores de nitrificación total. Finalmente, el proceso de nitrificación-desnitrificación puede ser modificado dependiendo de las características del RIL de alimentación y los parámetros de control. (Campos *et al.*, 2002)

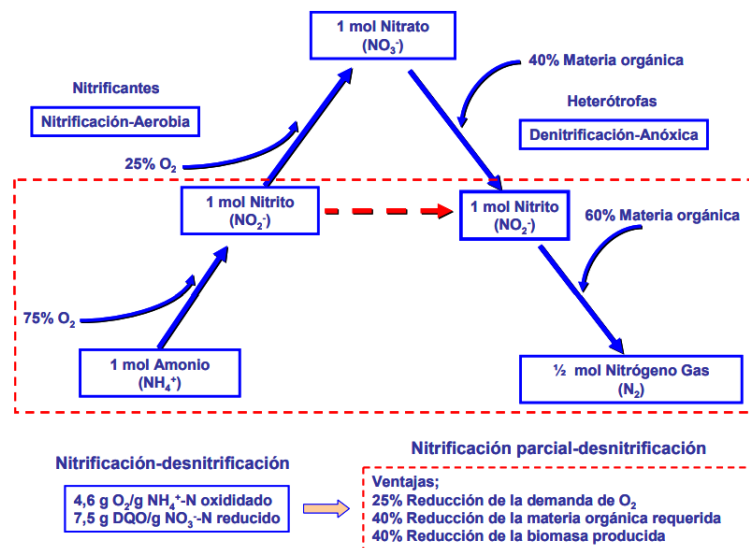


Figura 9. Esquema comparativo del proceso de nitrificación-desnitrificación convencional frente al de desnitrificación parcial-desnitrificación (Campos *et al.*, 2002)

3 Metodología, enriquecimiento y operación.

En la investigación, se llevaron a cabo dos enriquecimientos de colonias bacterianas mesófilas (temperaturas de crecimiento óptima 20 a 45 [°C]), las cuales fueron suministradas por parte del laboratorio de tratamiento de RILes de la universidad, con el fin de obtener un cultivo adecuado para poder realizar experimentos de potenciación en los procesos de nitrificación y desnitrificación. El objetivo consistió en analizar los efectos de dos aditivos en ambos procesos de remoción de nitrógeno, los cuales fueron suministrados por un tercero y se denominaron S1 y S2 por razones de confidencialidad.

3.1 Materiales y montaje de reactores.

Para la investigación se utilizaron tres reactores de vidrio ámbar, donde, en el experimento de nitrificación, estos funcionaron abiertos a la atmósfera con difusores de aire en la parte inferior, suministrando oxígeno por medio de mangueras de silicona a través de una bomba de aire. Para la desnitrificación, los reactores fueron cerrados a la atmósfera y se les incorporó un agitador en la parte superior, con el fin de mantener la homogeneidad dentro del reactor y con ello establecer condiciones anóxicas de operación. Los reactores fueron del tipo SBR (*Secuencial batch reactor*), los cuales operan en etapas como se observa en la Figura 10.

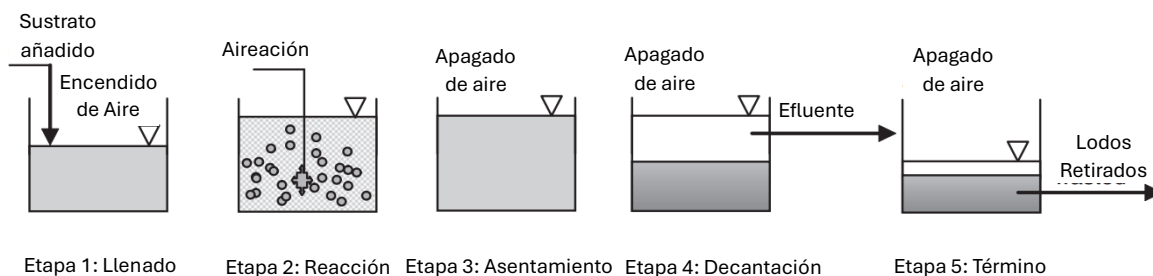


Figura 10. Etapas en el ciclo de operación de un reactor SBR (*Suspended Growth Treatment Processes, 2014*).

El ciclo de operación de un reactor SBR comienza con la alimentación de sustratos por medio de un RIL de alimentación (Afluente), el cual contiene un tampón fosfato salino para regular la variación de pH, junto con nutrientes requeridos para el metabolismo microbiano. Las características de los RILes sintéticos nitrificantes y desnitrificantes, se muestran en las Tablas 4 a 7.

Tabla 4. Ril sintético empleado en el proceso de nitrificación. (Barahona *et al.*, 2023)

Compuesto	Fórmula	Concentración g/L
Cloruro de Amonio	NH_4Cl	0,50
Cloruro de Sodio	$NaCl$	0,20
Bicarbonato de Sodio	$NaHCO_3$	2,42
Fosfato Monopotásico	KH_2PO_4	4,00
Fosfato Dipotásico	K_2HPO_4	3,50
Micronutrientes	-	1 ml

Tabla 5. Ril sintético empleado en el proceso de desnitrificación
(Barahona *et al.*, 2023)

Compuesto	Fórmula	Concentración g/L
Cloruro de Amonio	NH_4Cl	0,20
Nitrato de Sodio	$NaNO_3$	1,20
Acetato de Potasio	CH_3COOK	6,13
Fosfato Monopotásico	KH_2PO_4	0,30
Fosfato Dipotásico	K_2HPO_4	1,84
Micronutrientes	-	1 ml

Ambos riles fueron preparados en matraces de aforo de 1 L añadiendo una alícuota de 1 ml de micronutrientes. Los componentes y especies químicas de los cuales se componen los micronutrientes se destacan en las tablas Tabla 6 y Tabla 7 para la nitrificación y desnitrificación respectivamente.

Tabla 6. Componentes micronutrientes de nitrificación
(Beristain-Cardoso *et al.*, 2010).

Compuesto	Fórmula	Concentración g/L
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	2,39
Cloruro Férrico	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	5,0
Cloruro de cobalto	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,6
Cloruro de Manganeso	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5,0
Sulfato de Cobre	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,5
Cloruro de calcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5,5
Molibdato de amonio	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1,1
Cloruro de magnesio	$MgCl_2 \cdot 5H_2O$	5,0

Tabla 7. Componentes micronutrientes de desnitrificación.
(Beristain-Cardoso *et al.*, 2010).

Compuesto	Fórmula	Concentración g/L
Molibdato de sodio dihidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2,0
Sulfato Ferroso (I) heptahidratado	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	30
Cloruro de Zinc	$ZnCl_2$	1,0
Carbonato de calcio	$CaCO_3$	2,0
Tetrahidrato de cloruro manganeso (II)	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,5
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,25
Cloruro de cobalto hexahidratado	$CoCl \cdot 6H_2O$	0,25
Ácido Clorhídrico	HCL (37%)	50
Cloruro de níquel (II) hexahidratado	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0,25
Ácido Bórico	H_3BO_3	0,25

La aireación (o mezclado en el caso de la desnitrificación) corresponde a la operación del reactor SBR y es la fase en la cual se lleva a cabo la remoción de compuestos nitrogenados. El fin de esta etapa, es lograr obtener una remoción casi total del sustrato principal dentro del reactor, dando paso al asentamiento y posteriormente decantación del líquido contenido dentro de este, permitiendo remover el sobrenadante libre de biomasa en forma de efluente. El proceso se repite, añadiendo un nuevo RIL de alimentación y con ello se da paso a otro ciclo de operacional.

En la figura 11, 12 y tabla 8, se esquematizan los reactores utilizados y entregan los principales componentes y la dimensión de sus partes.

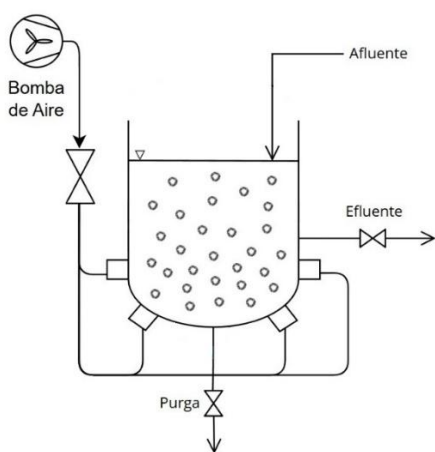


Figura 11. Reactor de Nitrificación
Fuente: Elaboración Propia

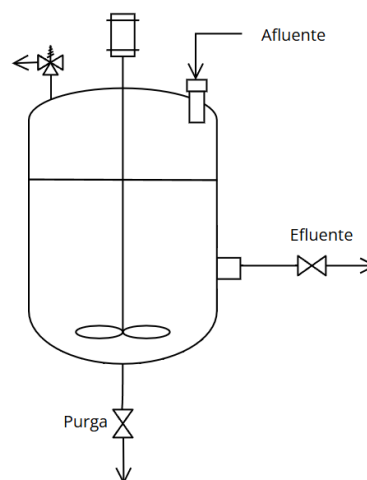


Figura 12. Reactor de Desnitrificación
Fuente: Elaboración Propia

Tabla 8. Subdivisiones y dimensiones de los reactores de nitrificación y desnitrificación.

Componentes	Nitrificación	Desnitrificación
Volumen del Reactor	1,5 L	1,5 L
Volumen Sobrenadante	1 L	1 L
Volumen Decantado	0,5 L	0,5 L

La configuración de los reactores contempla una salida de efluentes a la mitad de estos, permitiendo decantar los reactores y con ello retener el lodo que contiene las colonias bacterianas dentro del reactor. Para la nitrificación, el reactor se encuentra abierto a la atmósfera y es alimentado desde la parte superior.

En la desnitrificación, la alimentación ingresa por medio de una tubería sellada que se abre para hacer ingreso del RIL sintético y luego es cerrada para mantener las condiciones anaerobias. El reactor sellado contiene una válvula de alivio de presión de aire, permitiendo eliminar el gas nitrógeno generado en la reducción de los compuestos nitrogenados, evitando un aumento de presión dentro de este. A continuación, se observa en las Figura 13, Figura 14 y Figura 15 las fotografías de los reactores de desnitrificación y la nitrificación.



Figura 13. Fotografía de los reactores de Desnitrificación, con el agitador mecánico incorporado



Figura 14. Fotografía de reactor de nitrificación y las mangueras de suministradoras de aire.



Figura 15. Fotografía del interior del reactor de nitrificación destacando los dosificadores de aire de piedra.

Los reactores se alojaron dentro de una cámara aislada térmicamente, permitiendo mantener condiciones adiabáticas a una temperatura de 35 °C, por medio de un controlador de temperatura que se encuentra en la cámara que retroalimenta un termo calefactor de aire.

En la Tabla 9, se describen los materiales empleados en el montaje de los reactores, junto a los medidores de pH y oxígeno utilizados.

Tabla 9. Materiales empleados en la configuración experimental.

Material o Equipo	Modelo o características	Función
Bomba de Aire	SB-248A	Suministrar aire en el fondo de los reactores
Termoventilador	Havel FH 2000	Fijar set point de T°
Controlador de Temperatura	Autonics® TC4Y	Controlar funcionamiento del termoventilador
Medidor de Temperatura	CU50 RTD	Medidor de temperatura
Mangueras	MasterFlex, silicona	Transporte de Aire
Agitadores mecánicos	Phoenix RSO-20A	Homogenizar el lodo en la desnitrificación
Medidor de Oxígeno disuelto	HANNA HI9146 con cable de 4 m	Medir la concentración de oxígeno disuelto
Medidor de pH	HANNA HI5222	Medir el pH de los reactores

3.2 Métodos analíticos y parámetros operacionales.

Si bien, ambos procesos de remoción de nitrógeno empleados son teóricamente distintos, el monitoreo, los métodos analíticos y los parámetros de control experimentales son relativamente similares.

Los parámetros experimentales, junto con los métodos analíticos considerados para monitorear la remoción de nitrógeno, el crecimiento de la biomasa y las condiciones ambientales en ambos tipos de procesos, se detallan en la Tabla 10, los cuales, se encuentran descritos en el Anexo A: Metodologías de determinación por espectrofotometría., Anexo B: Metodología de determinación de suspendidos volátiles. y Anexo C: Metodología de determinación de carbono orgánico.

Tabla 10. Parámetros de control, variables, metodología y objetivo de medición.

Parámetro	Variable	Objetivo	Metodología	Referencia
Sólidos suspendidos totales	SSV	Crecimiento Bacteriano	Gravimetría	(Rice <i>et al.</i> , 2017)
pH	pH	Control Operacional	Electrodo selectivo	(Rice <i>et al.</i> , 2017)
Amonio	NH ₄ ⁺	Concentración de amonio	Espectrofotometría	(Rice <i>et al.</i> , 2017)
Nitrito	NO ₂ ⁻	Concentración de nitrito	Espectrofotometría	(Rice <i>et al.</i> , 2017)
Nitrato	NO ₃ ⁻	Concentración de nitrato	Espectrofotometría	(Rice <i>et al.</i> , 2017)
Carbono Total	TOC	Concentración de carbono total	TOC	(Rice <i>et al.</i> , 2017)
Oxígeno disuelto	DO	Medición de Oxígeno Disuelto	Electrodo selectivo	(Rice <i>et al.</i> , 2017)

La tasa de remoción de amonio y nitrato, determinaron el tiempo de residencia de la nitrificación y desnitrificación respectivamente, donde, en el enriquecimiento, la tasa de consumo de estos compuestos aumentó paulatinamente hasta estancarse en un valor relativamente constante, obteniendo el fin de la etapa de activación o enriquecimiento. En esta esta investigación, se utilizó acetato de potasio como fuente de materia orgánica para la desnitrificación, debido a que posee una menor toxicidad y volatilidad que el metanol y el etanol, los cuales son dos fuentes dadoras de electrones que conllevan a un alto rendimiento operacional (Albina *et al.*, 2019).

3.3 Puesta en marcha.

La experimentación se dividió en tres fases: enriquecimiento, estabilización y evaluación de aditivos.

3.3.1 Fase de enriquecimiento

La etapa de enriquecimiento microbiano consistió en la más importante a realizar durante esta investigación, ya que definió la tasa de remoción de nitrógeno junto con el tipo y la eficiencia de remoción de los microorganismos que se encontrarán en la colonia microbiana durante la fase de evaluación. Esta etapa, comenzó con la inoculación del reactor madre empleando lodos aletargados nitrificantes y desnitrificantes suministrados por el laboratorio de RILes del departamento de Ingeniería química y ambiental (IQA)

Inicialmente, se inóculo con 0,5 L de lodo los reactores SBR descritos anteriormente. Este lodo requirió “activarse”, por lo cual se le alimentó con un ril sintético acorde al proceso de remoción de nitrógeno a enriquecer (nitrificante o desnitrificante), permitiendo obtener los sustratos y características fisicoquímicas óptimas para el metabolismo microbiano. El término de esta etapa, se logró obtener porcentajes de remoción sobre el 90% del sustrato principal dentro del reactor junto con estabilizar el tiempo de residencia en el cual las bacterias logran efectuar la remoción de nitrógeno.

