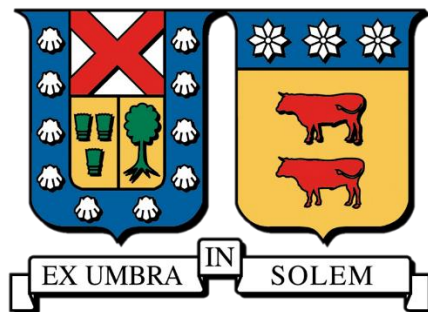


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



**“PUESTA EN MARCHA DE REACTOR UAF PARA DESNITRIFICACIÓN
AUTÓTROFA-HETERÓTROFA SIMULTÁNEA”**

IGNACIO MATÍAS GONZÁLEZ QUEZADA

Memoria presentada para optar al título de
INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

Profesor Guía: Dra. Lorna Guerrero Saldes

Profesor Co-Referente: M.Cs. Andrea Barahona Lloré

Junio, 2024

Agradecimientos

A mi madre y padre, Verónica y Jorge, porque sin el apoyo de ustedes nada de esto hubiese sido posible, gracias por su gran esfuerzo y haberme dado la oportunidad de educarme.

A mis amigos que me acompañaron en la universidad, en especial al Jaime y Estefan, con ellos compartí, me reí, jugué, lloré; peleamos, estudiamos y aprendimos durante todos estos años de carrera, con todos ellos forjé la persona que soy ahora y eso me enorgullece.

A mi polola Milanka, a quien conocí desde que comencé a trabajar en esta memoria y fue la persona quien me ha acompañado desde entonces en todo momento, te agradezco tu apoyo en las buenas y malas, en especial todos esos días que me acompañaste en el laboratorio hasta pasado medianoche para hacer este trabajo, una etapa muy difícil y nunca me dejaste solo, eres la persona en quien más confío, te amo mucho.

A la profesora Lorna y Andrea, que me dieron la oportunidad de trabajar en su proyecto y realizar esta memoria, a la Paloma, que me enseñó todo lo del laboratorio, tuvo la mejor disposición y la más grande paciencia que pudo tener conmigo, y a Felipe, que apareció y me encaminó en los momentos difíciles cuando estaba perdido.

Por último, quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que creyeron en mí y me brindaron su apoyo de alguna forma. Su confianza y aliento fueron fundamentales en mi camino hacia la meta que hoy casi alcanzo. Sin su respaldo, este recorrido habría sido muy diferente, y por eso les estaré eternamente agradecido.

Resumen

La alta concentración de nitrógeno en aguas residuales representa un problema ambiental significativo con impactos adversos en los ecosistemas acuáticos y la salud humana, especialmente en un contexto de cambio climático y sequías. Para abordar esta problemática, se investigaron los procesos de remoción de nitrógeno, destacando la importancia de la desnitrificación mixotrófica. Este proceso ofrece ventajas como alta eficiencia en la remoción de nitrógeno, así como la capacidad de eliminar materia orgánica y compuestos azufrados, resolviendo las desventajas de los procesos de desnitrificación autótrofa y heterótrofa por separado.

El propósito de esta memoria, enmarcada dentro del proyecto Fondecyt N°1201258, es la implementación y puesta en marcha de un sistema de desnitrificación mixotrófica en un filtro anaerobio de flujo ascendente (UAF) diseñado para tratar aguas residuales con presencia de nitrógeno, azufre y materia orgánica.

Para ello, se realizó el montaje de dos reactores UAF de un volumen total de 800 mL, en donde se inocularon biomasas desnitrificantes autótrofas y heterótrofas previamente enriquecidas por separado en reactores SBR de 3L, y luego se alimentaron con un sustrato sintético que contenía nitrato, acetato y tiosulfato, con una relación C/N de 2,62 mol/mol y S/N de 2,85 mol/mol. La puesta en marcha de los reactores UAF se dividió en dos etapas; primero en formato *fed batch* para la adherencia microbiana y luego en operación continua hasta la estabilización, la cual se logra obteniendo un porcentaje de remoción de nitrato superior al 90% estable por al menos 3 tiempos de residencia hidráulicos (TRH).

El enriquecimiento desnitrificante heterótrofo se operó por 111 días, con una relación de C/N de 2,62 mol/mol, en donde se alcanzó un máximo de remoción de nitrato de 87,11% y un máximo de remoción de materia orgánica de 98,43%.

Los reactores UAF se operaron por 114 días, donde el primer reactor logró una remoción máxima de nitrato del 99,78% para una velocidad de carga nitrogenada (VCN) de 0,046 kgN/(m³·d), así como una remoción máxima de tiosulfato del 98,99% y acetato de 100%. El segundo reactor alcanzó una remoción máxima de nitrato del 95,38% para la misma VCN, una remoción máxima de tiosulfato del 47,54% y una remoción máxima de acetato del 100%.

La competencia entre las biomasas autótrofa y heterótrofa se analizó mediante la participación relativa en la desnitrificación mixotrófica, la cual fue calculada bajo el supuesto de que el sulfato se producía únicamente a partir de la desnitrificación autótrofa, dando como resultado la cantidad de nitrato removido por ambas biomasas por separado. Se estableció como criterio que el rango de 40% a 60% era indicio de equilibrio en la desnitrificación. En el primer reactor, la participación promedio en la desnitrificación de la biomasa autótrofa y heterótrofa fue de 45,75% y 54,25%, lo que indicó un buen equilibrio según el criterio dado. En el segundo reactor, la participación promedio fue de 23,4% y 76,6% de la biomasa autótrofa y heterótrofa, respectivamente, lo cual indicó mayor dominancia de esta última, lo que sugirió que la alimentación no fue óptima para favorecer la biomasa autótrofa, por lo que la recomendación que nace es de aumentar la relación S/N durante la etapa de operación para potenciar la desnitrificación autótrofa.

Ambos reactores completaron la puesta en marcha, ya que lograron una desnitrificación completa de manera estable, aunque el segundo reactor presentó problemas de fuga que alteraron sus resultados.

En conclusión, la implementación de un reactor de desnitrificación mixotrófica demostró ser efectiva para reducir los niveles de nitrógeno en las aguas residuales, lo que contribuye a mejorar la calidad del agua y a mitigar los impactos ambientales negativos asociados con la contaminación por nitrógeno.

Tabla de contenido

Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Tabla de contenido.....	v
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vii
CAPITULO 1	1
1. Introducción.....	1
1.1. Objetivo general	2
1.2. Objetivos específicos.....	2
CAPITULO 2	3
2. Marco teórico.....	3
2.1. Ciclo del nitrógeno	3
2.1.1. Etapas del ciclo del nitrógeno.....	4
2.2. Ciclo del azufre.....	5
2.2.1. Etapas del ciclo del azufre	6
2.3. Ciclo del carbono.....	7
2.4. La problemática actual de descargas de nitrógeno y azufre	9
2.5. Procesos biológicos de remoción de nitrógeno	10
2.5.1. Nitrificación y desnitrificación convencional.....	10
2.5.2. Nitrificación y desnitrificación parcial	13
2.5.3. Anammox.....	14
2.5.4. Desnitrificación autótrofa	14
2.5.5. Desnitrificación mixotrófica.....	16
2.6. Reactores anaerobios.....	16
2.7. Reactor UAF.....	17
2.8. Zeolita.....	18
2.8.1. Zeolita Chilena	19
CAPITULO 3	20
3. Metodología.....	20
3.1. Enriquecimiento Autótrofo.....	20
3.2. Enriquecimiento Heterótrofo.....	20
3.2.1. Configuración del reactor	20
3.2.2. Inóculo	21
3.2.3. Alimentación	22
3.3. Puesta en Marcha del Reactor UAF	23
3.3.1. Configuración del Reactor.....	23
3.3.2. Inóculo	24
3.3.3. Alimentación	25
3.3.4. Estrategia de Puesta en Marcha	26
3.3.5. Parámetros de medición y control	27
CAPITULO 4	29
4. Resultados.....	29
4.1. Enriquecimiento para Desnitrificación Heterótrofa	29
4.2. Puesta en Marcha UAF.....	32

4.2.1.	Potencial de Hidrógeno (pH).....	33
4.2.2.	Compuestos de nitrógeno	33
4.2.3.	Compuestos de azufre.....	36
4.2.4.	Materia orgánica	40
4.2.5.	Participación de las biomosas	41
CAPITULO 5		44
5.	Conclusiones.....	44
	Referencias.....	45
	Anexos	53

Índice de figuras

Figura 1. El ciclo del Nitrógeno. Fuente: (Garrido, 2014)	3
Figura 2. El ciclo del Azufre. Fuente: (Espinosa et al., 2010).....	6
Figura 3. El ciclo biológico del carbono. Fuente: (Maldona, 2020).....	7
Figura 4. El ciclo geológico del carbono. Fuente: (Zita, 2022).....	8
Figura 5. Distintas configuraciones del proceso de Nitrificación-Desnitrificación Convencional. Fuente: (Fortt, 2014).....	13
Figura 6. Prototipo esquemático de un reactor UAF. Fuente: (Hassan et al., 2013).....	17
Figura 7. Diseño del reactor SBR para el enriquecimiento heterótrofo.	21
Figura 8. Diseño del reactor UAF. Fuente: (Fortt, 2014)	23
Figura 9. Comportamiento del pH en el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo durante el tiempo de operación.....	29
Figura 10. Concentración y remoción de los compuestos nitrogenados en el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo durante el tiempo de operación.	30
Figura 11. Concentración y remoción de la DQO en el enriquecimiento heterótrofo durante el tiempo de operación.....	31
Figura 12. Etapas de formación de la biopelícula en el reactor UAF 1.....	32
Figura 13. Etapas de formación de la biopelícula en el reactor UAF 2.....	32
Figura 14. Comportamiento del pH en los reactores UAF durante el tiempo de operación.....	33
Figura 15. Concentración y porcentaje de remoción de los compuestos nitrogenados en el reactor UAF 1 durante el tiempo de operación.....	34
Figura 16. Concentración y porcentaje de remoción de los compuestos nitrogenados en el reactor UAF 2 durante el tiempo de operación.....	35
Figura 17. Concentración y porcentaje de remoción de los compuestos azufrados en el reactor UAF 1 durante el tiempo de operación.....	37
Figura 18. Balance de masa del azufre del reactor UAF 1 en el tiempo de operación.....	38
Figura 19. Concentración y porcentaje de remoción de los compuestos azufrados en el reactor UAF 2 durante el tiempo de operación.....	39
Figura 20. Balance de masa del azufre del reactor UAF 2 en el tiempo de operación.....	39
Figura 21. Concentración y porcentaje de remoción del Carbono Orgánico Total en los reactores UAF durante el tiempo de operación.	41
Figura 22. Porcentajes de participación en la desnitrificación de las biomosas del reactor UAF 1.	42
Figura 23. Porcentajes de participación en la desnitrificación de las biomosas del reactor UAF 2.	43