3.3.1.1 Enriquecimiento de lodo nitrificante

La concentración de oxígeno se monitoreó con un medidor de oxígeno disuelto y se ajustó diariamente la válvula que proviene desde la bomba aire, con el fin de obtener una concentración de oxígeno disuelto en exceso entre 4 a 6 mg/l (Wang y Chu, 2016), utilizando una temperatura de operación de 35 °C.

La operación de este reactor “madre”, se realizó durante los ciclos necesarios para lograr estabilizar el tiempo de residencia del amonio dentro del reactor. Si bien, el amonio es el sustrato principal en el cual se basa este análisis, se debe considerar la producción y consumo de nitrito a lo largo de los ciclos, ya que las bacterias oxidantes de nitrito poseen un metabolismo más lento, debido a una afinidad más baja al oxígeno frente a las bacterias oxidantes de amonio (Ward *et al.*, 2011). El término de esta etapa se consideró completa, una vez que no se presentó acumulación de nitrito en el reactor, junto con obtener eficiencias de remoción de nitrógeno superiores al 90%, ya que este debe consumirse a medida se va produciendo desde la oxidación de amonio y no acumularse dentro del reactor, logrando así obtener un lodo que realiza el proceso de nitrificación completa.

El registro de estos resultados se realizó semanalmente, dejando fijo el tiempo de residencia del reactor con el fin de evaluar el cambio de la actividad metabólica durante un intervalo de tiempo fijo.

3.3.1.2 Enriquecimiento de lodo desnitrificante

El enriquecimiento de la desnitrificación empleó la misma filosofía de montaje que la nitrificación, utilizando en este caso el ril característico de desnitrificación y un inóculo de 0,5 L, añadidos a reactores anaerobios con agitación. La velocidad de agitación se estableció en 1100 RPM, con el fin de obtener homogeneidad dentro de los reactores y potenciar el metabolismo.

A diferencia de la nitrificación, el único parámetro que cambió durante el tiempo en función del metabolismo corresponde al consumo de nitrato, el cual se reduce directamente a nitrito. Una acumulación de nitrito en el efluente significa un problema en la desnitrificación global producto de un problema operacional, por lo cual solo se puede determinar que la desnitrificación es completa cuando no exista acumulación de este compuesto en el efluente de los reactores.

3.3.2 Fase de estabilización

El lodo obtenido durante la fase de enriquecimiento se decantó y dividió en tres partes iguales añadiendo cada una a un reactor SBR, el cual emplea la misma configuración de la fase anterior y los mismos riles sintéticos. Si bien en teoría los lodos poseen la misma eficiencia en los reactores al ser separados, las diferencias estructurales que puedan presentar los reactores, provocan diferencias de volumen en el interior, lo cual hizo necesario efectuar un estudio de variabilidad que pueda existir en el funcionamiento entre estos, caracterizando la diferencia de remoción de nitrógeno y los parámetros operacionales.

Estabilizados los reactores, se determinó el reactor de mayor rendimiento como control y se agregó a la alimentación de los dos restantes los aditivos a utilizar, a los cuales se les denominó S1 y S2. Adicionalmente, se analizó la diferencia de oxígeno disuelto dentro de los reactores, observando pequeñas pero significativas diferencias operacionales que permitieron minimizar los errores experimentales que compliquen el contraste de resultados entre estos, ya que el suministro de oxígeno correspondía a la principal limitante de este proceso.

Es importante mencionar que la estabilización permitió caracterizar el ciclo operacional en cada reactor y con ello determinar que los ciclos operacionales son similares y contrastables entre los tres reactores, antes de añadir los aditivos en la fase de evaluación.

Tabla 11. Concentración de oxígeno disuelto dentro de los reactores de nitrificación.

Proceso	Reactor Control [-]	Reactor S1 [-]	Reactor S2 [-]
	mg/L	mg/L	mg/L
Concentración de Oxígeno Disuelto	5,188	5,246	5,478

3.4 Filosofía de operación y parámetros experimentales.

La filosofía de operación consistió en evaluar el efecto de los aditivos en los cambios de los parámetros de oxígeno, amonio y nitrito para la nitrificación, como el nitrato, nitrito y carbono total remanente en la desnitrificación. Los cambios operacionales fueron contrastados con el funcionamiento del reactor de control, al modificar la concentración de los aditivos añadidos en la alimentación de los reactores.

El cambio de la concentración de los aditivos en la nitrificación se presenta en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración de aditivos añadidos (nitrificación)

Ciclo operacional	Control	S1 mg/L	S2 mg/L
1	-	0	0
2	-	6,25	6,25
3	-	12,5	12,5
4	-	18,5	18,5
5	-	25	25
6	-	37,5	37,5
7	-	50	50
8	-	75	75
9	-	100	100

Para la nitrificación, se utilizó un tiempo de residencia operacional de 4 días, con un ciclo adicional de 2 días sin aditivos con el fin de eliminar efectos acumulativos que puedan ocurrir entre cada uno, junto con permitir realizar la mayor cantidad de mediciones en la semana y registrar la muestras con tiempos de operación similares.

La concentración de aditivos, junto a la cantidad de ciclos realizados en la evaluación de desnitrificación, se presenta en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentración de aditivos añadidos (desnitrificación)

Ciclo operacional	Control	S1 mg/L	S2 mg/L
1	-	0	0
2	-	6,25	6,25
3	-	12,5	12,5
4	-	25	25
5	-	37,5	37,5
6	-	50	50
7	-	75	75
8	-	100	100

La desnitrificación, consideró un tiempo de residencia de 2 días contemplando dos ciclos de evaluación por semana, junto a un ciclo sin aditivos de 2 días, al igual que la nitrificación.

La evaluación de la influencia de los aditivos fue determinada en base al consumo de amonio o nitrato en la nitrificación y desnitrificación, la acumulación de nitrito en los reactores o cambios en los parámetros operacionales (como oxígeno o pH). Se debe considerar que la acumulación de nitrito significa un problema operacional, para lo cual se necesitó evaluar los parámetros operacionales y aplicar medidas correctivas que permitan eliminar la presencia de este intermediario.

3.4.1 Medidas Correctivas

Debido a la poca información que se tiene de los aditivos, se establecieron planes de contención frente a desequilibrios de los parámetros operacionales entre los reactores, permitiendo mantener una continuidad de evaluación comparativa entre ellos a lo largo de toda la fase de evaluación.

3.4.1.1 Oxígeno disuelto

Si bien en la Tabla 11 se considera una homogeneidad de la concentración de oxígeno disuelto entre reactores durante la fase de estabilización, se establecieron actividades correctivas en el suministro de oxígeno disuelto, donde se empleara en caso de una perturbación y desincronización entre los reactores un medidor de oxígeno disuelto para sincronizar el suministro de oxígeno, manipulando manualmente la válvula de suministro de aire, estableciendo una concentración de oxígeno disuelto en exceso (DO), entre los valores de 4 a 6 mg/L.

La estabilización de los reactores entre sí puede llevarse a cabo siempre y cuando no se presenten problemas técnicos, donde, en caso de que no se alcance la sincronización de suministro de aire deseada, se procederá a disminuir la concentración de oxígeno en el reactor de control, con el fin de poder operar en concentraciones similares entre los reactores, considerando concentraciones superiores a 2 mg/L de DO, con el fin de evitar la acumulación de nitrito.

3.4.1.2 pH

En caso de registrar variaciones del comportamiento del pH entre los ciclos operacionales, se propone recalcular el tampón fosfato salino, modificando las concentraciones de sales mono y bifosfato de potasio, permitiendo de mantener un pH operacional en la nitrificación entre los rangos de 7,0 – 7,4 [-] y en la desnitrificación de 7,3 – 7,7 [-], según lo considerado en el acápite 2.5.3 como condiciones óptimas de operación.

4 Resultados y Discusiones

Las fases y fechas en las cuales se realizaron los experimentos de nitrificación y desnitrificación se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 14. Duración y ciclos de los periodos de las etapas de nitrificación y desnitrificación.

Fase	Nitrificación		Desnitrificación	
	Duración (d)	Nº de ciclos	Duración (d)	Nº de ciclos
Enriquecimiento	33	5	24	6
Estabilización	21	3	7	3
Evaluación	45	9	36	8

La duración de la fase de enriquecimiento fue diferente para ambos experimentos, debido a la diferencia en el tiempo de residencia entre ellos. La activación del metabolismo de la nitrificación ocurrió en fases, activándose primero las bacterias AOB y luego las NOB. La desnitrificación en contraste, presenta tiempos de residencia operacionales variables, dependiendo de las concentraciones puntuales durante la obtención del efluente de los reactores.

Como se observa en la Tabla 14, la duración de los periodos de estabilización fue mayor en la nitrificación que en la desnitrificación, ya que los tiempos de residencia son diferentes para cada uno. La nitrificación utilizó un tiempo de residencia de 4 días, mientras que la desnitrificación fue de 2 días. Los porcentajes de remoción del sustrato principal que caracterizaron la etapa de estabilización se observan en la Tabla 15

Tabla 15. Promedio de eficiencia de remoción de sustrato principal en fase de estabilización.

Proceso	Reactor Control	Reactor S1	Reactor S2
	[%]	[%]	[%]
Nitrificación	96,09	95,13	95,22
Desnitrificación	96,40	95,74	95,10

4.1 Enriquecimiento Nitrificación

Los resultados de acumulación y el pH operacional promedio utilizados en el reactor madre durante la fase de enriquecimiento, se observan en la Tabla 16 evidenciando los cambios del rendimiento y acumulación de nitrito a lo largo de esta fase, considerando un tiempo de residencia del reactor de 4 días a partir de la tercera semana de operación. Se debe mencionar que, durante los primeros dos ciclos operacionales, la medición de los parámetros fue registrada durante los primeros 4 días, pero se extendió la operación a una semana completa, para permitir activar y enriquecer el metabolismo completo. Los resultados de las concentraciones de los productos y sustratos de la nitrificación, junto con el cambio de los parámetros operacionales se puede observar en la Tabla 16.

Tabla 16. Concentraciones de compuestos nitrogenados en fase de enriquecimiento nitrificante.

Ciclo Operacional	Afluente Amonio	Efluente Amonio	Efluente Nitrito	Efluente Nitrato	Acumulación Nitrito	Acumulación Amonio	Mediana pH	Porcentaje remoción de Amonio
Ciclo	TRH (d)	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	[%]	[-]	[%]
1	4	92,00	76,53	35,76	11,43	75,8	8,743	30,8
2	4	87,00	18,43	173,00	8,56	95,3	8,325	86,2
3	4	85,00	26,93	94,46	78,54	54,6	7,518	54,8
4	4	88,00	7,54	47,90	206	18,9	7,431	90,9
5	4	87,00	4,56	5,33	282	1,9	7,275	94,9

Desde la cuarta semana del enriquecimiento se logró estabilizar la tasa de remoción de amonio en comparación a las primeras tres, obteniendo remociones superiores al 90% y luego un 95%. Además, el tiempo operacional desde la cuarta semana se pudo establecer en 4 días, permitiendo lograr el objetivo de realizar ciclos semanales y operar los reactores con descansos sin aditivos de 3 días, para eliminar acumulaciones de aditivos y permitir recuperar el metabolismo microbiano. En la Figura 16, se observa la evolución del pH a lo largo de la fase de enriquecimiento. Se debe considerar que los 3 puntos mostrados en cada ciclo (colores diferentes) representan el pH de la alimentación, el efluente del segundo día de operación y el cuarto día de operación.

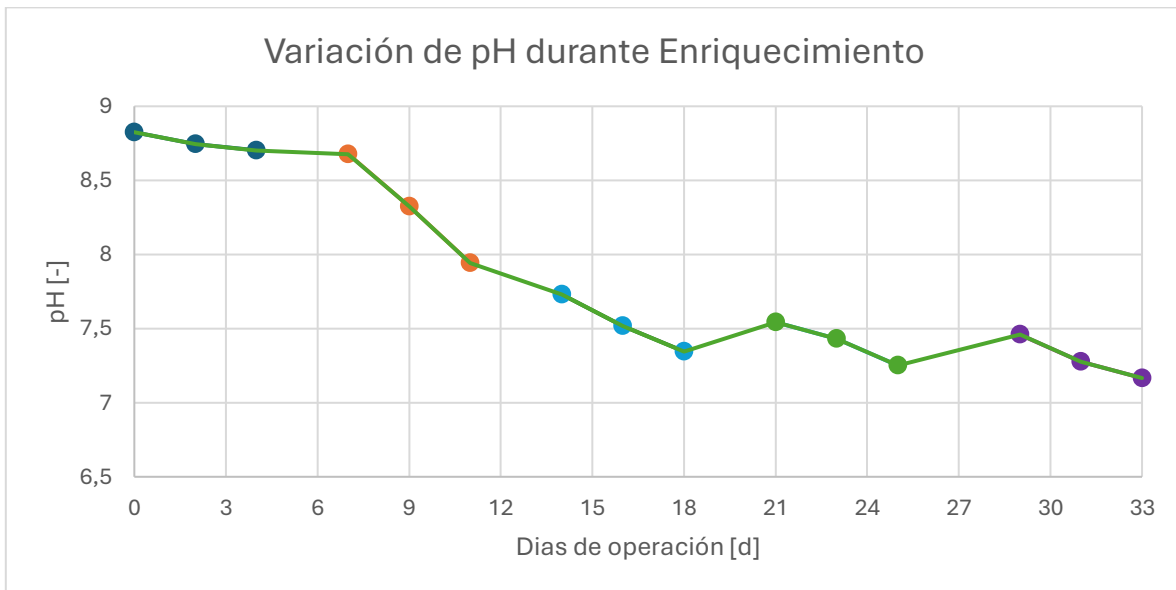


Figura 16. Variación de pH a lo largo de la fase de enriquecimiento en nitrificación, considerando las primeras 5 semanas.

En el primer ciclo de esta fase, el pH del medio era más alcalino y fue disminuyendo a medida que transcurrieron las semanas activándose las bacterias del lodo. Luego de la tercera semana, se obtienen las condiciones predilectas para poder efectuar una nitrificación completa, con valores de pH dentro de rangos estables y óptimos.