Índice de tablas

Tabla 1. Los compuestos azufrados y sus diferentes estados de oxidación. Fuente: (Fortt, 2014).....	5
Tabla 2. Clasificación de los reactores anaerobios por generación. Fuente: (Montalvo y Guerrero, 2022)	17
Tabla 3. La composición química y mineralógica de la zeolita chilena. Fuente: (Montalvo et al., 2012).....	19
Tabla 4. Caracterización del inóculo para el enriquecimiento heterótrofo.....	21
Tabla 5. Alimentación sintética para el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo.....	22
Tabla 6. Micronutrientes de la alimentación para el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo.	22
Tabla 7. Cálculo del volumen de inóculo autótrofo y heterótrofo para el reactor UAF.....	24
Tabla 8. Concentraciones de la alimentación desnitrificante mixotrófica para el reactor UAF.	25
Tabla 9. Micronutrientes de la alimentación desnitrificante mixotrófica para el reactor UAF.	25
Tabla 10. Parámetros de control y metodología de análisis utilizada en los reactores UAF.	27
Tabla 11. Características de la zeolita del lecho del reactor UAF.....	53
Tabla 12. Listado de equipos complementarios utilizados para el montaje del reactor UAF.	53

CAPITULO 1

1. Introducción

El cambio climático es un problema mundial que ha adquirido cada vez más relevancia en las últimas décadas. Este fenómeno ha sido atribuido principalmente a la actividad humana al aumentar los gases de efecto invernadero y ha provocado una serie de impactos en diversos ecosistemas y en la vida de las personas (Kant, 2020). En particular, se ha observado un aumento en la frecuencia y magnitud de eventos climáticos extremos, como sequías, inundaciones y tormentas, que han generado pérdidas económicas y sociales significativas (Hartley y Tandon, 2022).

A pesar de que se han propuesto medidas para mitigar y adaptarse al cambio climático, su implementación ha sido limitada y no ha logrado frenar el aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (Sachs *et al.*, 2019). Además, la percepción y comprensión del cambio climático varían significativamente entre las personas y los grupos sociales, lo que dificulta la toma de decisiones y la implementación de políticas efectivas (Creutzig *et al.*, 2023).

Además, el deterioro de la calidad del agua se ha convertido en un problema ambiental y socioeconómico global que afecta especialmente a zonas de escasos recursos. A nivel mundial, el acceso al agua potable es limitado y se calcula que alrededor de 1.200 millones de personas consumen agua contaminada (IPCC, 2018). Además, la extracción del agua dulce a una velocidad mayor que la velocidad de reposición ha generado una necesidad imperiosa de tratar y reutilizar las aguas residuales (Reddy *et al.*, 2023).

Entre los principales contaminantes del agua se encuentra el nitrógeno, cuyo ciclo natural se ha visto alterado por la actividad humana (IPCC, 2018). La acumulación de compuestos nitrogenados en las aguas puede provocar toxicidad para la fauna acuática, disminución del oxígeno disuelto y disminución del pH. Por ello, la reducción del contenido de nitrógeno se ha convertido en uno de los objetivos principales del tratamiento de aguas, especialmente en países europeos (Sarrazin *et al.*, 2023).

En este contexto, la presente memoria, enmarcada en el Fondecyt N°1201258 “*Development of advanced biotechnological processes for the removal of ammoniacal nitrogen in the presence of sulfur and organic matter, by using chilean natural zeolites*”, se enfoca en la puesta en marcha de un reactor UAF para la desnitrificación autótrofa-heterótrofa simultánea. Para ello, se llevará a cabo una alimentación sintética en un reactor SBR para el enriquecimiento de dichos microorganismos a partir de un inóculo proveniente de una laguna anaerobia que trata purines de cerdo y se operará con una alimentación *fed batch* del reactor UAF hasta lograr la adherencia celular, para posteriormente operar en alimentación continua hasta estabilizar. Los resultados de este estudio serán de gran relevancia para la optimización de la desnitrificación autótrofa-heterótrofa simultánea en sistemas de tratamiento de aguas residuales y contribuirán a la búsqueda de soluciones sostenibles a la problemática de la contaminación del agua.

1.1. Objetivo general

Realizar la puesta en marcha de dos reactores UAF para desnitrificación a partir de lodos autótrofos y heterótrofos previamente enriquecidos.

1.2. Objetivos específicos

- Enriquecer los microorganismos desnitrificantes heterótrofos mediante una alimentación sintética que contiene nitrato y acetato como sustratos en un reactor SBR.
- Operar con alimentación *fed batch* el reactor UAF para lograr la adherencia celular y el enriquecimiento en el lecho fijo.
- Operar en forma continua el reactor UAF hasta lograr su estabilidad, evaluando las concentraciones de materia orgánica, compuestos de nitrógeno y azufre, como también la participación de las biomasas autótrofas y heterótrofas en la desnitrificación.

CAPITULO 2

2. Marco teórico

2.1. Ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno es un proceso natural en el que los compuestos de nitrógeno son transformados y reciclados en diferentes formas en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Es un proceso esencial para la vida en la Tierra, ya que el nitrógeno es un elemento vital para la síntesis de proteínas y el crecimiento de las plantas (Figura 1).

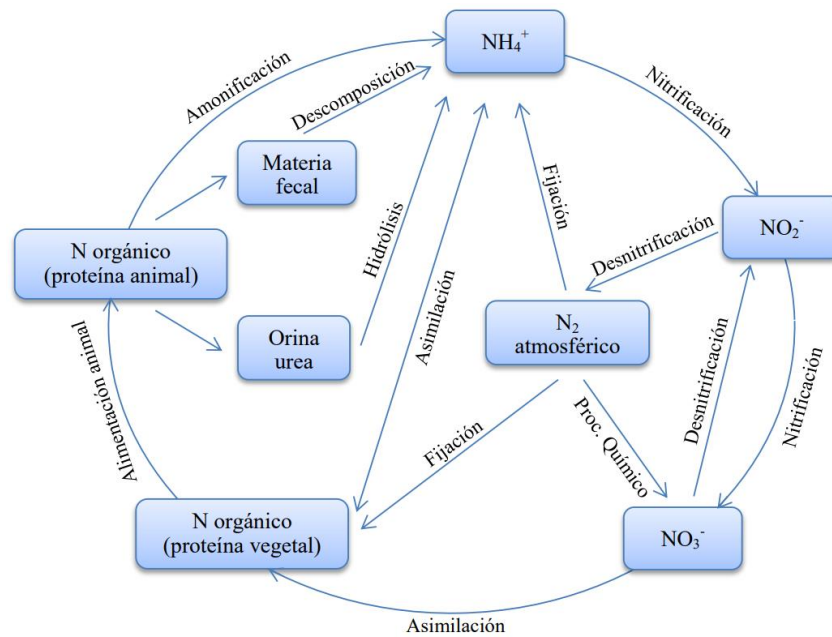


Figura 1. El ciclo del Nitrógeno. Fuente: (Garrido, 2014)

El ciclo del nitrógeno se compone de cinco etapas principales, que son la fijación, la nitrificación, la desnitrificación, la asimilación y la mineralización. A continuación, se describen cada una de estas etapas.

2.1.1. Etapas del ciclo del nitrógeno

La fijación del nitrógeno es la primera etapa del ciclo del nitrógeno y es el proceso por el cual el nitrógeno atmosférico (N_2) es transformado en compuestos nitrogenados más accesibles para las plantas. Este fenómeno es llevado a cabo por ciertos microorganismos que tienen la capacidad de convertir el nitrógeno gaseoso en amoníaco (NH_3) o en iones de amonio (NH_4^+), formas más fácilmente absorbibles por las plantas. La fijación del nitrógeno puede ser llevada a cabo por bacterias simbióticas que viven en las raíces de las plantas leguminosas o por bacterias libres en el suelo y en el agua (Du *et al.*, 2021).

La nitrificación es la segunda etapa del ciclo del nitrógeno y es el proceso por el cual los compuestos de nitrógeno son transformados en nitratos (NO_3^-) a través de la actividad de bacterias nitrificantes. La primera etapa de la nitrificación es la oxidación del amoníaco en nitrito (NO_2^-) por bacterias oxidantes de amoníaco, y la segunda etapa es la oxidación del nitrito a nitrato por bacterias oxidantes de nitrito (Cabrera, 2007).

La desnitrificación es la tercera etapa del ciclo del nitrógeno y es el proceso por el cual los nitratos son transformados en nitrógeno gaseoso por la actividad de bacterias desnitrificantes. La desnitrificación es un proceso importante para reducir el exceso de nitrógeno en los ecosistemas acuáticos y terrestres, ya que el nitrógeno gaseoso es liberado a la atmósfera. La desnitrificación es llevada a cabo por bacterias desnitrificantes, que reducen los nitratos a gas nitrógeno, lo que resulta en una disminución de la disponibilidad de nitrógeno para las plantas y otros organismos (Claros, 2012).

La asimilación es la cuarta etapa del ciclo del nitrógeno y es el proceso por el cual los compuestos de nitrógeno son absorbidos por las plantas y otros organismos para ser utilizados en la síntesis de proteínas y otras moléculas orgánicas. Las plantas y otros organismos toman el nitrógeno del suelo y del agua en forma de amonio, nitrato o como otros compuestos nitrogenados (Pajares y Bohannan, 2016).

La mineralización es la última etapa del ciclo del nitrógeno y es el proceso por el cual los compuestos nitrogenados orgánicos son descompuestos en amoníaco y otros compuestos

nitrogenados inorgánicos por la actividad de microorganismos descomponedores. La mineralización es importante para liberar el nitrógeno orgánico de los residuos de plantas y animales y hacerlo disponible para ser utilizado por otros organismos (Cabrera, 2007).

2.2. Ciclo del azufre

El ciclo del azufre es el proceso biogeoquímico por el cual el azufre es cíclicamente transformado y reciclado en la biosfera, la litosfera, la atmósfera y los océanos. El azufre es un elemento esencial para la vida, ya que es un componente fundamental de proteínas y otros compuestos orgánicos, y también juega un papel importante en la formación de compuestos químicos en la atmósfera.

El azufre puede presentarse de diversas maneras en la naturaleza, considerando sus distintos estados de oxidación. Estos van desde estados de oxidación (+6) hasta (-2), y todos se pueden reducir de forma biológica o química hasta su estado de oxidación menor donde se encuentra el sulfato (Espinosa *et al.*, 2010). Se presentan en la Tabla 1 los estados de oxidación más comunes;

Tabla 1. Los compuestos azufrados y sus diferentes estados de oxidación. Fuente: (Fortt, 2014).

Estado de oxidación	Compuesto y fórmula
-2	Sulfuros (S^{2-})
-2	Azufres orgánicos (S_{org})
0	Azufre elemental (S^0)
2	Tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$)
4	Sulfitos (SO_3^{2-}), Bisulfitos (HSO_3^-)
6	Sulfato (SO_4^{2-}), Tiosulfato átomo interno ($S_2O_3^{2-}$)

En condiciones naturales, el ciclo del azufre se mantiene en equilibrio entre sus procesos oxidativos y reductivos. En el primero los compuestos de azufre reducidos como los sulfuros, azufre elemental y tiosulfato, cumplen la función de ser donantes de electrones de varias bacterias fototróficas anaeróbicas. En el segundo los compuestos oxidados del azufre como

los sulfitos y sulfatos actúan como receptores de electrones en las rutas metabólicas de una variedad de bacterias anaeróbicas (Janssen *et al.*, 2007).

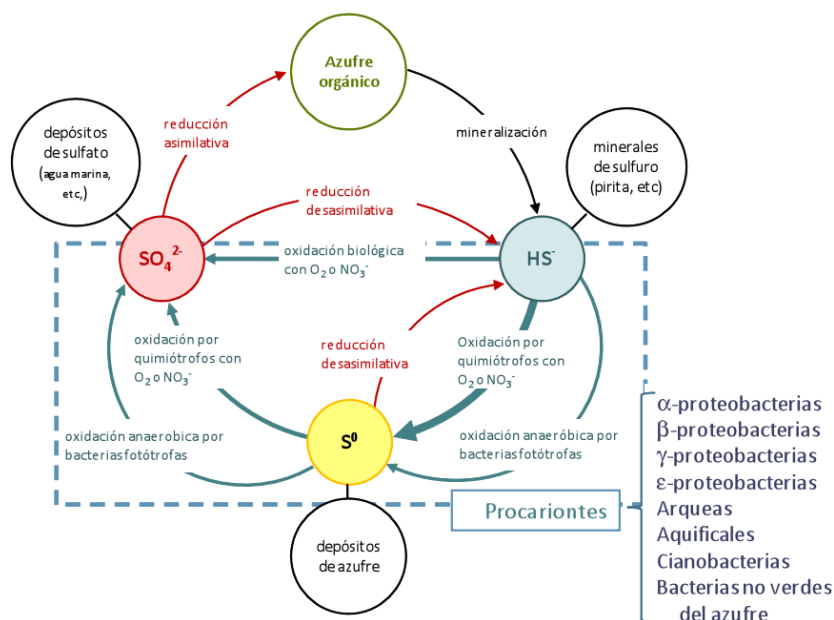


Figura 2. El ciclo del Azufre. Fuente: (Espinosa *et al.*, 2010)

2.2.1. Etapas del ciclo del azufre

La mineralización es la primera etapa del ciclo del azufre, por la cual los compuestos de azufre orgánicos, como las proteínas y los aminoácidos, son descompuestos en compuestos inorgánicos, como el sulfato (SO₄²⁻) y el sulfuro (S²⁻), por la acción de microorganismos descomponedores, como las bacterias sulfato-reductoras y las arqueas metanógenas (Cron *et al.*, 2019). La volatilización es la segunda etapa por la cual los compuestos de azufre son liberados a la atmósfera en forma de gas sulfhídrico (H₂S), dióxido de azufre (SO₂) y otros compuestos volátiles mediante la acción de microorganismos y procesos químicos. La oxidación es la tercera etapa en donde los compuestos de azufre son transformados en sulfatos por la acción de microorganismos oxidantes como las bacterias nitrificantes y las arqueas oxidantes de azufre (Fike *et al.*, 2015). Por último, la reducción es el proceso por el cual los sulfatos son reducidos a sulfuros por la acción de microorganismos reductores de sulfato como las bacterias sulfato-reductoras (Wang *et al.*, 2020)

2.3. Ciclo del carbono

El ciclo del carbono es el proceso a través del cual el carbono se mueve a través de la biosfera, la atmósfera, los océanos y la geosfera (Bao, 2023). Este ciclo es fundamental para la vida y afecta la concentración de gases de efecto invernadero.

El ciclo biológico del carbono se compone de las siguientes fases principales: la fijación, la respiración, la fotosíntesis y la descomposición. La fijación es el proceso por el cual los organismos convierten el dióxido de carbono (CO_2) en compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis. La respiración es la fase en la que los organismos liberan CO_2 a través del proceso de oxidación de compuestos orgánicos para obtener energía. La fotosíntesis y la respiración son procesos opuestos, y juntos mantienen un equilibrio en el ciclo del carbono. La descomposición es la fase en la que los organismos descomponen la materia orgánica muerta y liberan CO_2 al ambiente (Wang *et al.*, 2022).

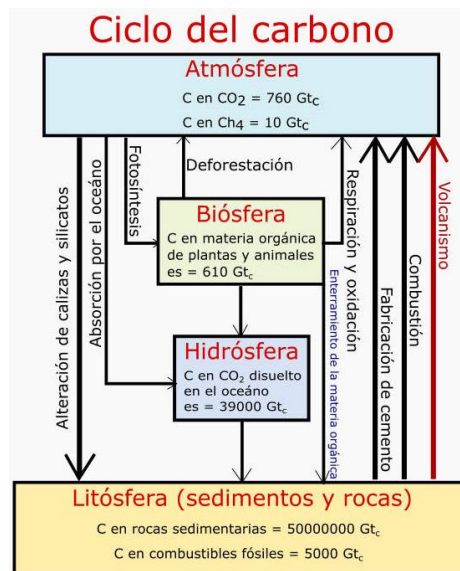


Figura 3. El ciclo biológico del carbono. Fuente: (Maldona, 2020)

El ciclo geológico del carbono es un proceso mucho más lento que el ciclo biológico, y se compone de las siguientes fases principales: la meteorización, la erosión, la sedimentación, la diagénesis y la subducción. En la fase de meteorización, el carbono se libera de las rocas a través de la disolución y la oxidación. En la fase de erosión, el carbono se mueve a través

del agua y el viento y se deposita en los océanos. En la fase de sedimentación, el carbono se deposita en los sedimentos geológicos y se convierte en roca sedimentaria. En la fase de diagénesis, la materia orgánica se descompone y se convierte en petróleo, gas y carbón. En la fase de subducción, las placas tectónicas se mueven y el carbono se vuelve a depositar en la tierra (Liu y Zhang, 2023).

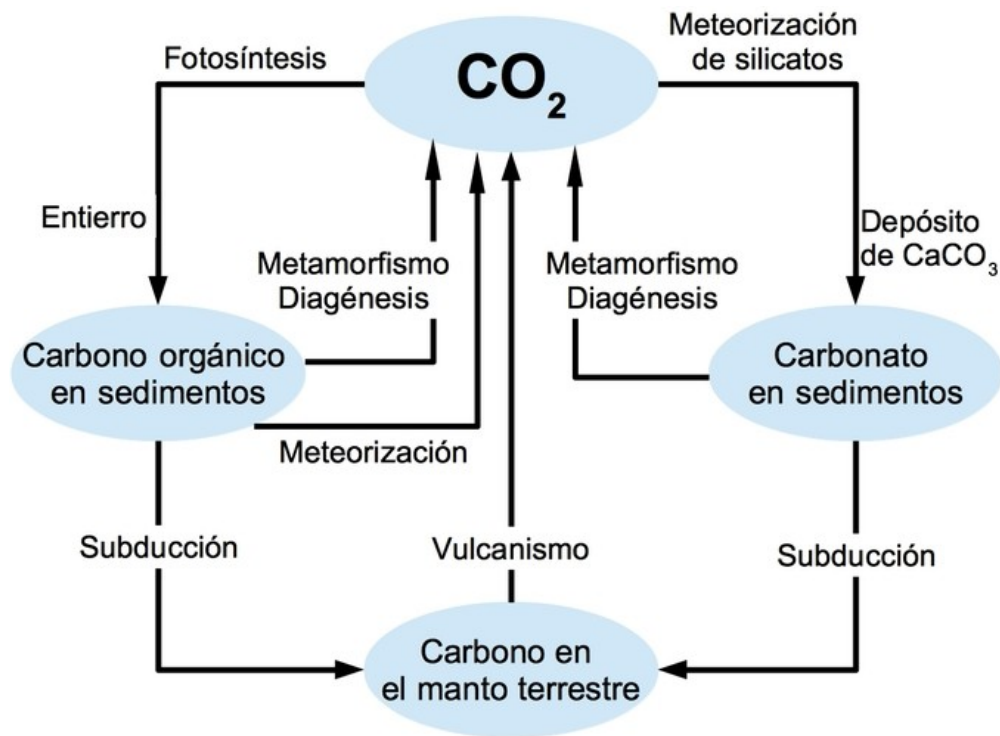


Figura 4. El ciclo geológico del carbono. Fuente: (Zita, 2022).