A lo largo de la fase de enriquecimiento, el perfil de concentración de los sustratos del efluente de cada ciclo de la nitrificación varia semana a semana, estabilizándose en el último ciclo (semana 5), logrando evitar la acumulación de nitrito junto con permitir la oxidación en mayor parte de este compuesto y el amonio inicial. El balance de nitrógeno total, se presentan en la Figura 17.

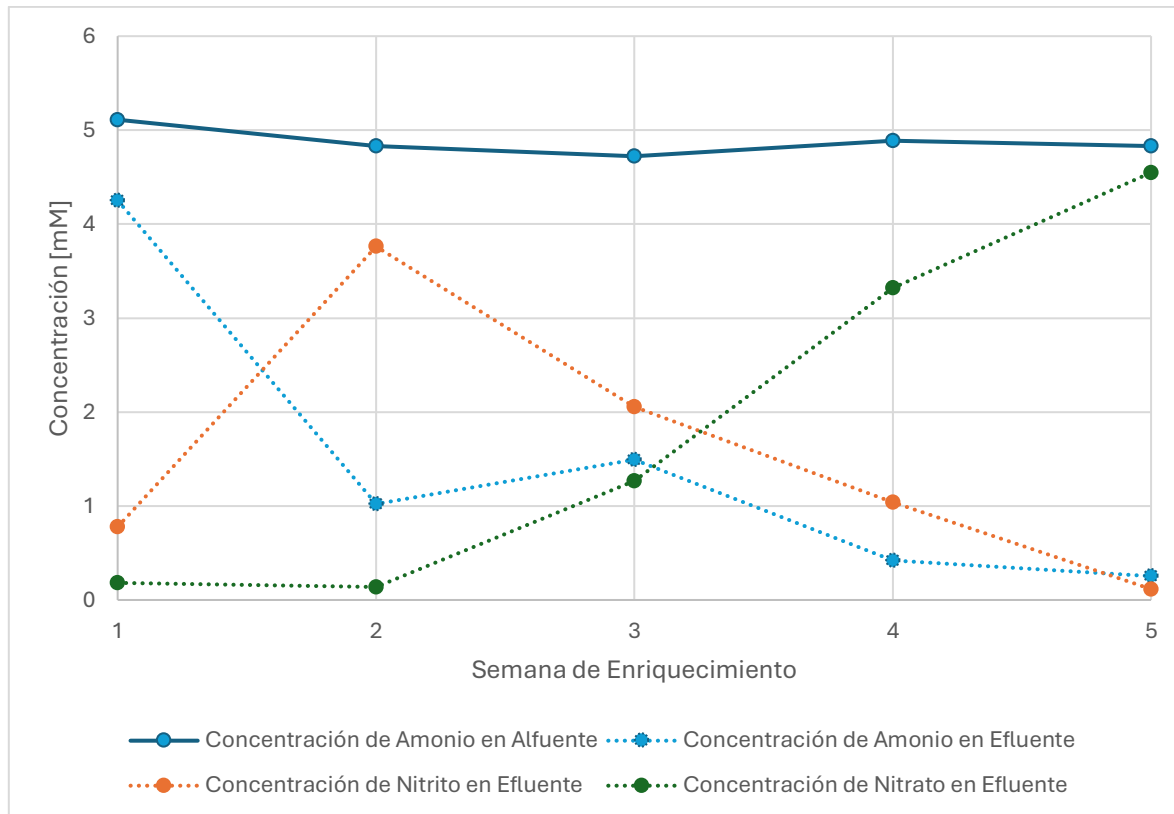


Figura 17. Balance de nitrógeno en fase de enriquecimiento nitrificante

La acumulación de nitrito aumento durante los primeros dos ciclos, debido a que las bacterias NOB requerían de la activación de las AOB para activar su metabolismo. La acumulación de nitrito luego de 4 semanas disminuyo bajo un 20%, desplomándose en acumulaciones bajo un 2% al final de la fase de enriquecimiento, lo cual permitió dar el término de esta fase y lograr obtener un lodo capaz de realizar una nitrificación completa.

Por último, en la tabla Tabla 17, se observa el cambio en la concentración de solidos suspendidos volátiles en el reactor, el cual entrega información acerca de la cantidad de lodo que se encuentra dentro del reactor al final de esta fase de experimentación.

Tabla 17. Evolución de los sólidos suspendidos volátiles a lo largo del enriquecimiento.

Semana	SSV mg/L
1	7846
3	7916
5	7876

4.2 Enriquecimiento desnitrificación.

Los resultados de la fase de enriquecimiento en la desnitrificación se observan en la Tabla 18.

Tabla 18 Resultados Reactor Desnitrificante Fase de Enriquecimiento en la Desnitrificación

Ciclo Operacional	Afluente Nitrato	Efluente Nitrato	Efluente Nitrito	Remoción de Nitrato	Remoción de nitrógeno	pH	TRH
	mg/L	mg/L	mg/L	[%]	[%]	[-]	d
1	548,21	455,00	52,23	17,00	4,16	8,1 - 8,3	3
2	552,92	180,59	21,36	67,34	62,13	7,5- 7,9	5
3	537,74	130,85	8,4	75,67	73,56	7,2 -7,5	6
4	479,08	34,13	8,42	92,88	90,51	7,2 - 7,6	5
5	515,74	40,52	4,24	92,14	91,04	7,3 - 7,6	2
6	556,59	10,78	1,32	98,06	97,74	7,1 - 7,5	3

La fase de enriquecimiento se realizó durante 24 días, realizando 6 ciclos operacionales. A diferencia de la nitrificación, el tiempo de residencia hidráulico (TRH) varió a lo largo del enriquecimiento con el fin de determinar un valor idóneo de operación. La estabilización y activación del metabolismo microbiano, se obtuvo en la quinta semana de operación, utilizando un tiempo de residencia operacional de 2 días, con una eficiencia de remoción de nitrógeno del reactor (nitrato y nitrito reducidos) de un 91,04 (%). El uso de 2 días como tiempo de residencia, permite operar dos veces por semana, obteniendo resultados en duplicado y con ello reducir los errores experimentales.

Si bien las etapas posteriores de estabilización y evaluación podrían utilizar 3 días de tiempo de residencia como variable operacional, el alto porcentaje de rendimiento (específicamente la reducción de nitrato y baja acumulación de nitrito) podría dificultar la evaluación y comparación de factores y efectos que puedan ocurrir en las etapas siguientes fases del experimento en la evaluación del efecto de los aditivos (positivos o negativos). Por estos motivos, se utilizó un tiempo de residencia de 2 días como variable operacional.

Evaluando la variación de pH a lo largo de la fase de enriquecimiento, se puede observar una estabilización similar a lo obtenido en la nitrificación, donde, desde el tercer ciclo operacional, se obtiene una estabilización de este parámetro, como se observa en la Figura 18.

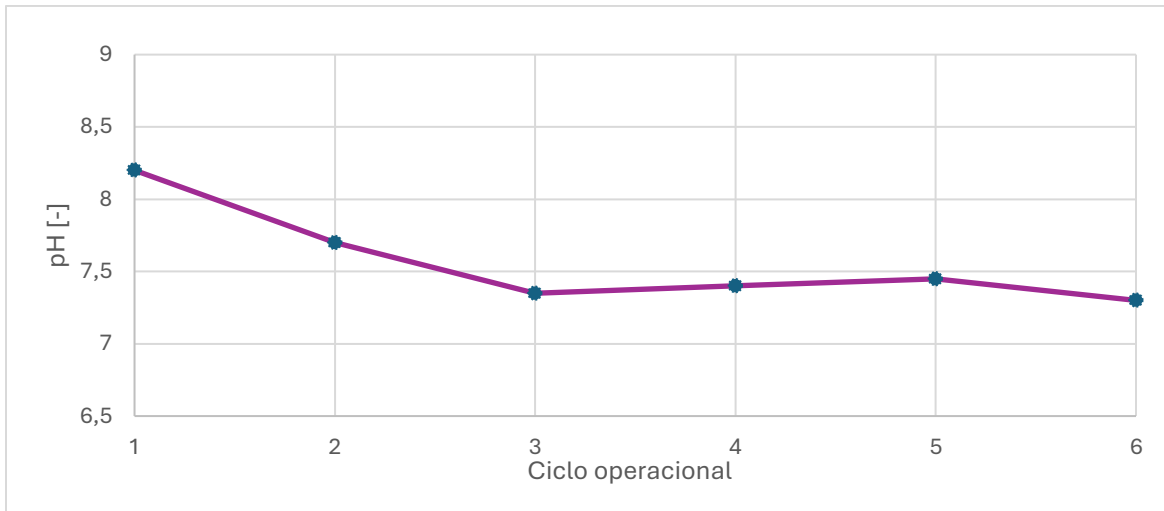


Figura 18. Variación de pH en el reactor madre en la fase de enriquecimiento de desnitrificación.

Como se observa, a partir de la tercera semana la variación del rango de pH operacional, se encuentra entre los valores de 7,1 y 7,5, el cual se utilizará como parámetro de control en los reactores de evaluación y estabilización durante las siguientes etapas (estabilización y evaluación). Adicionalmente, no se observa una acumulación de nitrito en el reactor luego de la cuarta semana, lo que permitiría establecer que no existen problemas en la reducción de compuestos nitrogenados y con ello se logra evitar una desnitrificación parcial que genere óxido nitroso (N_2O) u óxido nítrico (NO) dentro del reactor, permitiendo realizar el proceso de desnitrificación total como se observa en la Figura 19.

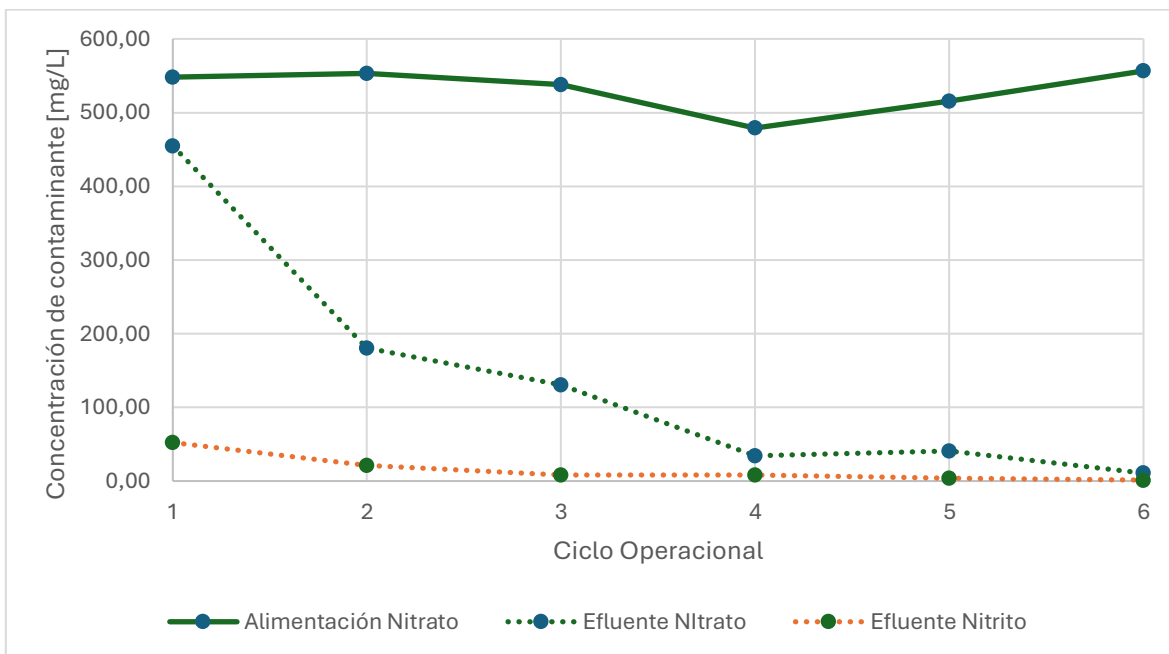


Figura 19. Concentración de compuestos nitrogenados en fase de enriquecimiento de desnitrificación.

4.3 Fase de evaluación y determinación de la influencia de los aditivos

A continuación, se presentan los resultados de la fase de evaluación observada en la operación de los dos procesos de remoción de nitrógeno realizados en ciclos semanales, considerando 5 días de operación (TRH de 4 días) y 2 días de descanso entre cada ciclo son aditivos ni observación.

4.3.1 Nitrificación

Durante esta fase se realizaron 9 ciclos operacionales, obteniendo resultados similares entre los tres reactores durante las primeras 5 semanas al utilizar aditivos en concentraciones menores a 25 mg/L. Durante este periodo, la presencia de los aditivos S1 y S2 no mostró mejoras en la remoción de nitrógeno ni acumulaciones de nitrito considerables dentro de los reactores al término del ciclo operacional, como se observa en la Tabla 19.

Tabla 19. Resultados experimentales de la nitrificación bajo influencia de aditivos.

Ciclo Operacional (semanal)	Concentración mg/L		Control	S1	S2	TRH
	S1	S2	Porcentaje de remoción de Amonio %			
1	0	0	95,9	94,8	96,41	4
2	6,25	6,25	95,3	94,6	94,95	4
3	12,5	12,5	94,1	96,2	96,49	4
4	18,5	18,5	95,7	95,0	94,20	4
5	25	25	97,3	93,7	94,88	4
6	37,5	37,5	96,7	88,7	94,43	4
7	50	50	97,5	81,3	92,62	4
8	75	75	95,7	72,3	88,87	4
9	100	100	96,5	60,5	82,79	4

Sobre concentraciones de 25 mg/L, el porcentaje de reducción de amonio del reactor con aditivo S1 se redujo alcanzando porcentajes de un 81,30% en concentraciones de. En concentraciones superiores a 50 mg/L de aditivo, el efecto sobre la remoción de amonio se intensifico, afectando esta vez también al reactor con el aditivo S2, pero con una intensidad menor que el reactor con el aditivo S1, donde, en concentraciones de 100 mg/L de ambos aditivos, se obtuvieron porcentajes de remoción de un 60,5 % y 82,79% para los aditivos S1 y S2 respectivamente.

La concentración de amonio en los reactores durante la alimentación y el efluente de cada ciclo puede ser observada en la Figura 20, donde se observa que existe una relación directa entre la acumulación de amonio y la concentración de los aditivos añadidos a los reactores, frente al reactor de control.