2.4. La problemática actual de descargas de nitrógeno y azufre

La contaminación por nitrógeno en los cuerpos de agua se ha convertido en una preocupación global debido a su impacto negativo en la calidad del agua y el medio ambiente en general. Los contaminantes de nitrógeno incluyen el amonio, nitrato y nitrito, que son producidos por actividades humanas como la agricultura intensiva y la eliminación de aguas residuales (Torrentó, 2010). En Chile, el uso intensivo de fertilizantes en la agricultura ha resultado en la acumulación de nitrógeno en el suelo, lo que a su vez ha aumentado la cantidad de nitrógeno en los ríos y lagos del país (Meza, 2009).

El problema ocurre debido a que se descontrolan la relación entre el carbono y el nitrógeno en los cuerpos de agua. En aquellos que no están alterados, los nutrientes limitan la producción de algas y microorganismos acuáticos, en cambio con emisiones antropogénicas, los cuerpos de agua se saturan en nutrientes provocando problemas como la eutrofización, que a su vez provoca una baja en el oxígeno disuelto del agua (Weigelhofer, 2018).

El nitrato también puede afectar a las reservas de agua potable, las altas concentraciones de este pueden provocar problemas como la metahemoglobina, una condición potencialmente mortal en bebés, en donde la conversión de nitrato a nitrito genera el compuesto metahemoglobina al unirse a la hemoglobina de la sangre, provocando cianosis debido a la incapacidad de la sangre de transportar el oxígeno (Agarwal *et al.*, 2019). Además, la exposición a nitratos puede generar en adultos problemas de salud como tumores cerebrales, hipertensión, cáncer de estómago y trastornos nasofaríngeos y tiroideos. En animales la exposición puede generar dolores abdominales y debilidad muscular (Singh, 2022).

Por otro lado, el ciclo del azufre también se ve alterado por actividades antropogénicas, como actividades mineras, la industria petroquímica, plantas de celulosa y papel, fábricas textiles y durante digestión anaeróbica de materia orgánica (Jing *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2010; Whaley-Martin *et al.*, 2020).

El sulfuro de hidrógeno es un gas tóxico para la salud, la exposición a este puede provocar síntomas oculares, respiratorios hasta neurológicos (neurotoxicidad) (Simonton y King, 2013). El sulfato es un compuesto mucho menos nocivo que los sulfuros, pero aun así en grandes concentraciones en el agua potable puede generar malestares como la diarrea y deshidratación (Kumar *et al.*, 2023).

2.5. Procesos biológicos de remoción de nitrógeno

Dentro de los procesos utilizados para los tratamientos de agua residuales, los tratamientos terciarios corresponden a aquellos buscan eliminar los excedentes de biomasa que dejan los tratamientos secundarios, microorganismos patógenos, material recalcitrante y nutrientes, entre ellos el nitrógeno, los cuales pueden ser eliminados mediante procesos fisicoquímicos y biológicos (Metcalf y Eddy, 2014). En general, la preferencia al usar los tratamientos biológicos por sobre los fisicoquímicos para la eliminación de nutrientes se debe a su mejor rendimiento, menor costo y una mínima dependencia de las variables ambientales (Flores-Morales *et al.*, 2021; Hasan *et al.*, 2021).

La elección del proceso biológico más adecuado para la eliminación de nitrógeno viene dada por la relación entre la demanda química de oxígeno (DQO) y el nitrógeno (N) en el agua residual (Campos *et al.*, 2009);

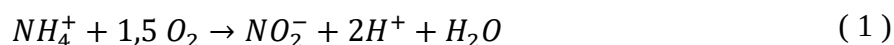
- Si $DQO/N > 20$: Eliminación por asimilación por bacterias heterótrofas.
- Si $20 > DQO/N > 5$: Eliminación por asimilación, nitrificación y desnitrificación.
- Si $DQO/N < 5$: Eliminación por nitrificación parcial–desnitrificación o nitrificación parcial-Anammox.

2.5.1. Nitrificación y desnitrificación convencional

La nitrificación es el proceso mediante el cual el amonio (NH_4^+) es oxidado a nitrito (NO_2^-) y luego a nitrato (NO_3^-) en presencia de oxígeno y bacterias nitrificantes. La nitrificación es un proceso importante en el ciclo del nitrógeno y es fundamental para mantener la calidad

del agua en sistemas acuáticos naturales y en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Santa *et al.*, 2017).

Las bacterias responsables del proceso de nitrificación convencional son las del género *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*, también participan arqueas como las del género *Nitrosotenus*, *Nitrosocosmicus* y *Nitrosospharea* (Lu *et al.*, 2021). Los microorganismos oxidan el amonio a nitrato según las reacciones (1) y (2):

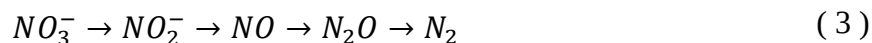


Ambas reacciones son necesarias para completar el proceso de nitrificación convencional.

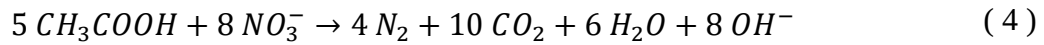
La nitrificación puede verse inhibida por varios factores, como una alta concentración de amonio en el medio y una salinidad elevada (Jamse y Vijayanandan, 2023).

Por otro lado, la desnitrificación es el proceso mediante el cual los nitratos (NO_3^-) son reducidos a gas nitrógeno (N_2) en ausencia de oxígeno y con la ayuda de bacterias desnitrificantes. La desnitrificación es un proceso importante en el ciclo del nitrógeno y en el tratamiento de aguas residuales, ya que permite la eliminación de nitrógeno del agua antes de su descarga al medio ambiente (George, 2021).

Las bacterias encargadas del proceso de desnitrificación convencional son principalmente del género *Pseudomonas*. Estas bacterias utilizan los nitratos como aceptor de electrones para donadores de electrones orgánicos o inorgánicos, hasta reducirlo a nitrógeno gaseoso (Riffat, 2013). La ecuación (3) describe las etapas del proceso;



La desnitrificación se realiza en presencia de nitrato y en un ambiente anóxico, junto con materia orgánica disuelta (Riffat, 2013), la ecuación (4) muestra una reacción típica con ácido acético;



La desnitrificación puede verse inhibida por las condiciones ambientales como la baja relación C/N, pH alcalino menor a 5, presencia de oxígeno (Zhang *et al.*, 2023b), además de la falta de iones como cobre (Bennett *et al.*, 2019) o molibdeno (Ge *et al.*, 2018). El óxido nitroso (N_2O) es un producto intermediario que también puede inhibir la desnitrificación. La formación de NO_2^- es lenta en comparación con su reducción a nitrógeno gaseoso, por lo que puede acumularse. La acumulación de NO_2^- puede conducir a una disminución en el proceso de desnitrificación, aumentando la producción de N_2O , generando posibles problemas de emisión, la cual se incrementa en presencia de sulfuros y bajo condiciones ácidas (Lv *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2023)

El proceso en conjunto se realiza en dos etapas, la cuales pueden configurarse de dos formas. La primera configuración llamada predesnitrificante, implica que el afluente ingresa a un reactor anaerobio que lleva a cabo el proceso de desnitrificación utilizando la materia orgánica del afluente, para luego pasar a un reactor aerobio que realiza la nitrificación. De este reactor se recircula una corriente rica en nitrito y/o nitrato al primer reactor de desnitrificación. En la segunda configuración llamada postnitrificante, el afluente ingresa al reactor aerobio para realizar la nitrificación y luego al reactor anaerobio para realizar la desnitrificación. Dado que la materia orgánica se oxida en el primer reactor aerobio, en esta configuración será requerida la adición de materia orgánica para alcanzar la desnitrificación en el segundo reactor. La elección de una configuración u otra dependerá de la relación DQO/N del afluente (Campos *et al.*, 2009).

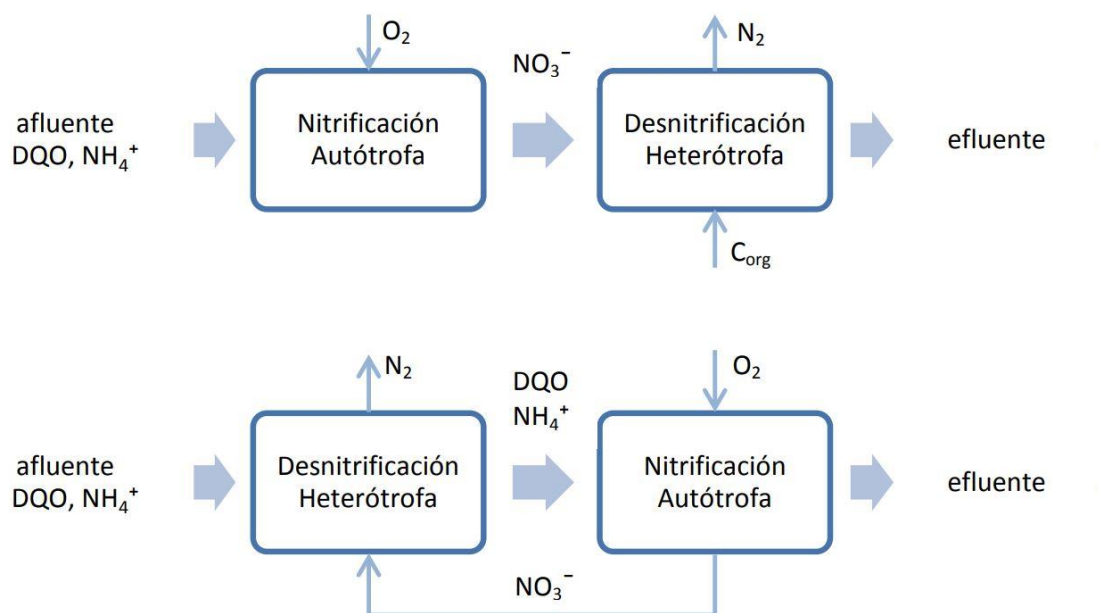
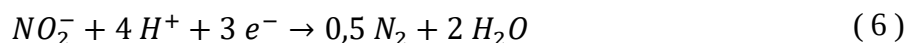
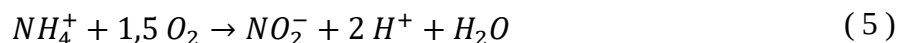