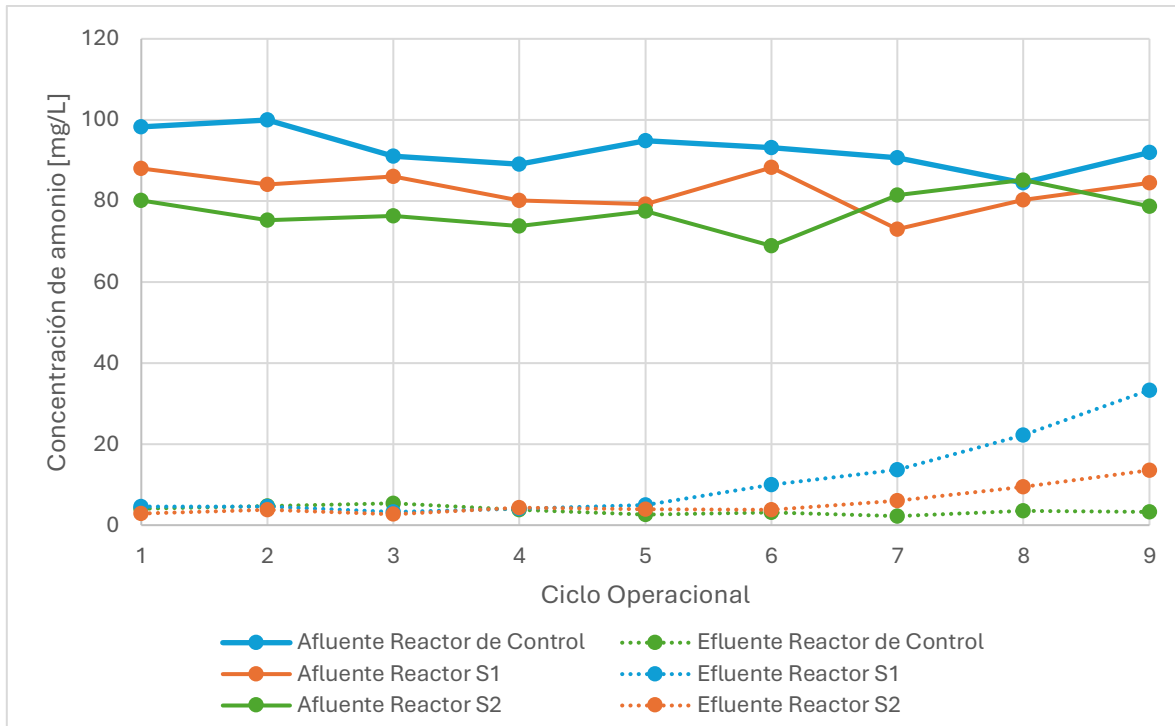


Figura 20. Concentración de amonio en afluentes y efluentes a lo largo de la fase de operación de nitrificación.

La acumulación de amonio dentro del reactor puede darse debido a una acumulación de nitrito que inhibe la reacción de amonio oxidación (Kim *et al.*, 2008), lo cual explicaría la disminución en la tasa de remoción de amonio. Para validar este fenómeno, se calculó el porcentaje de remoción de nitrógeno total en los ciclos operacionales, analizando la cantidad de nitrógeno no oxidado, frente al nitrógeno total inicial. El cálculo de este valor se estimó a partir de la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Remoción Nitrogeno} = \frac{\left(mgNTotal_{afluente} - \left(\frac{14}{46} \cdot mgNO_2 + \frac{14}{18} \cdot mgNH_4^+ \right)_{efluente} \right)}{mgNTotal_{afluente}} \cdot 100 \quad (21)$$

En este cálculo se contempla el nitrógeno total en el afluente, considerando la cantidad de amonio, nitrito y nitrato. En el efluente no se considera el nitrato, con el fin de determinar la cantidad de nitrógeno que queda por oxidar. Debido a estos resultados, se evalúa la acumulación de amonio y nitrito en los reactores S1 y S2, donde se obtiene que la reacción no se logra realizar completamente en los últimos ciclos operacionales, acumulándose nitrito al final del ciclo operacional, junto con limitar la oxidación de este compuesto a nitrato. En la Figura 21, se puede observar que la influencia del aditivo S1 afecta drásticamente la remoción de nitrógeno total dentro del reactor, sobre 37,5 mg/L de aditivo S1, considerando que existe una caída en el porcentaje de remoción de amonio y nitrito a lo largo del ciclo operacional. Este efecto se observa en el aditivo S2 recién en concentraciones de 100 mg/L

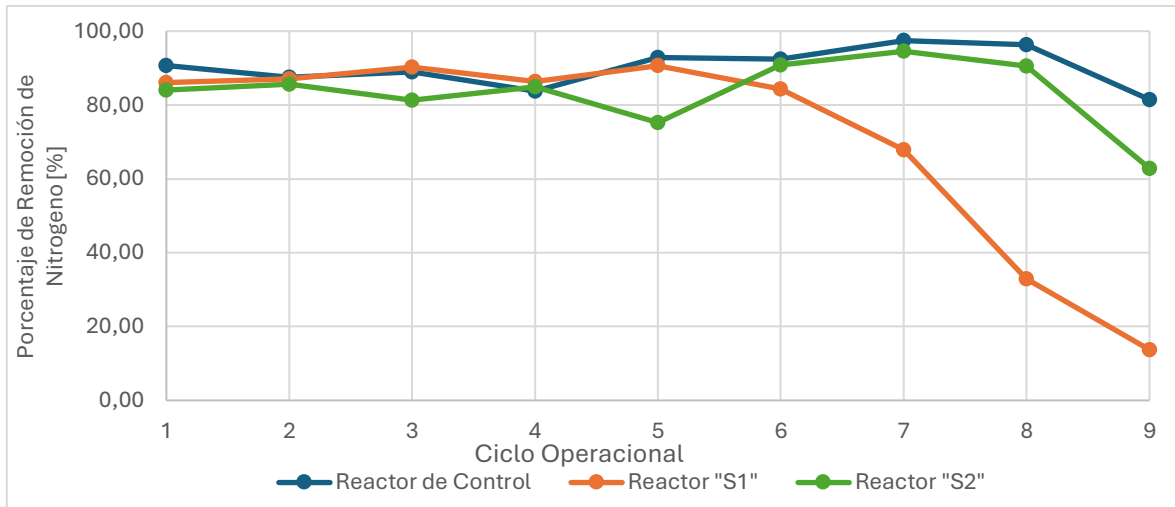


Figura 21. Remoción total de nitrógeno en el proceso de nitrificación.

En la Figura 22 y Figura 23, se presenta el cambio de la concentración de nitrito y nitrato a diferentes concentraciones de aditivo S1 y S2 durante un ciclo operacional.

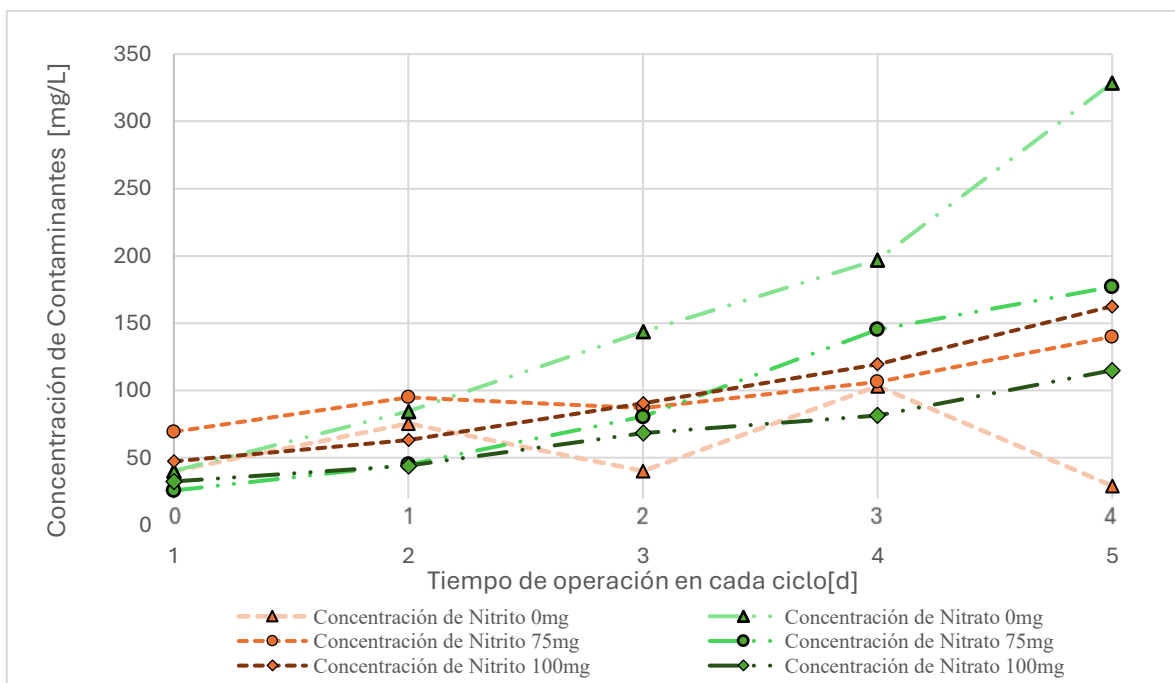


Figura 22. Evolución de nitrito y nitrato a diferentes concentraciones del aditivo S1.

La presencia del aditivo S1 sobre concentraciones de 75 mg/L, inhibe la oxidación de nitrito, obteniendo una acumulación de hasta un 162 mgNO₂/L a los 100 mg/L de aditivo de concentración. Este compuesto, se concentra durante el día 1, 2 y 3 del ciclo operacional, obteniendo 63, 90,1 y 120 mgNO₂/L respectivamente. La generación de nitrato se vio inhibida, obteniendo en la concentración más alta, un valor máximo de 115 mgNO₃/L, frente a los valores de nitrato a concentraciones más bajas de aditivo S1.

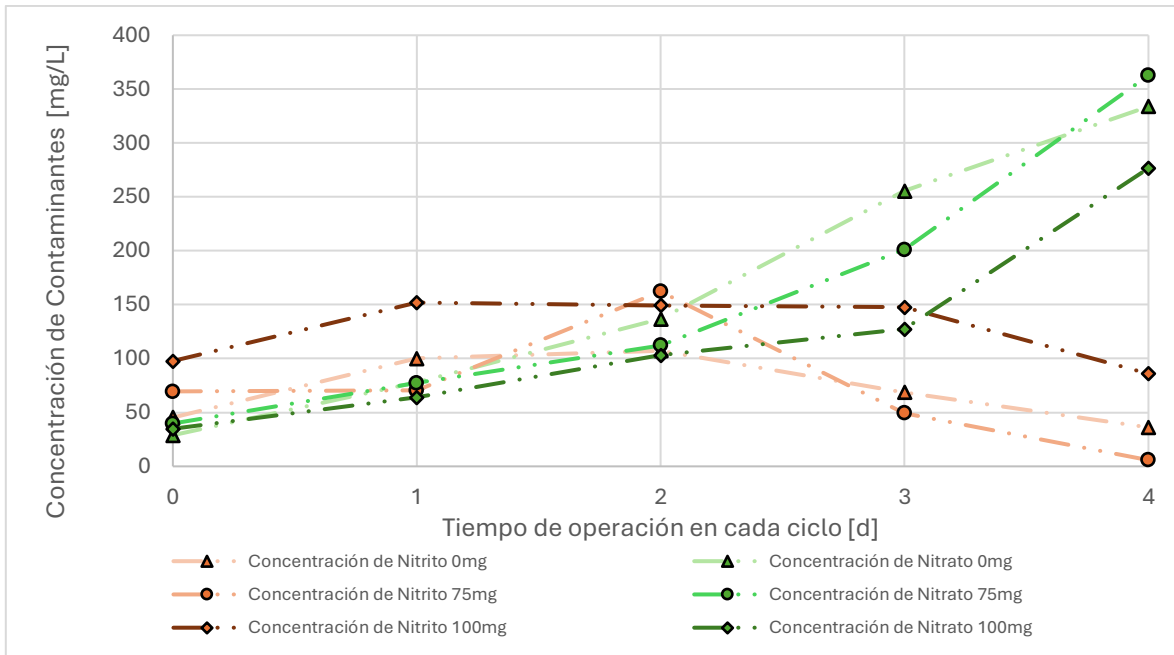


Figura 23 Evolución de nitrito y nitrato a diferentes concentraciones del aditivo S2.

Las altas concentraciones del aditivo S2 presento una acumulación menor de nitrito dentro del reactor al final del ciclo, desviándose ligeramente del comportamiento de las reacciones de oxidación, sin presencia de aditivo. La concentración a 100 mg/L de aditivo S2, no presento acumulaciones significativas de nitrito y nitrato, alcanzando en el efluente del día 5, una máxima concentración de 86,9 mgNO₂⁻/L. Para la concentración de nitrato, no se observan efectos significativos en la acumulación de este compuesto, aun bajo altas concentraciones del aditivo S2 (bajas tasas de generación de NO₃⁻).

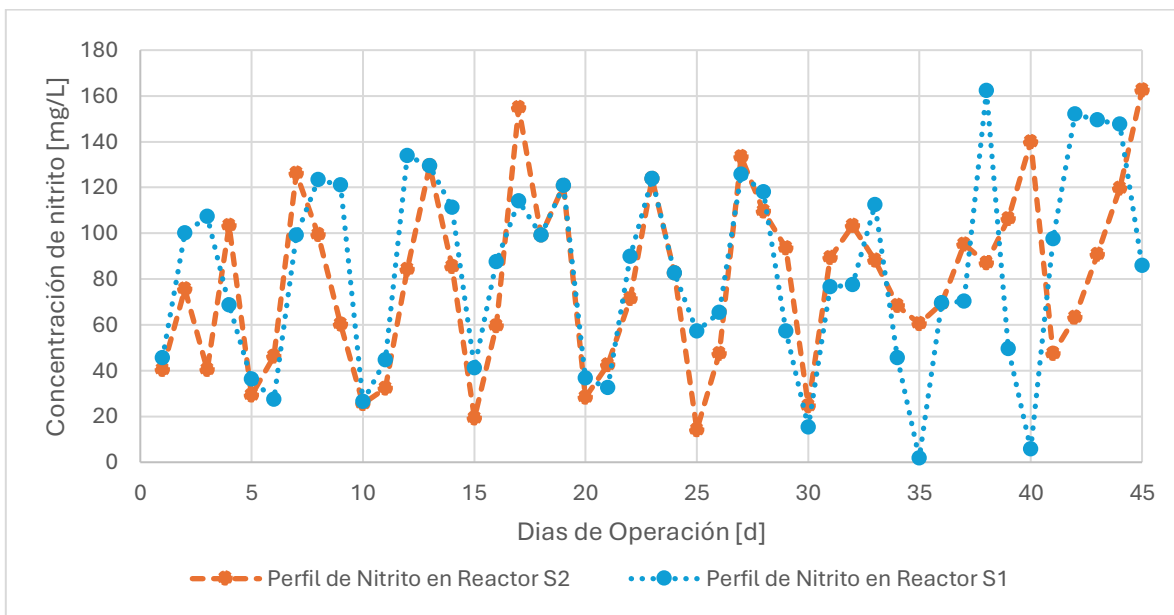


Figura 24. Perfil de nitrito a lo largo de la fase de evaluación

Como se mencionó anteriormente, las bajas concentraciones de aditivos (bajo los 25 días de operación) no ejercieron desviaciones en la acumulación de este compuesto entre los reactores que poseían los aditivos. Sobre los 35 primeros días de operación (50 mg/L de aditivo) las concentraciones descritas anteriormente comienzan a ser distintas, afectando el proceso de nitrato oxidación, junto con no permitir un análisis de contraste de la influencia de los aditivos. Por este motivo, los últimos 10 días (75 y 100 mg de contaminante), contienen la mayor desviación frente al resto de la fase operativa. Analizando la concentración de oxígeno disuelto en la fase de operación, se obtiene el siguiente comportamiento presentado en la Figura 25.

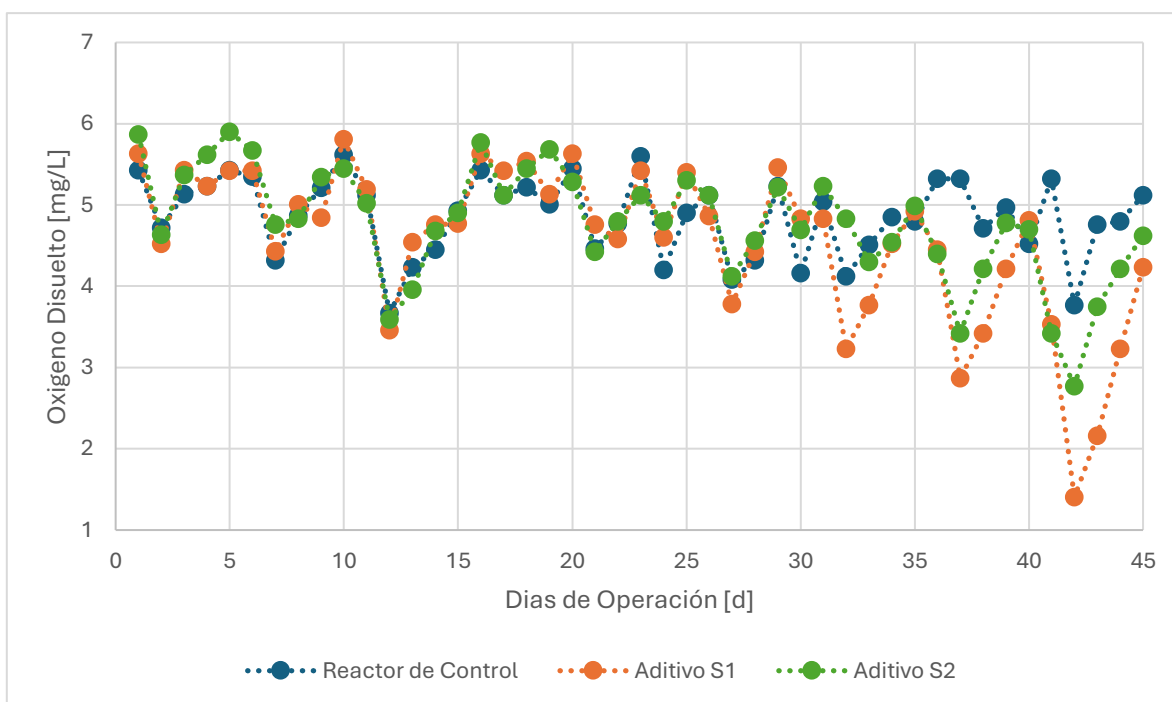


Figura 25. Concentración diaria de oxígeno disuelto durante fase de operación

Durante los tres últimos ciclos de la experimentación, la bomba del reactor con aditivo S1 trabajó con la válvula de paso de aire abierta al 100%, mientras que el reactor de control y el de aditivo S2 se encontraban trabajando en aperturas controladas, ajustando inicialmente al oxígeno al comienzo de cada fase operatoria. A pesar de ello, no se logró corregir la pérdida de oxígeno el reactor con aditivo S1, como se observa en naranja en la Figura 25. Se intuye de este resultado, que los aditivos disminuyen el oxígeno disuelto disponible en los reactores (se produce un leve efecto en concentraciones de 100 mg/L de aditivo S2), inhibiendo las reacciones de oxidación y con ello generar acumulaciones de amonio y nitrito en los reactores. A diferencia del oxígeno, el potencial de hidrogeno se mantuvo estable a lo largo de toda la fase de operación como se observa en la Figura 26, eliminando interacciones en los resultados del experimento durante toda la fase de evaluación.

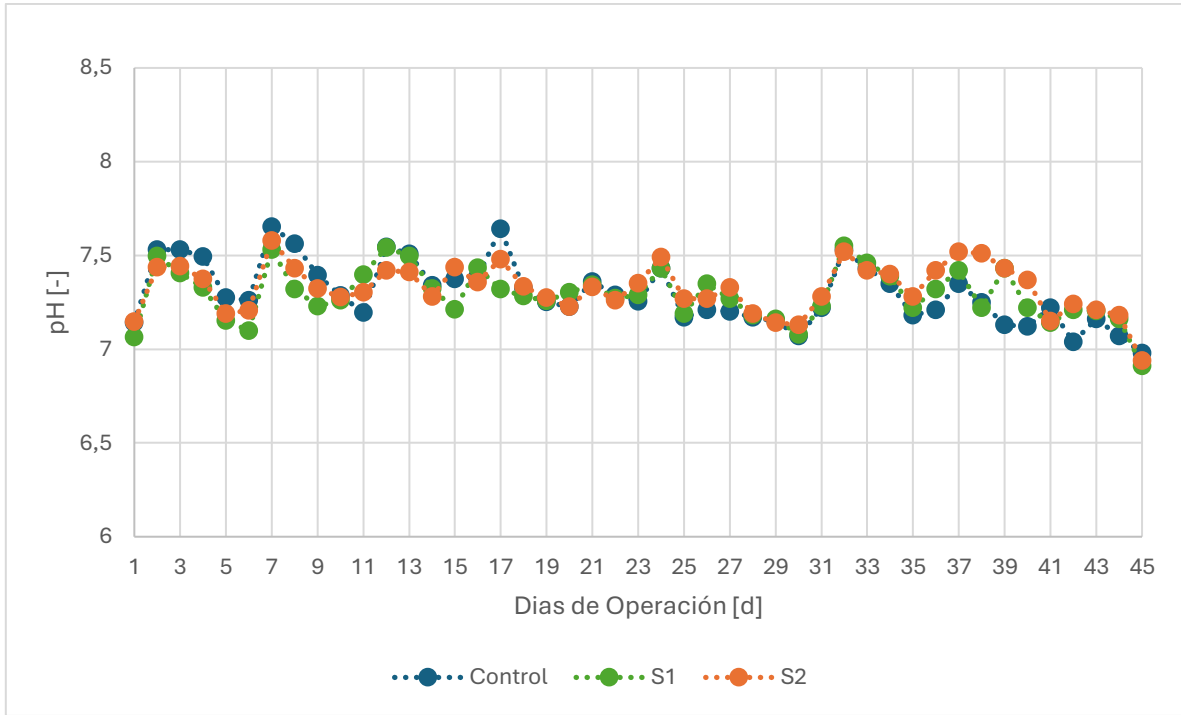


Figura 26. Potencial de hidrogeno a lo largo de la fase de operación en nitrificación.

Por último, en la Figura 27 se observa el cambio de biomasa a lo largo de la fase de evaluación, lo cual permite asegurar que no hubo pérdidas significativas de biomasa en los reactores, que influyeran en la desviación de los resultados entre los reactores.

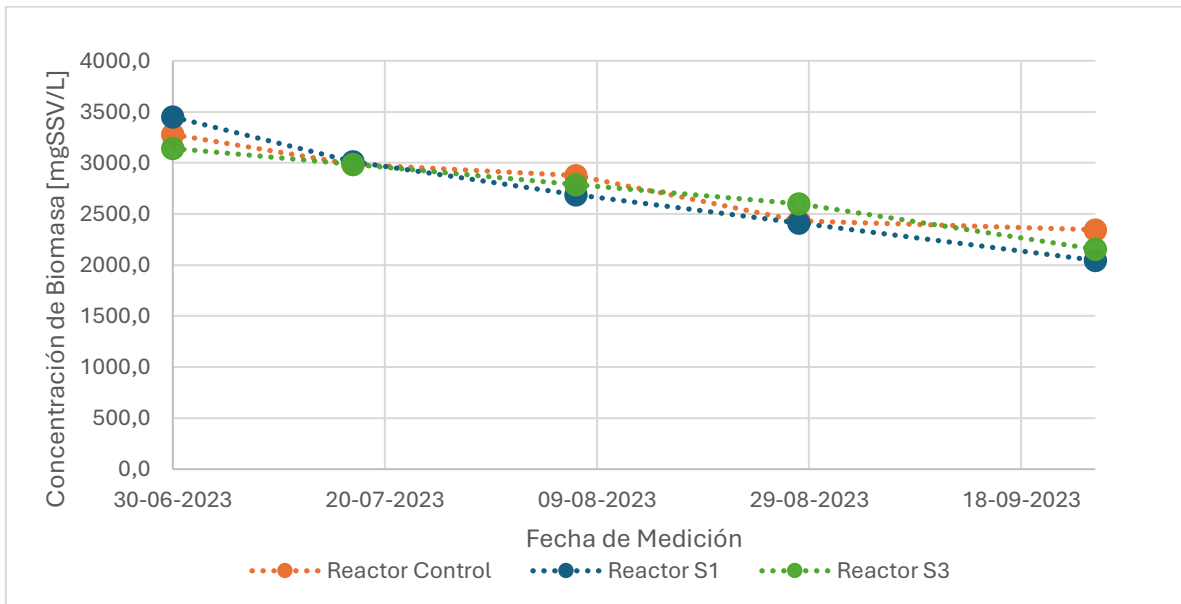


Figura 27. Evolución de la concentración de biomasa en la nitrificación

4.3.2 Desnitrificación

A diferencia de la nitrificación, la influencia de los aditivos no afectó significativamente la reducción de nitrato, sin embargo, existió concentración de este compuesto en el efluente, sobre 25 mg/L de los aditivos (4to ciclo operacional), como se observa en la Figura 28, siendo este efecto más notorio en el reactor con el aditivo S2.

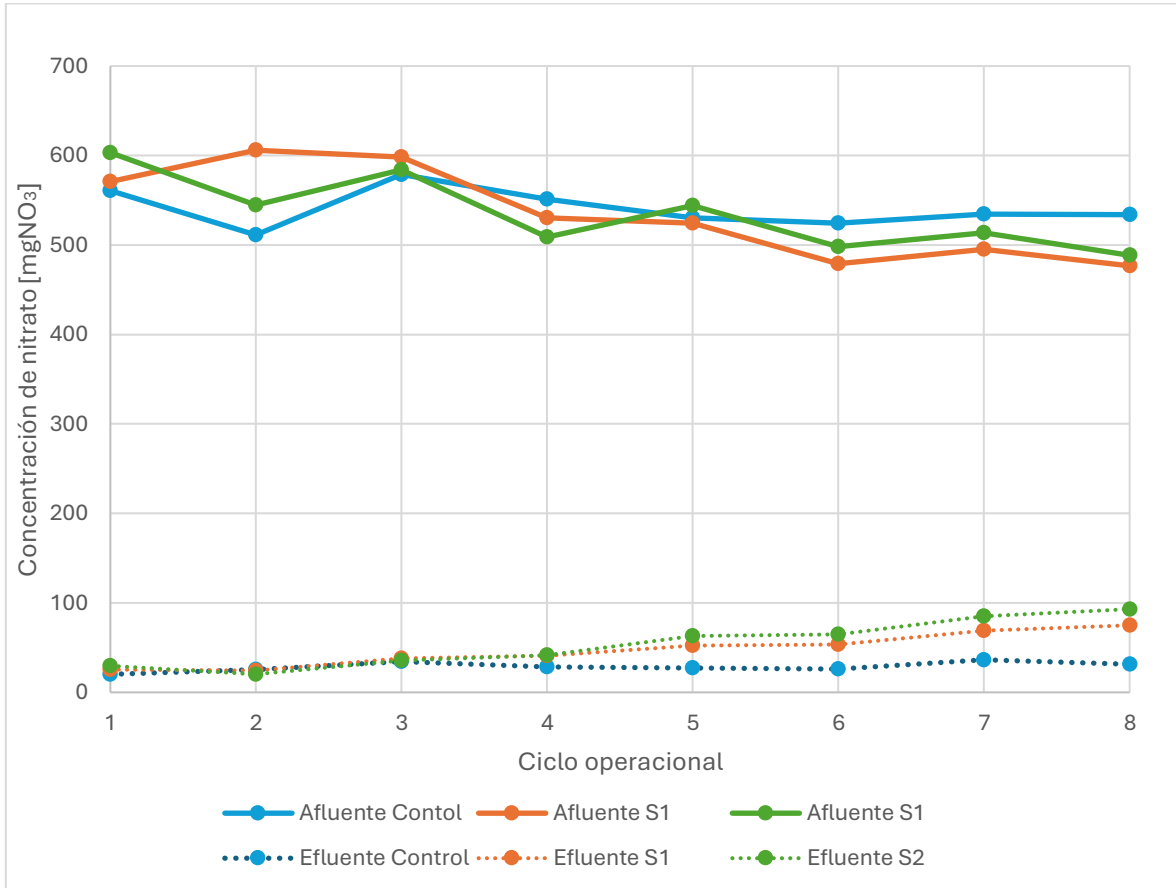


Figura 28. Concentración de nitrato en fase de operación.

Tabla 20. Aditivos añadidos en los ciclos operacionales.

Ciclo	1	2	3	4	5	6	7	8
Control	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	0	6,25	12,5	25	37,5	50	75	100
S2	0	6,25	12,5	25	37,5	50	75	100

La concentración de nitrato fue mayor en presencia del aditivo S2, acumulándose en 100 mg/L de aditivo, 92,3 mg/L de nitrato en el efluente de este reactor. Para el reactor S2 se observó el mismo comportamiento frente al aditivo, sin embargo, la concentración máxima de nitrato en el efluente registrada fue de 74,9 mg/L, en presencia de 100 mg/L de este aditivo.