Figura 5. Distintas configuraciones del proceso de Nitrificación-Desnitrificación Convencional. Fuente: (Fortt, 2014)

2.5.2. Nitrificación y desnitrificación parcial

La nitrificación y desnitrificación parcial, también llamada nitrificación y desnitrificación vía nitrito, o nitrificación-desnitrificación, consiste en el uso del NO_2^- , un compuesto intermedio en la nitrificación y en la desnitrificación, permitiendo un acortamiento en ambos procesos (Riffat, 2013). La reacción (5) muestra la nitrificación parcial hasta la producción de nitrito, mientras que la reacción (6) muestra la desnitrificación a partir del nitrito producido;



Este proceso tiene la ventaja de reducir el consumo de oxígeno en la nitrificación un 25% y reducir el requerimiento de materia orgánica en la desnitrificación un 40% (Peng *et al.*, 2012).

Para lograr la nitrificación parcial y desnitrificación, se deben regular parámetros como la concentración de amonio en el medio, el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno

disuelto, la duración de la aireación y el tiempo de residencia celular (TRC). La idea se basa en enriquecer aquellas bacterias oxidantes de amoníaco e inhibir las bacterias oxidantes de nitrito durante la nitrificación, por lo que el proceso también se puede regular con ciertos inhibidores (Yang *et al.*, 2007)

2.5.3. Anammox

El Anammox (del inglés "*anaerobic ammonium oxidation*" u oxidación anaerobia del amonio) es un proceso biológico de eliminación de nitrógeno que convierte el amonio y el nitrito en nitrógeno gaseoso en ausencia de oxígeno. Este proceso es llevado a cabo por un grupo específico de bacterias llamadas bacterias *Anammox*, que pueden utilizar el amonio como fuente de energía y el nitrito como aceptor de electrones (He *et al.*, 2023).

El proceso Anammox está precedido por nitrificación parcial, que convierte parte del amonio en nitrito, por lo que el proceso en conjunto no requiere la adición de materia orgánica en lo absoluto (Zhou *et al.*, 2023b). La reacción (7) corresponde al proceso Anammox;



Algunos inhibidores del Anammox incluyen los mismos sustratos, amonio y nitrito, materia orgánica tóxica y no tóxica, la salinidad del medio, metales pesados, fosfatos y sulfuros. Estos inhibidores pueden afectar la actividad de las bacterias *Anammox* y reducir la eficiencia del proceso de eliminación de nitrógeno, por lo que es crucial mantener un control de los parámetros mencionados (Jin *et al.*, 2012).

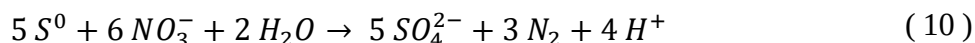
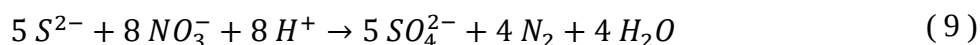
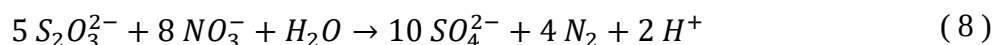
2.5.4. Desnitrificación autótrofa

Existen dos tipos de desnitrificación: la desnitrificación heterótrofa y la desnitrificación autótrofa. La desnitrificación heterótrofa se lleva a cabo por bacterias heterótrofas que utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía, mientras que la desnitrificación autótrofa se lleva a cabo por bacterias autótrofas que utilizan el dióxido de carbono como fuente de carbono y compuestos reducidos de azufre como fuente de energía (Zhang *et al.*, 2023a).

Las ventajas de la desnitrificación autótrofa con respecto a la heterótrofa son significativas. En primer lugar, no demanda la adición de una fuente externa de materia orgánica, lo que simplifica el proceso y elimina la necesidad de insumos adicionales. Además, destaca por generar una menor cantidad de lodos, lo que conlleva una reducción notable en los costos asociados con la gestión de estos residuos. Otro aspecto clave es el poder utilizar azufre elemental como un donador de electrones económico, según lo señalado por Campos *et al.* (2009), lo que agrega un componente de eficiencia y viabilidad económica al sistema de desnitrificación autótrofa.

Algunos de los compuestos reducidos de azufre usados para la desnitrificación autótrofa son azufre elemental (S^0), sulfuros (S^{2-}) y tiosulfatos ($S_2O_3^{2-}$). También se han utilizado otras fuentes inorgánicas para el proceso, como el gas hidrógeno (H_2), sulfitos (SO_3^{2-}), tiocianato (SCN^-), pirita (FeS_2), óxido ferroso (Fe^{2+}) y arsénico (As^{3+}) (Di Capua *et al.*, 2019).

El uso de compuestos reducidos en azufre es ventajoso debido a que el producto final es sulfato, el cual es menos perjudicial para el medio, además que de los límites normativos son notoriamente menos estrictos en comparación con los otros contaminantes (Campos *et al.*, 2009). Algunas de las reacciones de desnitrificación, se presentan según fuente de azufre, como sigue.



En la desnitrificación autótrofa impulsada por estos compuestos, las bacterias del género *Thiobacillus* son las que predominan en la mayoría de los casos (Zhou *et al.*, 2023a). Otros autores también respaldan este hallazgo, como el trabajo de Chung (2014) y Moraes *et al.* (2012).

El trabajo de Beristain-Cardoso (2011) indica que, de las reacciones presentadas, la que posee una mayor velocidad de desnitrificación es la que utiliza $S_2O_3^{2-}$ como donador de electrones.

Además, según indican Liu *et al.* (2023), la desnitrificación autótrofa que se basa en el tiosulfato puede impulsar rápidamente la desnitrificación de otras fuentes de azufre, como S^{2-} , sulfuro ferroso (FeS) y SCN^- , dando oportunidad a la investigación de estos procesos. De aquí radica entonces la importancia del uso de tiosulfato en la presente investigación.

2.5.5. Desnitrificación mixotrófica

La desnitrificación mixotrófica corresponde a la combinación de los procesos de desnitrificación autótrofa y heterótrofa, lo que permite remover materia orgánica, nitrógeno y azufre de forma simultánea en las aguas residuales (Xu *et al.*, 2015).

El uso de ambos procesos es una estrategia atractiva que ayuda a resolver las desventajas que presentan ambos procesos por separado. La desnitrificación heterótrofa por su parte requiere un alto consumo de materia orgánica para lograr una desnitrificación óptima, que resulta en la generación de grandes cantidades de lodos. Por otro lado, la desnitrificación autótrofa tiene limitaciones en la remoción de nitrógeno, además de producir excedentes de sulfato y consumir alcalinidad (Ma *et al.*, 2023). Según el estudio de (Sun *et al.*, 2020), para potenciar la eficiencia de estos procesos se utilizan donadores de electrones como acetato y tiosulfato. El estudio también destaca que la abundancia de donadores de electrones permite una mejora significativa en la desnitrificación, al tiempo que disminuye las concentraciones de sulfato y óxidos nitrosos.

2.6. Reactores anaerobios

A lo largo de los años se han desarrollado varias tecnologías para los tratamientos de aguas residuales. El proceso anaerobio ha dado paso a diferentes reactores que han ido mejorando con el tiempo, estos se pueden clasificar como reactores de primera y segunda generación. Estos se diferencian en que en la primera generación el tiempo de residencia hidráulico es igual al tiempo de residencia celular, mientras que en el segundo el tiempo de residencia celular es mayor al tiempo de residencia hidráulico, aumentando notoriamente la eficiencia de estos y disminuyendo los volúmenes y costos de estos (Montalvo y Guerrero, 2022). En la Tabla 2 se presenta la clasificación de estos;

Tabla 2. Clasificación de los reactores anaerobios por generación. Fuente: (Montalvo y Guerrero, 2022)

Reactores de 1 ^{ra} Generación	Reactores de 2 ^{da} Generación		
	Con biomasa adherida	Con biomasa dispersa	Con biomasa granular
Tanques Sépticos	Lecho fijo	Reactor de contacto	UASB
Digestores convencionales	Filtro anaerobio con carbón activado	Reactor con membranas	Reactor de circulación interna
Mini digestores Lagunas anaerobias	Lecho Fluidizado o expandido	ASBR	EGSB

2.7. Reactor UAF

Un reactor UAF (*Upflow Anaerobic Filter*, por sus siglas en inglés) es un tipo de reactor biológico utilizado para la remoción de materia orgánica. Es de los primeros reactores que eliminaron la necesidad de tener una etapa adicional de separación de sólidos, ya que el mismo filtro otorga una alta retención de estos (Hassan *et al.*, 2013).

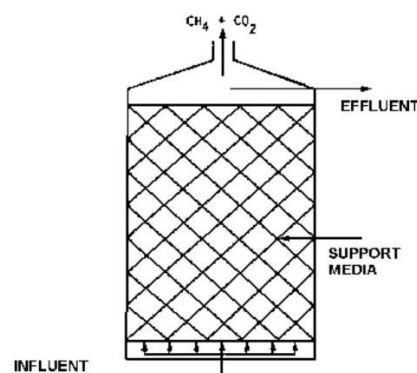


Figura 6. Prototipo esquemático de un reactor UAF. Fuente: (Hassan *et al.*, 2013)

De acuerdo con McCormick (2022) y Montalvo y Guerrero (2022), los parámetros de diseño y operación que deben considerarse al construir y operar un reactor UAF para SDA son los siguientes:

- Velocidad del líquido: La velocidad del fluido al ascender por el lecho es de suma importancia, ya que mantenerla a un nivel bajo y controlado evitará que este desprenda la biomasa que está adherida. De igual forma la tasa de recirculación debe mantenerse controlada por la misma razón.
- Relación diámetro(d) – profundidad(p): Este factor es de suma importancia para cualquier tipo de filtro, ya que una relación alta genera canalizaciones, impidiendo una buena distribución de la fase líquida en el filtro. Por otro lado, una relación muy baja puede obstruirse con facilidad. Recomendable una relación d/p entre 0,5 – 2.
- Área superficial: El área específica que tenga el soporte microbiano es de importancia para la adherencia de estos, aunque valores altos no necesariamente aseguran un gran rendimiento, por lo que aumentarlo supondría un mayor costo. Un valor cercano a los $100 \text{ m}^2/\text{m}^3$ es suficiente para el proceso.

2.8. Zeolita

Las zeolitas son minerales aluminosilicatos cristalinos con una estructura de tetraedros conectados, que han ganado interés en aplicaciones biológicas y médicas debido a su distintiva estructura porosa y capacidades de intercambio iónico. Su marco tridimensional consiste en unidades tetraédricas (TO_4) de silicio y aluminio, que generan una carga negativa neutralizada por cationes intercambiables como sodio, potasio o calcio, junto con la presencia de humedad acuosa en los espacios porosos. Estos tetraedros TO_4 se vinculan mediante oxígeno para formar marcos zeolíticos con orificios y cámaras bien definidos debido a la conexión espacial entre los tetraedros SiO_4 y AlO_4 en el sistema tridimensional (Li *et al.*, 2022).

Estas propiedades porosas hacen que la zeolita funcione como tamices moleculares que pueden absorber y separar selectivamente especies moléculas de tamaño, forma y polaridades específicas, por lo que tienen un alto rendimiento en procesos de separación complejos, como las separaciones de hidrocarburos, desalinización y deshidratación. Además, la zeolita puede

funcionar como catalizadores sólidos, capaces de catalizar reacciones complejas e inaccesibles para otros catalizadores convencionales (Li y Yu, 2021).

2.8.1. Zeolita Chilena

La zeolita chilena, denominada "Ch-zeolita" según la revisión de Montalvo *et al.* (2012), ha sido detalladamente caracterizada en términos de su composición química y mineralógica la cual se detalla en la Tabla 3. Esta zeolita está mayormente compuesta por clinoptilolita y mordenita, destacando su área superficial específica considerablemente alta, un parámetro crucial para los procesos de adsorción. Los poros intracristalinos ocupan entre el 20% y el 50% del volumen total, con diámetros en el rango de 3 a 10 Å (Fajardo, 2011). En el contexto de la investigación en curso, se planea utilizar la zeolita chilena como medio de soporte microbiano, basándose en los estudios previos que también han explorado su aplicación en diversos reactores rellenos.

Tabla 3. La composición química y mineralógica de la zeolita chilena. Fuente: (Montalvo *et al.*, 2012)

Composición química		Composición mineralógica	
Compuesto	%	Tipo	%
SiO ₂	67,74	Clinoptilolita	53
Fe ₂ O ₃	3,6	Mordenita	40
CaO	3,46	Otros	7
Al ₂ O ₃	13,01		
MgO	0,78		
K ₂ O	0,53		
Cenizas	10,5		

CAPITULO 3

3. Metodología

La preparación del reactor UAF comienza con el enriquecimiento de los inóculos desnitrificantes autótrofos y heterótrofos por separado, para luego proceder a mezclarlos e inocularlos en el reactor.

3.1. Enriquecimiento Autótrofo

El enriquecimiento de las bacterias autótrofas se realizó en una investigación previa a esta de Ávila (2023), utilizando un reactor SBR con un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 3 días. El inóculo utilizado para este enriquecimiento proviene de la empresa Agrícola AASA, de una laguna anaerobia que trata purines de cerdo. La concentración inicial del inóculo fue de 68,7 gSSV/L, este se alimentó con agua residual sintética preparada según Garrido (2014); donde la fuente de azufre era tiosulfato de sodio pentahidratado como donador de electrones y nitrato de potasio como fuente de nitrógeno y aceptor de electrones, reduciéndose hasta el nitrógeno gaseoso. Este enriquecimiento alcanzó un porcentaje de remoción de nitrato que fluctúa entre el 96,9 y 98,1%.

3.2. Enriquecimiento Heterótrofo

3.2.1. Configuración del reactor

Se inicia con el montaje de un reactor SBR para el enriquecimiento de bacterias desnitrificantes heterótrofas. El diseño se muestra en la Figura 7, este reactor consiste en una botella ámbar de laboratorio de un volumen de 3 L y un volumen útil de 1,6 L, el cual tiene un agitador electromecánico en la parte superior el cual funciona a una velocidad de 150 RPM, una salida para la descarga del sobrenadante, una entrada para la alimentación y una salida de gases con válvula antirretorno. El reactor fue sellado herméticamente para mantener condiciones anóxicas y se mantuvo a temperatura controlada 33°C utilizando un calefactor y sensor de temperatura, dentro de una cámara aislada.

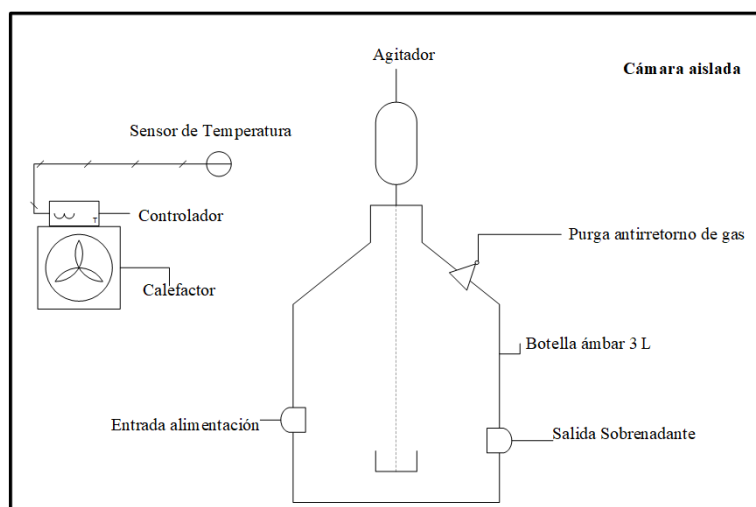


Figura 7. Diseño del reactor SBR para el enriquecimiento heterótrofo.

La estrategia de operación utilizada fue similar a la de autores como Garrido (2014) y Fajardo (2011). Esta consistió en una operación *fed batch* con un TRH de 6 días al inicio y posteriormente de 3 días. Al finalizar cada ciclo, se detiene al agitador para sedimentar la biomasa por 1 hora, se retira 1 L de sobrenadante y luego se adiciona 1 L de alimentación. Finalmente se vuelve a encender el agitador.

3.2.2. Inóculo

Al igual que en el enriquecimiento autótrofo, el inóculo utilizado para este enriquecimiento proviene de la empresa Agrícola AASA, de su laguna anaerobia que trata purines de cerdo. Se utilizaron en total 600 mL de lodo, donde en la Tabla 4 se indican sus características iniciales.

Tabla 4. Caracterización del inóculo para el enriquecimiento heterótrofo.

Caracterización Inóculo		
Parámetro	Valor	Unidad
pH	8,6	-
DQO Total	15382,4	mg/L
DQO Soluble	1200,9	mg/L
SST	16400,0	mg/L
SSV	10733,3	mg/L
ST	19700,0	mg/L
SV	10733,3	mg/L
Amonio	1157,3	mg/L

3.2.3. Alimentación

La alimentación utilizada para este enriquecimiento es similar a utilizada por autores como Moraga (2016) y Lillo (2017) correspondiente a una mezcla mineral base compuesta principalmente por acetato de potasio, como fuente materia orgánica y nitrato de potasio como fuente de nitrógeno, y elementos trazas. La relación C/N de esta alimentación es de 2,19 mol/mol. La Tabla 5 y

Tabla 6 detallan las composiciones de este medio.

Tabla 5. Alimentación sintética para el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo.

Alimentación Heterótrofa		
Compuesto	Cantidad	Unidad
KNO ₃	1,43	g/L
K ₂ HPO ₄	1,84	g/L
KH ₂ PO ₄	0,30	g/L
CH ₃ COOK	1,52	g/L
NH ₄ Cl	0,10	g/L
Micronutrientes	1,00	mL/L

Tabla 6. Micronutrientes de la alimentación para el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo.

Micronutrientes		
Compuesto	Cantidad	Unidad
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	0,7287	g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30	g/L
ZnCl ₂ ·4H ₂ O	0,6542	g/L
CaCO ₃	2	g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,5	g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25	g/L
HCl	50	g/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,25	g/L
H ₃ BO ₃	0,5	g/L

3.3. Puesta en Marcha del Reactor UAF

3.3.1. Configuración del Reactor

Se montaron dos reactores UAF que consisten en cilindros verticales de acrílico de 16 cm de alto, 10 cm de diámetro y 3 mm de espesor. Estos cuentan con tres salidas de unos 6 – 7 mm de diámetro exterior para la fase líquida. En su interior contienen soportes para el lecho empacado, el cual tiene una altura de 10 cm. Los lechos se mantienen empaquetados entre dos mallas metálicas de acero inoxidable. Los cilindros se cierran por el extremo superior con tapas de acrílico con sellos de silicona, estas tienen 10 cm de diámetro y 3 mm de espesor, además cuentan con salidas para la fase gaseosa mediante válvulas antirretorno. Por los extremos inferiores se cierran con embudos de polipropileno de 6 – 8 cm de altura con salidas para la fase líquida en la parte inferior. Los embudos y los cilindros se unen mediante flanges y se sellan con silicona. En la Figura 8 se ilustra el diseño de los reactores.