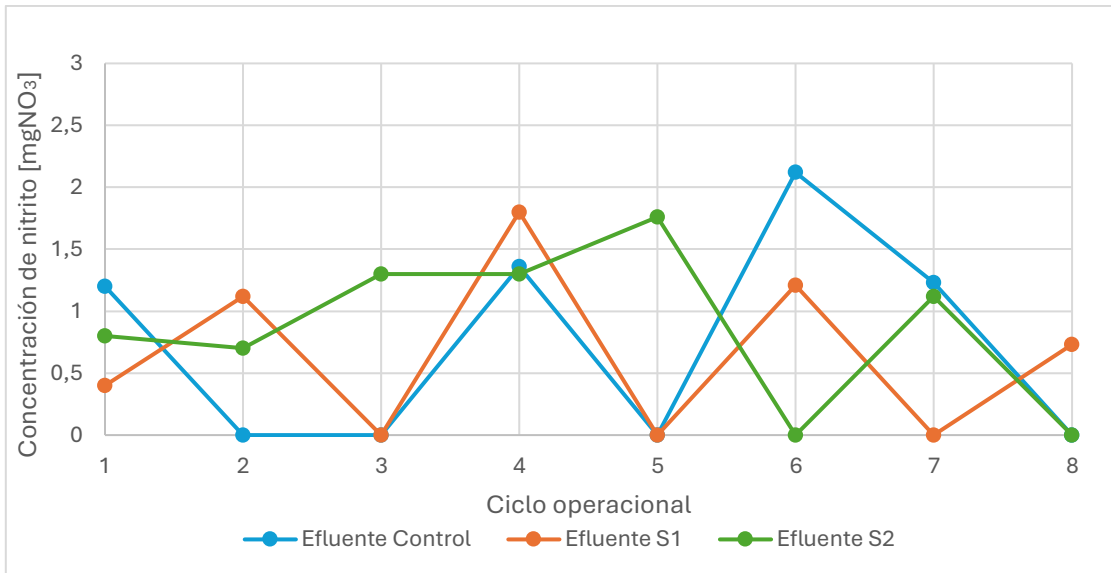


Figura 29. Concentración de nitrito en fase de evaluación de desnitrificación.

En la Figura 29, se presenta la concentración de nitrito en los efluentes de los tres reactores, donde, a diferencia de la nitrificación, no se observa una acumulación de nitrito en altas concentraciones de aditivo (sobre los 50 mg/L). De esto se infiere, que la reducción de nitrito no es limitada por la interacción de los aditivos con las bacterias heterótrofas. Teóricamente, se podría explicar este comportamiento debido a la afinidad que poseen distintas enzimas reductasas por el nitrito frente al nitrato, lo que podría explicar en parte la acumulación del nitrato frente al nitrito. Al igual que en la nitrificación, la presencia de los aditivos no presentó un efecto de variación de pH frente al reactor de control para los reactores con el aditivo S1 y S2, como se observa en la Figura 30.

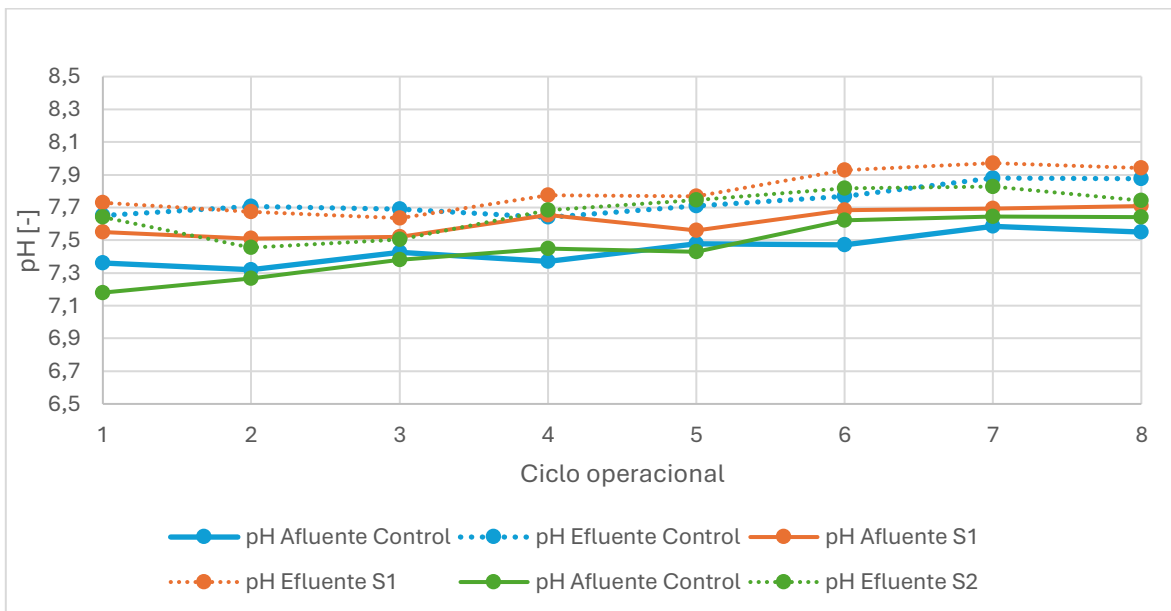


Figura 30. Variación de pH durante la fase de evaluación de desnitrificación.

Si bien se observa un aumento de pH entre el afluente de la desnitrificación y el efluente, este se refleja en los tres reactores, por lo que no se puede asumir que la presencia de los aditivos genera un impacto en la variación de este durante los ciclos operacionales. En la Figura 31, se presenta el porcentaje de reducción de nitrato dentro de los reactores.

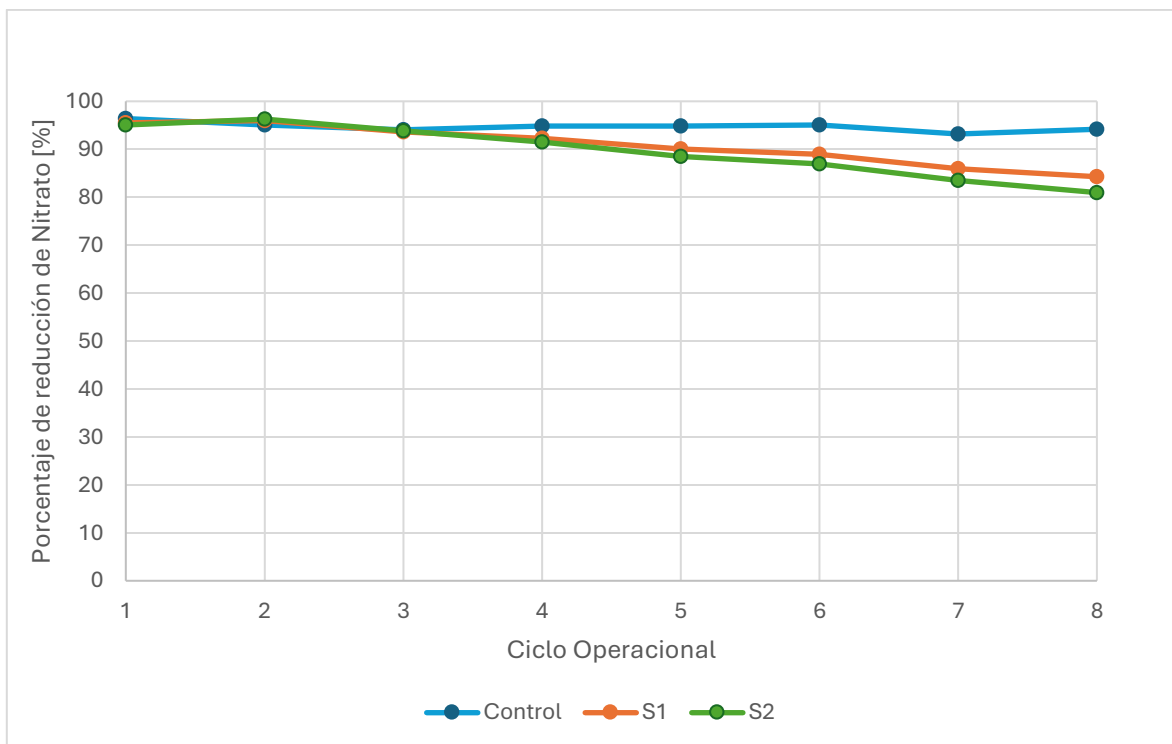


Figura 31. Rendimiento de reducción de nitrato (porcentaje)

Tabla 21. Porcentaje de remoción de nitrato.

Ciclo	Porcentaje de remoción de nitrato [%]		
	Control	S1	S2
1	96,40	95,56	95,09
2	95,09	95,98	96,28
3	94,09	93,61	93,88
4	94,84	92,32	91,54
5	94,86	90,07	88,48
6	95,04	88,98	86,98
7	93,19	85,95	83,51
8	94,13	84,27	80,96

El porcentaje de remoción de nitrato que se observa en la Tabla 21, expresa la cantidad que es reducida en la desnitrificación, donde, en altas concentraciones de los aditivos, la reducción se ve inhibida en ambos reactores, generando efectos más adversos el aditivo S2, sobre concentraciones de 25 mg/L, mientras que para el aditivo S1 esto se genera sobre 37,5 mg/L.

Por último, debido a que el metabolismo de las bacterias es heterótrofo, se evalúa el cambio de la tasa de remoción de carbono a lo largo de la fase de evaluación en la Figura 32,

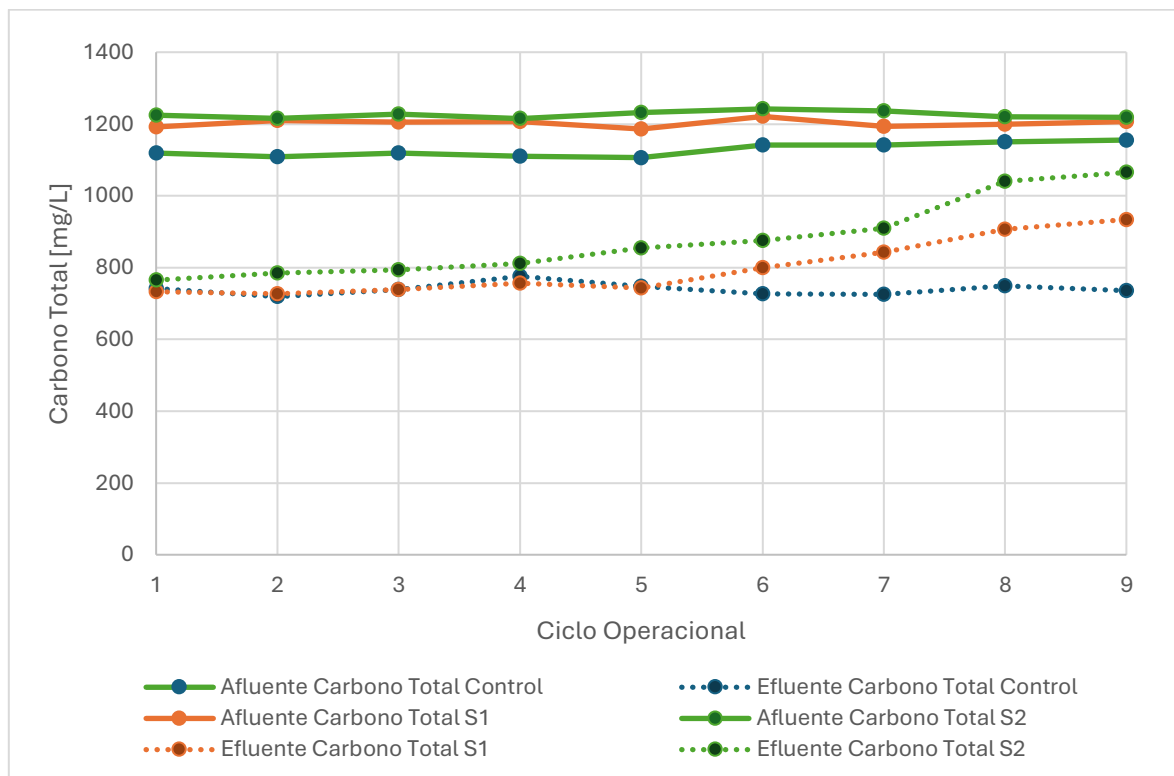


Figura 32. Concentración carbono total en los reactores durante fase de evaluación.

Análogamente a la acumulación de nitrato, se observa que los aditivos inciden en la tasa de consumo de carbono, donde, sobre los 25 mg/L (ciclo 4), se obtiene desviación frente al comportamiento del reactor de control. Este efecto es mayor para el aditivo S2, el cual concuerda con la disminución de la reducción de nitrato y explica en parte porque ocurre esta disminución al poseer los microorganismos un metabolismo heterótrofo.

La Figura 33, caracteriza el carbono orgánico total (TOC) al comienzo y final de los ciclos operacionales, donde a medida aumenta la concentración de aditivos (nuevamente sobre los 25 mg/L, se obtienen acumulaciones de carbono orgánico que no reacciona con el nitrato (Tabla 22), lo cual impide que se lleve a cabo la reducción de este y explica las acumulaciones de nitrato a medida que se aumenta la concentración de los aditivos.

Tabla 22. Evolución del porcentaje de remoción de carbono orgánico.

Porcentaje de remoción de carbono orgánico [%]									
Ciclo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control	47,39	50,95	49,01	40,52	46,07	51,48	50,24	53,48	50,30
S1	50,02	48,81	52,64	48,04	51,23	46,49	40,68	38,51	32,29
S2	42,78	47,56	46,01	41,64	39,04	34,64	31,61	26,68	24,12

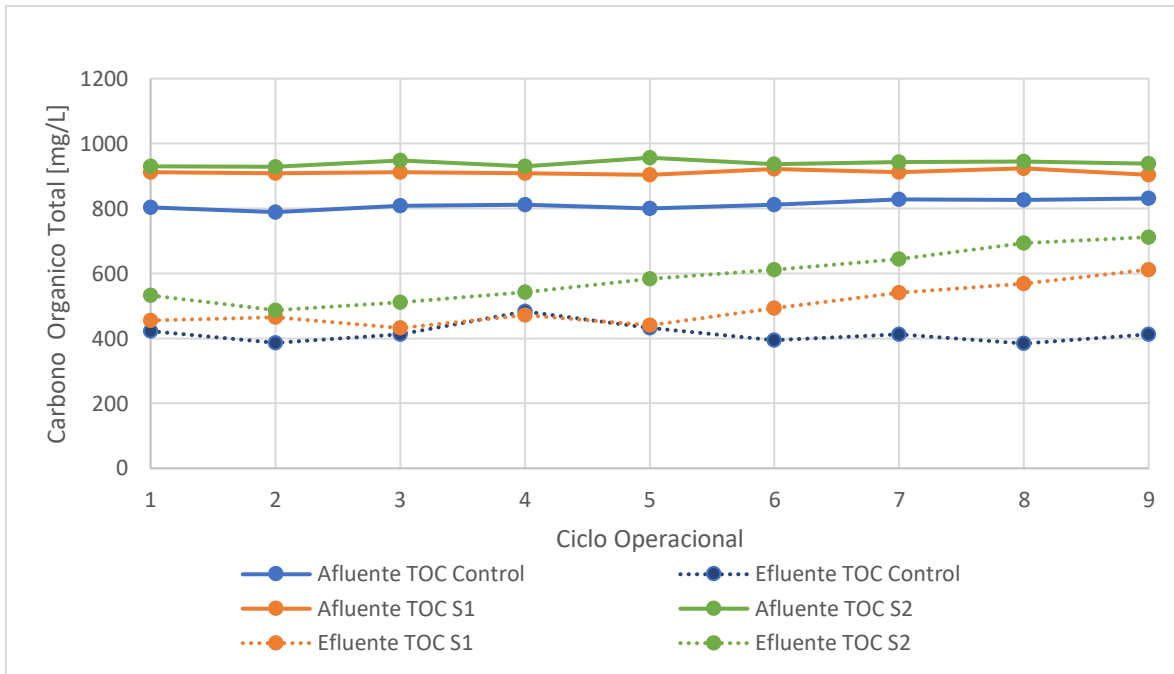


Figura 33. Concentración de carbono orgánico total (TOC)

El carbono inorgánico total que se presenta en la Figura 34, no refleja acumulaciones o reducciones de a lo largo del tiempo, comportamiento que se repite a lo largo de los tres reactores y es propio de los procesos de remoción de desnitrificación heterótrofos, en los cuales el metabolismo microbiano utiliza fuentes de carbono orgánicas como dadores de electrones (Pang y Wang, 2021).