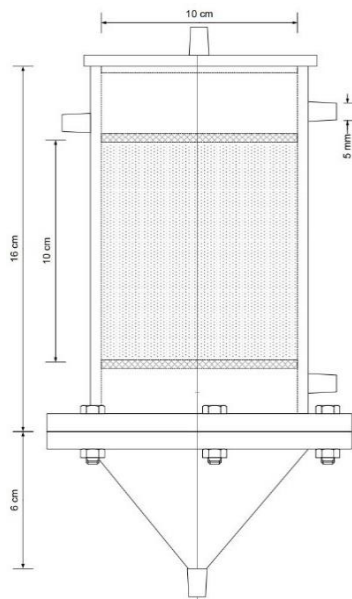


Figura 8. Diseño del reactor UAF. Fuente: (Fortt, 2014)

Los reactores se sostuvieron en soportes universales, con mangueras para la fase líquida conectadas a bombas peristálticas. Se mantuvieron a temperatura controlada a 33°C utilizando un calefactor y sensor de temperatura, dentro de una cámara aislada.

Para los lechos de los filtros se utilizó zeolita natural chilena hasta completar el volumen para el filtro, esta tenía una granulometría en el rango de 3 – 5 mm, previamente lavada varias veces con agua destilada y secada en estufa por 24 h a 105°C. En la Tabla 11 del Anexo A se indican las características de la zeolita entregadas por el proveedor ZeoMaule.

Los volúmenes para cada fase líquida se midieron manualmente, considerando el volumen total de cada reactor y el espacio utilizado por el lecho de zeolita; para el reactor 1 fue de 660 mL y para el reactor 2 de 680 mL.

Por último, se enlista los equipos complementarios utilizados, los cuales están indicados en la Tabla 12 del Anexo A.

3.3.2. Inóculo

El inóculo utilizado fue la mezcla de las biomasas enriquecidas autótrofas y heterótrofas obtenidas previamente, esto para generar proceso desnitrificación mixotrófica. La cantidad de inóculo de cada tipo se basa en la relación identificada por Peirano (2020), la cual determina que para alcanzar el óptimo en la remoción de nitrato, la relación de biomasa heterótrofa respecto a la autótrofa (H/A) debe ser de 0,54 gSSV/gSSV.

Considerando este parámetro y las mediciones de obtenidas de cada enriquecimiento, en la Tabla 7 se determina entonces el volumen de lodo a inocular de cada una;

Tabla 7. Cálculo del volumen de inóculo autótrofo y heterótrofo para el reactor UAF.

Tipo Biomasa	SSV mg/L	Volumen mL	SSV g	Relación H/A
Heterótrofa	40900,0	71,0	2,90	0,54
Autótrofa	41644,4	129,0	5,37	

El inóculo fue introducido directamente en el lecho al momento del montaje, cuando el reactor fue llenado al 50% de zeolita.

3.3.3. Alimentación

La alimentación utilizada para el proceso de desnitrificación mixotrófica consiste en una combinación de los sustratos utilizados para los dos tipos de enriquecimiento. En ambos casos, la concentración de los compuestos fue ajustada, ya que en los reactores SBR se suministraba 1 L de alimentación, la cual se diluía en el volumen útil de 1,6 L. Este factor de dilución se consideró para mantener las biomasas en las mismas condiciones que tenían y así evitar la desestabilización del UAF. En la Tabla 8 y la Tabla 9 se describe la alimentación resultante;

Tabla 8. Concentraciones de la alimentación desnitrificante mixotrófica para el reactor UAF.

Alimentación UAF		
Compuesto	Cantidad	Unidad
KNO ₃	0,89	g/L
K ₂ HPO ₄ *	11,51	g/L
NaH ₂ PO ₄ *	1,54	g/L
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	3,13	g/L
NaHCO ₃	0,94	g/L
CH ₃ COOK**	1,14	g/L
NH ₄ Cl	0,06	g/L
Micronutrientes	1,00	mL/L

* La molaridad de la solución tampón se varió entre 0,1M y 0,05M (Ver Anexo I).

**Concentración ajustada en base a la concentración final de acetato en el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo (Ver 4.1)

Tabla 9. Micronutrientes de la alimentación desnitrificante mixotrófica para el reactor UAF.

Micronutrientes		
Compuesto	Cantidad	Unidad
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	0,7287	g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	30	g/L
ZnCl ₂ ·4H ₂ O	0,6542	g/L
CaCO ₃	2	g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,5	g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	g/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25	g/L
HCl	50	g/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,25	g/L
H ₃ BO ₃	0,5	g/L

La relación C/N de esta alimentación es de 2,62 mol/mol ligeramente mayor a la de autores como Lillo (2017) y Moraga (2016), debido al aumento de acetato de potasio durante el enriquecimiento (Ver 4.1). Por otro lado, la relación S/N es de 2,85 mol/mol, similar a la de autores como Muñoz (2015), Hernández (2014), Fortt (2014) y Fajardo (2011) siendo el nitrato el reactivo limitante en ambos casos.

3.3.4. Estrategia de Puesta en Marcha

La puesta en marcha del reactor UAF consta de dos fases. La primera fase implica el enriquecimiento del filtro, realizado mediante un proceso *fed batch*, con el objetivo de que la biomasa se adhiera al soporte de zeolita. En esta etapa, se alimentó el reactor cada 3 días, manteniendo el mismo TRH que la biomasa tenía en sus enriquecimientos anteriores para preservar las condiciones y evitar la desestabilización. Esta fase se mantuvo hasta que se observó visualmente un color negro en el filtro, indicando una alta adherencia de la biomasa.

La segunda fase corresponde a la operación continua, donde se mantiene un flujo constante de alimentación. Esta fase se prolongó hasta lograr una remoción estable durante al menos 3 TRH (Muñoz, 2015), además de que dicha remoción sea superior al 90%. La velocidad de carga nitrogenada (VCN) con la que se operó en esta etapa viene dada por la ecuación (11);

$$VCN \left[\frac{gN}{L \cdot d} \right] = \frac{Q \left[\frac{L}{d} \right] \cdot C \left[\frac{gN}{m^3} \right]}{V_{reactor} [L]} \quad (11)$$

$$VCN \left[\frac{gN}{L \cdot d} \right] = \frac{C \left[\frac{gN}{L} \right]}{TRH[d]}$$

Relacionando la VCN con el TRH, se obtiene el valor de VCN con la que se operaba el reactor en la primera etapa *fed batch*, la cual era de 0,046 kgN/(m³·d). Con este valor se despeja el caudal de la ecuación inicial, entregando el caudal de operación para la etapa continua de ambos reactores, de forma que se mantiene la misma VCN evitando una posible desestabilización.

3.3.5. Parámetros de medición y control

Los parámetros controlados en el estudio se describen la Tabla 10, en donde se indica junto a cada parámetro la metodología asociada y la referencia correspondiente. Todos los parámetros se midieron periódicamente cada 3 días, siguiendo los ciclos descritos en la estrategia descrita anteriormente.

Tabla 10. Parámetros de control y metodología de análisis utilizada en los reactores UAF.

Análisis	Metodología	Referencia	Anexo
Nitrato	Espectro UV-VIS (205 nm)	SM 4500-NO ₃ ⁻ B	B
Nitrito	Espectro UV-VIS (543 nm)	SM 4500-NO ₂ ⁻ B	C
Amonio	Espectro UV-VIS (640 nm)	SM 4500-NH ₃ F	D
Sulfato	Espectro UV-VIS (420 nm)	SM 4500-SO ₄ ²⁻ E	E
Tiosulfato	Yodometría		F
COT	Combustión a Alta Temperatura	SM 5310 B	G
pH	Potenciometría	SM 4500-PH	H

La toma de muestra se realizó al cumplir el TRH correspondiente en ambas etapas, para ello se utilizaron dos Tubos Falcon de 50 mL para cada reactor. Se tomaron muestras de la alimentación de los reactores y de la descarga de ambos.

3.3.6. Análisis de la participación en la desnitrificación

La determinación de la participación en el proceso de desnitrificación por parte de la biomasa autótrofa y biomasa heterótrofa es esencial para evaluar que la desnitrificación mixotrófica se está llevando a cabo correctamente y de forma equilibrada.

Para analizar dicha participación, se asume que todo el sulfato producido proviene exclusivamente de la desnitrificación autótrofa. Este supuesto permite calcular la cantidad de nitrato removido por la biomasa autótrofa mediante la ecuación (8) de desnitrificación autótrofa. Esta cantidad se diferencia con el nitrato total removido, obtenido por los análisis

de laboratorio, resultando en la cantidad de nitrato removido por la biomasa heterótrofa. Con estos datos, se puede obtener entonces un porcentaje de participación relativo en el proceso total de la desnitrificación.

$$NO_3^-_{Removido} = NO_3^-_{Alimentación} - NO_3^-_{Descarga} \quad (12)$$

$$NO_3^-_{Removido} = NO_3^-_{Removido\ por\ B.Heterótrofa} + NO_3^-_{Removido\ por\ B.Autótrofa}$$

Los resultados obtenidos permiten obtener de forma cuantitativa la contribución de ambas biomasas en la desnitrificación mixotrófica. Considerando que el ideal es que ambas biomasas trabajen en equilibrio, se estima que el rango en que refleja una participación equitativa se sitúa alrededor de 40-60% para cada tipo de biomasa.

CAPITULO 4

4. Resultados

4.1. Enriquecimiento para Desnitrificación Heterótrofa

La etapa de enriquecimiento de la biomasa heterótrofa duró en total 111 días, donde se midió principalmente los parámetros de pH, concentración de nitrato, concentración de amonio y DQO en la alimentación y descarga del sobrenadante, además de la concentración de nitrito en la descarga.