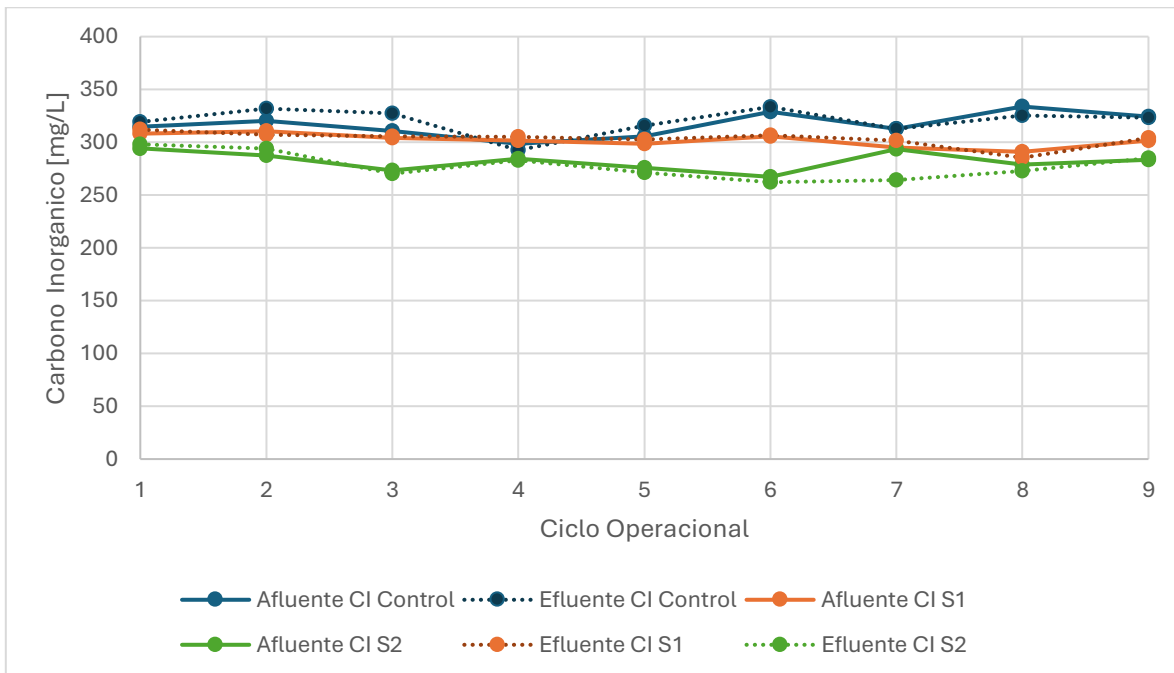


Figura 34. Concentración de carbono inorgánico (CI)

4.4 Discusiones:

4.4.1 Nitrificación

Como observaciones fuera de los resultados, se puede considerar que, en la nitrificación, la competitividad de los aditivos por el oxígeno conllevó a un desajuste de los parámetros operacionales de los reactores a altas concentraciones de aditivos, teniendo que ajustar y corregir la cantidad de oxígeno disponible en los reactores S1 y S2 frente al control durante los últimos dos ciclos (75 y 100 mg/L de aditivos). Este fenómeno, se presentó durante los primeros dos días de operación de cada ciclo al utilizar altas concentraciones de aditivos, generando una cantidad pequeña de espuma por la aireación de los reactores sobre los 37,5 mg/L de concentración de aditivo S1 en el reactor. La cantidad de espuma se incrementó desde los 75 mg/L, lo que requirió empleo de antiespumantes en el reactor S1, explicando en parte la baja concentración de oxígeno disuelto en ese reactor. El reactor S2, presentó un efecto más moderado de este fenómeno, apareciendo espuma recién a los 100 mg/L, sin embargo, no se necesitó la acción de añadir un antiespumante para llevar a cabo la nitrificación.

Si bien se desconoce la composición de los aditivos, se tiene conocimiento que los aditivos contienen saponinas de quillay, lo cual podría explicar la disminución de oxígeno disponible y con ello la aparición de espuma en la nitrificación en los ciclos operacionales que contenían concentraciones más altas de aditivos. Se especula que la acción de estos compuestos retrasó la actividad bacteriana al inhibir los mecanismos de oxidación y reducción de nitrógeno, por lo cual, para futuras investigaciones, se recomienda evaluar la demanda biológica de oxígeno y el potencial redox de las muestras de cada ciclo con y sin aditivos.

La presencia de los aditivos permitió acumular nitrito dentro del reactor, al ralentizar la oxidación de nitrito. Sin embargo, este efecto también puede llevarse a cabo sin generar nitrato, al operar a baja temperatura y oxígeno disuelto, en caso de que se busque realizar una nitrificación parcial (Yu *et al.*, 2021).

4.4.2 Desnitrificación

En la desnitrificación, la variación de carbono orgánico entre los tres reactores explica la acumulación de nitrato, debido a que el dador de electrones no estaría siendo utilizado para reducir las fuentes de nitrógeno reducido en la reacción. Por estos motivos, se infiere que los aditivos (especialmente el S2 en la desnitrificación), inhiben la reacción de reducción de desnitrificación como tal, pero se desconocen los factores que provocarían este fenómeno. Adicionalmente, no se observa un aumento de la concentración de carbono orgánico e inorgánico en el afluente de los reactores (alimentación), por lo cual, se podría descartar que los aditivos se acumulan en cada ciclo y proporcionan una fuente de carbono orgánica, que puedan reemplazar al acetato como dador de electrones.

5 Conclusiones

La operación de los reactores fue llevada exitosamente a lo largo de toda la investigación, sin presentar fallas operacionales no controlables o rectificables como desviaciones severas de pH u oxígeno disuelto durante gran parte de la realización de la investigación. Adicionalmente, se pudo registrar el efecto de los aditivos S1 y S2 en los procesos de remoción de nitrógeno de nitrificación y desnitrificación, evidenciando que, en altas concentraciones de aditivos, la remoción de nitrógeno se ve afectada, por medio de oxidación o reducción heterótrofa respectivamente.

Se determinó que la operación de nitrificación bajo los efectos de los aditivos, altero la cantidad de oxígeno disuelto disponible para el metabolismo microbiano en altas concentraciones, siendo este efecto mayor en presencia del aditivo S1. Adicionalmente a este efecto, se obtuvo una acumulación de nitrito en los reactores S1 y S2, lo cual sostiene que ambas reacciones de oxidación (AMO y NOB) se vieron afectadas por la presencia en altas concentraciones (sobre 50 mg/L) de aditivos, siendo este efecto más intenso para el reactor con el aditivo S1.

La desnitrificación se vio inhibida dentro del reactor S2 en altas concentraciones. La reacción de desnitrificación con aditivos sobre 25 mg/L, genero una acumulación de materia orgánica (en este caso acetato) y una disminución en la tasa de remoción de hasta un 32,29 y 24,12 % para los reactores con aditivo S1 y S2, frente a un 50,30% del reactor de control en máxima concentración de aditivos (100 mg/L). Se debe considerar, que la reacción para los tres reactores no se desvió del pH operacional, encontrándose entre los rangos de 7,3 a 7,7 [-].

En bajas concentraciones, no se registraron mejoras operacionales, aumento en las tasas de reducción u oxidación de nitrato, nitrito o amonio (en la nitrificación), e inclusive se presentaron problemas operacionales en los reactores operados con oxígeno. La evaluación de la desnitrificación no presento problemas operacionales que debieron ser corregidos, permitiendo llevar a cabo los procesos en altas concentraciones de aditivo sin mayores inconvenientes. Por este motivo, se concluye que los aditivos pueden ser utilizados sin mayores inhibiciones en concentraciones iguales o menores a los 25 mg/L.

Se debe considerar, que la adaptabilidad bacteriana permitió llevar a cabo la remoción de nitrógeno total en ambos procesos frente a los aditivos, a pesar de los problemas descritos anteriormente, ya que no se eliminó la actividad metabólica completamente, si no más solo se ralentizo la remoción de nitrógeno, independiente de las concentraciones de los aditivos. Para futuras investigaciones, se recomienda trabajar a bajas concentraciones de aditivos (bajo los 25 mg/L], empleando otras fuentes dadoras de electrones en la desnitrificación heterótrofa, como también investigar el efecto de otros parámetros operacionales en la nitrificación (oxígeno, pH, temperatura, concentración de biomasa).

6 Referencias

- Albina, P., Durban, N., & Bertron, A. (2019). Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review. *International Journal of Molecular Science*, 1-23.
- Barahona, A., Rubio, J., Gomez, R., Huiliñir, C., Borja, R., & Guerrero, L. (2023). Sequential Nitrification—Autotrophic Denitrification Using Sulfur as an Electron Donor and Chilean Zeolite as Microbial Support. *Water*.
- Beccari, M., Marani, D., & Ramadori, R. (1978). A Critical Analysis of Nitrification Alternatives. *Water Research Vol 13*, 185-192.
- Beristain-Cardoso, R., Gómez, J., & Méndez-Pampín, R. (2010). The behavior of nitrifying sludge in presence of sulfur compounds using a floating biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 8593-8598.
- Bioquímica . (2020). En T. McKee, & J. McKee, *Bioquímica. Las Bases moleculares de la Vida, Séptima Edición*. McGraw-Hill.
- Bradley, T., & Hass , C. (2020). Nitrification in Premise Plumbing: A Review. *Water*.
- Brozincevic, A., Grgas, D., Stefanac, T., Habuda-Stanic, M., Zelic, B., & Dragicevic, T. (2024). Cost Reduction in the Process of Biological Denitrification by Choosing Traditional or Alternative Carbon Sources. *Energies*.
- Burghate, S. P., & Ingole, N. W. (2013). Biological Denitrification – A Review. *Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering & Technology*.
- Campos, J., Vasquez-Padín, J., Fernández, I., Fajardo, C., Seca, I., Mosquera-Corral, A., & Pampín, R. (2002). Procesos avanzados de eliminación de nitrógeno: nitrificación parcial. Anammox, desnitrificación autótrofa. Universidad de Santiago de Compostela: Departamento de Enxeñaría Química.
- Chen, G., C.M van Loosdrecht, M., Ekama, G., & Brdjanovic, D. (2020). Biological Wastewater Treatment: Principles, Modeling and Design. En *Biological Wastewater Tratement: Principles, Modelling and Design, 2nd Edition* (págs. 161-238). London: IWA.
- Corruchaga, A., Casal, O., Palacios, A., & Casal, J. (2022). Influence of wind speed and ammonia concentration on its evaporation rate from aqueous solution spills. *Journal of Loss Prevention in The Process Industries, Volume 76*.
- Cua, L., & Stein, L. (2011). Efects of nitrite on ammonia-oxidizing activity and gene regulation in three ammonia-oxidizing bacteria. *Federation of European Microbiological Societies*, 169-175.
- González, P., Correia, C., & Moura, I. (2006). Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry 100* .

- González-Cabaleiro, R., Curtis, T., & Ofiteru, I. (2018). Bioenergetics analysis of ammonia-oxidizing bacteria and the estimation of their maximum growth yield. *Water Research*, 235-245.
- Gu, B., Chang, J., Ge, Y., & Galloway, J. (2013). The role of industrial nitrogen in the global nitrogen biogeochemical cycle. *Scientific Reports*.
- Huy Quoc Anh, D., Tantayotai, P., Cheenkachorn, K., & Sriyanun, M. (2015). Anammox Process: the Principle, the Technological Development and Recent Industrial Applications. *KMUTNB International Journal of Applied Science and Technology*, 237-244.
- Huyen, T., Fettig, J., & Meon, G. (2019). Kinetics and simulation of nitrification at various pH values of a polluted river in the tropics. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 54-65.
- Karanasios, K., Vasiliadou, I., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2010). Hydrogenotrophic denitrification of potable water: A review. *Journal of Hazardous Materials, Elsevier*, 20-37.
- Kim, J.-H., Guo, X., & Park, H.-S. (2008). Comparison study of the effects of temperature and free ammonia concentration on nitrification and nitrite accumulation. *Process Biochemistry* 43, 154-160.
- Li, X., Kappor, V., Impellieteri, C., Kartik, C., & Santo Domingo, J. (2015). Measuring nitrification inhibition by metals in wastewater treatment systems: current state of science and fundamental research needs. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*.
- Pan, Y., Ye, L., & Ni, B.-J. (2012). Effect of pH on N₂O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers. *Water Research* 46, 4832-4840.
- Pang, Y., & Wang, J. (2020). Insight into the mechanism of chemoautotrophic denitrification using pyrite (FeS₂) as electron donor. *Biosource Technology* 318.
- Pang, Y., & Wang, J. (2021). Various electron donors for biological nitrate removal: A review. *Elsevier*.
- Plant Ecology. (2019). En E. Detlef Schulze, E. Beck, N. Bunchmann, S. Clemens, K. Müller-Hohenstein, & M. Scherer-Lorenzen. Hamburg: Springer.
- Portmann, R., Daniel, J., & Ravishankara, A. R. (2012). Stratospheric ozone depletion due to nitrous oxide: influences of other gases. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 1256-1264.
- Qian, W., Ma, B., Li, X., & Zhang, Q. (2019). Long-term effect of pH on denitrification: High pH benefits achieving partial-denitrification. *Bioresource Technology* 278, 444-449.
- Rice, E. W., Baird, R. B., & Eaton, A. D. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition*.

- Schlesinger, W., & Bernhardt, E. (2013). *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*, Third Edition. Elsevier.
- Spalding, R., & Exner, M. (1993). Occurrence of Nitrate in Groundwater—A Review. *Journal of Environmental Quality*, 22, 392-402.
- Suspended Growth Treatment Processes. (2014). En M. Ghangrekar, & M. Mehera, *Comprehensive Water Quality and Purification, Volumen 3* (págs. 75-89). West Bengal: Elsevier.
- Taylor, K., & Aulton, M. (2022). *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicine, Sixth edition*. Elsevier.
- Tian, T., & Yu, H.-Q. (2020). Denitrification with non-organic electron donor for treating low C/N ratio wastewaters. *Bioresource Technology* 299.
- Vries, W. (2021). Impacts of nitrogen emissions on ecosystems and human health: A mini review. *Environmental Science & Health*.
- Wang, J., & Chu, L. (2016). Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnology Advances, Elsevier*.
- Ward, B., Arp, D., & Klotz, M. (2011). *Nitrification*. Washington DC: ASM Press.
- White, W. M. (2017). Encyclopedia of Geochemistry. En M. M. Palta, & H. E. Hartnett, *A comprehensive reference source on the chemistry of the earth* (págs. 988-992). New York: Springer.
- WHO. (2003). *Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide*. World Health Organization Working Group Bonn, Germany, 13-15.
- Wohlleben, W., Mast, Y., & Reuther, J. (2011). Regulation of Nitrogen Assimilation in Streptomycetes and Other Actinobacteria. En *Streptomyces Molecular Biology and Biotechnology* (págs. 125-136). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Yaubrough, J., Rake, J., & Eagon, R. (1980). Bacterial Inhibitory Effects of Nitrite: Inhibition of Active Transport, But Not of Group Translocation, and of Intracellular Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 831-834.
- Yu, L., Mo, P., & Li, R. (2021). Stable partial nitrification at low temperature via selective inactivation of enzymes by intermittent thermal treatment of thickened sludge. *Chemical Engineering Journal*.
- Zhang et al., Y. (2009). Nitrification in Drinking Water Systems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 153-208.

7 Anexos

7.1 Anexo A: Metodologías de determinación por espectrofotometría.

Para determinar la concentración de compuestos en las muestras de los afluentes y efluentes, se utilizó la técnica de espectrometría, la cual consiste en medir la cantidad de luz absorbida por una solución, frente a una solución patrón que absorbe este mismo haz de luz. La luz absorbida por la solución corresponde a la cantidad de electrones que se ven excitados a una longitud de onda en específico y con ello la cantidad de moléculas o la concentración de un compuesto a una cantidad de moléculas en solución (Rice *et al.*, 2017). Esta técnica analítica, permite establecer una relación lineal entre la absorbancia y la concentración por medio de la ley de Lambert-Beer,

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (22)$$

Donde A corresponde a la absorbancia de la disolución a una longitud de onda dada (adimensional), ϵ coeficiente de extinción molar ($\frac{1}{M \cdot cm}$), b longitud de paso de la cubeta (cm) (cubeta por la cual paso la luz) y C la concentración de la disolución (M).

7.1.1 Determinación de amonio.

La determinación de amonio utilizada corresponde al método del Fenato, el cual consiste en la formación de una solución de amoníaco con hipoclorito de sodio, para luego reaccionar con fenol bajo una solución catalizadora de nitroprusiato de sodio, formando un compuesto de un color azul intenso denominado indofenol. A continuación, se lista los reactivos, así como el procedimiento realizado (Rice *et al.*, 2017).

7.1.1.1 Reactivos:

- a. Solución de fenol: 11,1 ml de fenol líquido ($\geq 89\%$), con 95% v/v de alcohol etílico de volumen final 100 ml.
- b. Nitroprusiato de Sodio, 0,5% w/v: 0,5 g de nitroprusiato de sodio en 100 ml de agua desionizada.
- c. Citrato alcalino: 200 g de citrato trisódico y 10 g de hidróxido de sodio en agua desionizada, diluidos en 1000 ml
- d. Hipoclorito de sodio: solución comercial al 5%.
- e. Solución oxidante: mezclar 100 ml de solución del citrato alcalino, con 25 ml de hipoclorito de sodio (preparado al momento de realizar la determinación de amonio).

7.1.1.2 Procedimiento:

1. Centrifugar la muestra líquida por 10 minutos, con el fin de eliminar los sólidos que se encuentren sobrenadantes en la solución.
2. Agregar una alícuota de la muestra a evaluar a un matraz aforado de 25 ml y aforar con agua destilada (la alícuota depende de la concentración teórica esperada).
3. Trasvasijar a un Matraz Erlenmeyer y agregar a cada matraz: 1 ml de fenol, 1 ml de nitroprusiato de sodio y 2,5 ml de solución oxidante.
4. Mezclar la solución para lograr homogeneidad y cubrir los matraces con una envoltura de plástico o parafina.
5. Dejar el color desarrollarse en la oscuridad en un cuarto de rango de temperaturas entre los 22 a 27 °C.
6. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 640 nm de longitud de onda de luz, utilizando celdas de plástico y un paso de luz de 1 cm.

La calibración de la curva es realizada utilizando una solución patrón de amonio, utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, considerando diluciones de amonio desde 0 a 0,6 ml.

7.1.2 Determinación de nitrito.

El Nitrito es determinado por la formación de una solución de color azo violeta, entre los rangos de 10 a 1000 $\mu\text{g NO}_2^-/\text{L}$, donde, al utilizar un haz de luz color verde de 543 nm, es posible aplicar la ley de Lambert-Berger hasta los 180 $\mu\text{g N/L}$ al emplear un paso de luz de 1 cm (Rice *et al.*, 2017). Los reactivos utilizados para esta determinación son los siguientes.

7.1.2.1 Reactivos:

- a. Agua libre de Nitrito:
 - Añadir a 1 L de agua destilada un cristal de KMnO_4 junto a Ba(OH)_2 o Ca(OH)_2 . Volver a destilar y depositar en un vaso de borosilicato, y descartar 50 ml del destilado. Recolectar la fracción de destilado libre de permanganato.
 - Añadir 1 ml de H_2SO_4 concentrado y 0,2 ml de una solución de MnSO_4 al 36,4% p/w, por cada 1 L de agua destilada anteriormente. Extraer 1 a 3 ml de la solución con KMnO_4 de la parte no recolectada (400 mg KMnO_4/L de agua destilada). Volver a destilar
- b. Reactivo de Color: añadir a 800 ml de agua, 100 ml de ácido fosfórico al 85%, y 10 g de sulfanilamida. Disolver la sulfanilamida y añadir 1 g de dihidrocloruro de N-(1-nafetil)-etilamina. Revolver y diluir en 1 L de agua destilada.

7.1.2.2 Procedimiento:

1. Centrifugar la muestra líquida por 10 min, con el fin de eliminar los sólidos que se encuentren sobrenadantes en la solución.
2. Se agrega una alícuota de muestra en un matraz aforado de 25 ml
3. Agregar 1 ml del reactivo de color y mezclar para lograr homogeneidad
4. Dejar reposar por 10 minutos
5. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro con luz a 543 nm de longitud de onda, utilizando celdas de plástico y un paso de luz de 1 cm

7.1.3 Determinación de nitrato.

Esta técnica es aplicable a bajas concentraciones de materia orgánica, donde la curva de calibración de Lambert-Beer es lineal hasta concentraciones de 11 mg. La acidificación de la solución determinada (ácido clorhídrico 1 Normal), previene la interferencia de hidróxidos o carbonatos de calcio de hasta 1000 mg $CaCO_3/L$ (Rice *et al.*, 2017). Para esta determinación son usados los siguientes reactivos.

- a. Ácido clorhídrico: La concentración requerida de este ácido es de 1 Normal, formada al diluir 83 ml de ácido concentrado en 1 L de agua destilada.

7.1.3.1 Procedimiento:

1. Centrifugar la muestra líquida por 10 min, con el fin de eliminar los sólidos que se encuentren sobrenadantes en la solución.
2. Se agrega una alícuota en un matraz aforado de 25 ml
3. Agregar 0,5 ml de Ácido clorhídrico 1 Normal
4. Medir en celdas de cuarzo con paso de luz de 1 cm utilizando haces de luz de 205, 220 y 275 nm, con el fin de eliminar interferencias debido a materia orgánica disuelta.

7.2 Anexo B: Metodología de determinación de suspendidos volátiles.

El principio de este análisis se basa en determinar la cantidad de materia orgánica presente en un agua de desecho, donde, luego de quemar los sólidos presentes en una muestra que previamente ha sido secada y filtrada por medio de gravimetría, esta es pesada y comparada en triplicados, con el fin de eliminar variaciones, según *Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Rice *et al.*, 2017). El peso perdido dentro de la muestra corresponde a los sólidos suspendidos volátiles (se pierden luego de la combustión), mientras que el remanente se denomina sólidos suspendidos totales. El procedimiento que permite realizar cuantificar la materia orgánica por medio de este método es el siguiente.

7.2.1 Procedimiento:

1. Preparar de un filtro: Se introduce un filtro dentro de un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío, el cual se lava con agua destilada y se filtra hasta eliminar la mayor cantidad de agua. Este filtro es secado dentro de un horno a temperaturas de 103 a 105 °C, dentro de una placa de pesaje por una hora. El filtro obtenido, se introduce en un desecador y se pesa a temperatura ambiente, repitiendo todo este proceso hasta obtener valores constantes.
2. Desde un ril acuoso, se utiliza un volumen capaz de producir una muestra solida con un peso entre 2,5 a 200 mg de residuo seco, el cual es filtrado en el papel filtro preparado anteriormente. El ril debe ser homogéneo para representar correctamente la cantidad de solidos suspendidos volátiles en la muestra.
3. El filtrado en el papel filtro se pesa y se añade a un crisol de cerámica que previamente fue pesado y secado en un horno, el cual se encontraba a temperaturas entre los 103 a 105 °C
4. El crisol se lleva a un horno de mufla, incinerando el material que se encuentra dentro durante 1 hora. El crisol obtenido se deja enfriar dentro de un desecador y es pesado primero como crisol con la muestra y luego con el papel filtro solo.

Determinada la masa del crisol con papel filtro con sólidos, papel filtro solo y crisol, se calculan los sólidos suspendidos volátiles presentes en la muestra

$$\text{Solidos Suspendidos Volátiles (SSV)} \frac{mg}{L} = \frac{(A - B)}{V} \cdot 1000 \quad (23)$$

Donde: A: peso del filtro + solido antes de la ignición, B: peso del filtro + solido después de la ignición y V es el volumen de la muestra en el filtro. Se debe considerar que también puede utilizarse el peso de los crisoles como referencia en ves del papel, dependiendo de cuál de los dos entregue un mayor error o variación experimental.

7.3 Anexo C: Metodología de determinación de carbono orgánico.

El carbono orgánico utilizado en la desnitrificación heterótrofa fue medido utilizando un analizador TOC/TN multi N/C 3100. Por medio de este equipo, es posible determinar y cuantificar la cantidad de carbono orgánico total (TOC), carbono inorgánico (IC), carbono total (TC) y nitrógeno total (TN). Este equipo requiere un tiempo de calentamiento de 20 minutos y utiliza muestras líquidas que son contrastadas frente a una referencia de agua ultrapura. Los resultados de estas mediciones corresponden a concentraciones de los elementos mencionados anteriormente, permitiendo extrapolar el resultado a cantidades más grandes de muestras, según la siguiente consideración:

$$TC = TOC + IC \quad (24)$$

7.4 Anexo D: Cálculos

7.4.1 Balance de nitrógeno:

El balance de nitrógeno contempla al cálculo de la cantidad de nitrógeno que se encuentra presente dentro del reactor antes y después de la reacción de nitrificación. Para la desnitrificación este balance no puede ser realizado, debido a que uno de los productos finales de la reducción de nitrito consiste en el gas nitrógeno, el cual se disipa a la atmósfera por medio de la válvula de escape de aire, del reactor de desnitrificación. El balance de nitrógeno en la nitrificación se realiza por medio del siguiente cálculo.

$$N_{in} = N_{out} \quad (25)$$

$$N_{in} = NH_4^+_{AF} \quad (26)$$

$$N_{out} = NO_3^- + NO_2^- + NH_4^+_{EF} \quad (27)$$

Si bien, teóricamente no existe nitrito y nitrato dentro del reactor al comienzo de la reacción, experimentalmente existió nitrito y nitrato producto de acumulaciones de estos compuestos en el lodo decantado, por lo cual el balance de nitrógeno incluye a estos compuestos, los cuales se midieron en cada alimentación al reactor por lotes nitrificante.

7.4.2 Porcentajes de acumulación de nitrito, oxidación de nitrito, acumulación y oxidación de amonio, junto a reducción de nitrato:

El porcentaje de amonio oxidado corresponde a la diferencia de amonio que ingresa al reactor con el remanente en relación con el que existía inicialmente (Chen *et al.*, 2020).

$$\% \text{Oxidación de } NH_4^+ = \frac{NH_{4AF}^+ - NH_{4EF}^+}{NH_{4AF}^+} \cdot 100 \quad (28)$$

La acumulación de amonio puede ser escrita en función de la ecuación anterior, considerando en este caso, solo el amonio remanente

$$\% \text{Acumulación de } NH_4^+ = \frac{NH_{4EF}^+}{NH_{4AF}^+} \cdot 100 \quad (29)$$

La acumulación de nitrito en la nitrificación puede ser escrita en función de la ecuación anterior, considerando en este caso solo el amonio remanente (Chen *et al.*, 2020).

$$\% \text{Acumulación de } NO_2^- = \frac{NO_{2EF}^-}{NO_{2EF}^- + NO_{3EF}^-} \cdot 100 \quad (30)$$

La reducción de nitrato puede ser resumida en base a la siguiente expresión (Chen *et al.*, 2020):

$$\% \text{Reducción } NO_3^- = \frac{NO_{3AF}^-}{NO_{3AF}^-} \cdot 100 \quad (31)$$

Por último, la oxidación de nitrito puede ser escrita en función de la ecuación anterior, considerando en este caso, solo el nitrito remanente (Chen *et al.*, 2020).

$$\% \text{Oxidación de } NO_2^- = \frac{NO_{3EF}^-}{NH_{4AF}^+} \cdot 100 \quad (32)$$