Los resultados obtenidos del pH a lo largo de esta etapa son los que se observan en la Figura 9. Se observó en el primer ciclo que el pH se mantuvo sobre 8,5 lo cual se contrasta con los valores de remoción de nitrato en este ciclo, los cuales fueron cercanos a cero. Esto se debió a que el inóculo traía una alta concentración de amonio como se indicó en la Tabla 4 y la solución tampón no fue suficiente para mantener el pH dentro del rango óptimo para la desnitrificación. Por lo que se aumentó la concentración de la solución tampón a la definida en la Tabla 5 siguiendo la ecuación de Henderson-Hasselbach para los siguientes ciclos, de ahí en adelante el pH se mantuvo dentro del rango óptimo para la desnitrificación.

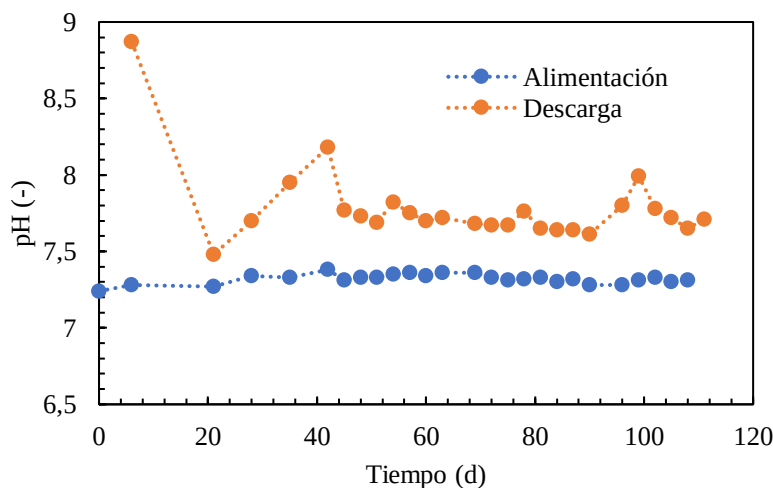


Figura 9. Comportamiento del pH en el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo durante el tiempo de operación.

Los resultados de la concentración de nitrato y nitrito se indican en la Figura 10. Se observó que, una vez ajustado el pH, la remoción fue alta en los primeros ciclos, pero luego decayó a un 50% aproximadamente. Esta caída puede tener algunas razones, una de ellas puede ser el aumento en la concentración de nitrito, inhibiendo el proceso de desnitrificación. La concentración de nitrito también decae luego de un tiempo, indicando desnitrificación completa, pero la remoción de nitrato no vuelve a subir, posiblemente a que la biomasa quedó aletargada debido a la inhibición, tal como se indica en la revisión de Albina *et al.* (2019), que incluye diferentes investigaciones.

Independiente de la razón, en el día 90 se optó por aumentar la concentración de acetato de potasio, de 1,52 g/L a 1,82 g/L, aumentando la relación C/N a un valor de 2,62 mol/mol, acercándose más al óptimo de la relación C/N para la desnitrificación heterótrofa indicado por la teoría. El cambio al aumentar la materia orgánica fue notorio, la remoción del nitrato aumentó hasta estabilizarse cerca del 85% durante 3 TRH, con lo cual se concluyó el enriquecimiento. El máximo de remoción de nitrato obtenido fue de 87,11%.

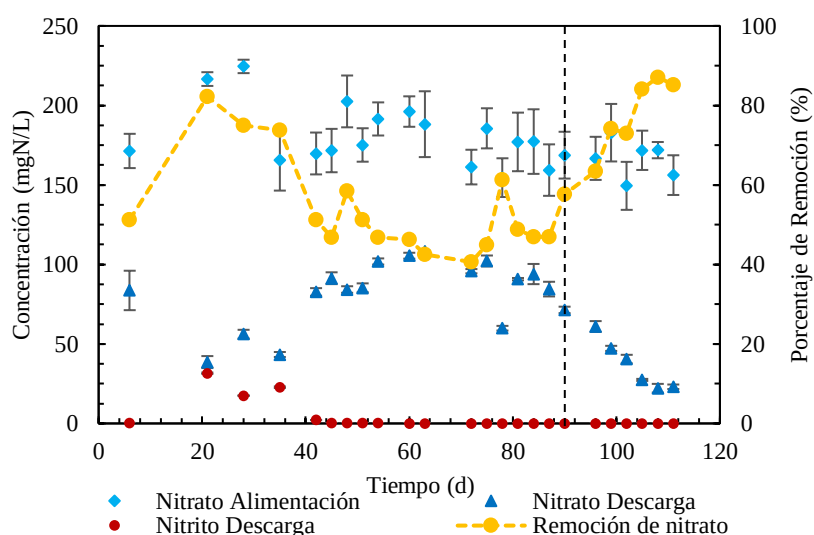


Figura 10. Concentración y remoción de los compuestos nitrogenados en el enriquecimiento desnitrificante heterótrofo durante el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el aumento de la materia orgánica).

Los resultados del comportamiento de la DQO en la entrada y salida del reactor, junto con la remoción de esta se aprecian en la Figura 11. Se observó que, en el primer ciclo, la DQO de la descarga fue mayor a la de la alimentación, lo que tiene sentido si se considera el aporte

de DQO inicial proveniente del inóculo, esto sumado a que la agitación pudo romper los flóculos del inóculo para dar paso al enriquecimiento, aportando más DQO al sobrenadante. Luego se observó que el porcentaje de remoción fue en aumento en los primeros ciclos, hasta mantenerse sobre el 85% de remoción de materia orgánica en casi toda la etapa, a pesar de que el nitrato era el reactivo límite y este no tuvo una alta remoción. El máximo de remoción obtenido fue de 98,43%. Valores similares se obtuvieron en la investigación de Guerrero *et al.* (2014), en donde obtuvieron en promedio una remoción del 99,3% utilizando una relación C/N mucho más alta de 5,5 y en la investigación de Huang *et al.* (2021), donde obtuvieron una remoción cercana al 100%.

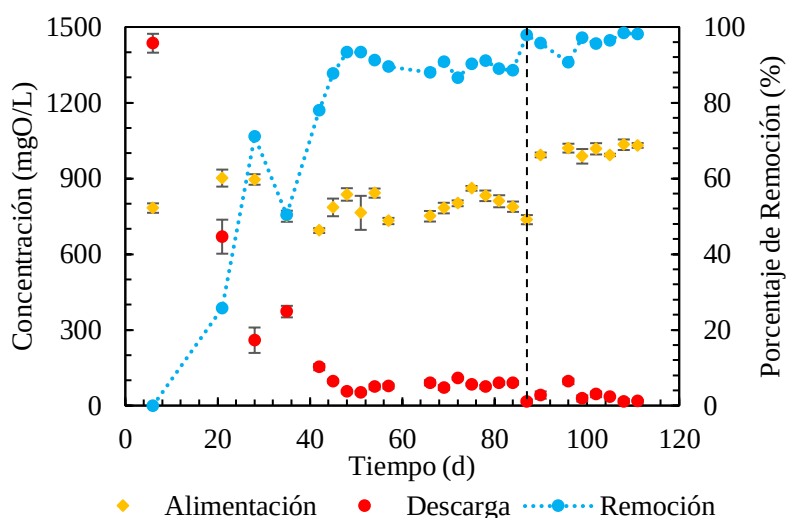


Figura 11. Concentración y remoción de la DQO en el enriquecimiento heterótrofo durante el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el aumento de la materia orgánica).

La alta remoción de DQO, incluso cuando el reactivo límite agregado para la reacción (4) es el nitrato, indica que hubo otros mecanismos de remoción de la materia orgánica, como puede ser la síntesis de biomasa, tal como lo propone Guo *et al.* (2023) en su investigación. Dicha investigación concluye que el exceso de materia orgánica es asimilado por otros géneros de bacterias heterótrofas que se enriquecen en conjunto con las bacterias desnitrificantes heterótrofas, las cuales están presentes dentro del consorcio, en este caso, el inóculo proveniente de la laguna anaerobia.

4.2. Puesta en Marcha UAF

La puesta en marcha comenzó con la etapa de enriquecimiento del filtro. Esta tuvo en total 99 días operando en modo *fed batch*, alimentando a los reactores en ciclos de 3 d. En la Figura 12 y la Figura 13 se ve el progreso de la adherencia de los microorganismos a la zeolita, en donde las etapas de la formación de biopelícula se pueden distinguir de forma cualitativa.

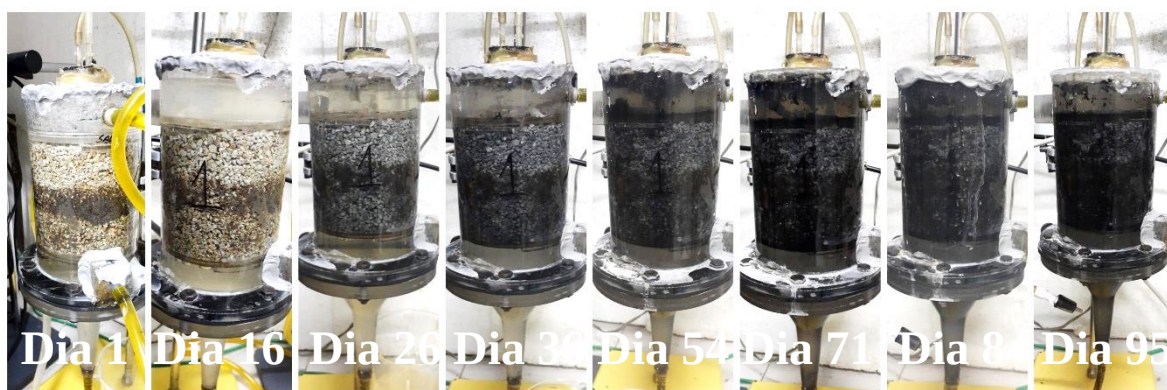


Figura 12. Etapas de formación de la biopelícula en el reactor UAF 1.

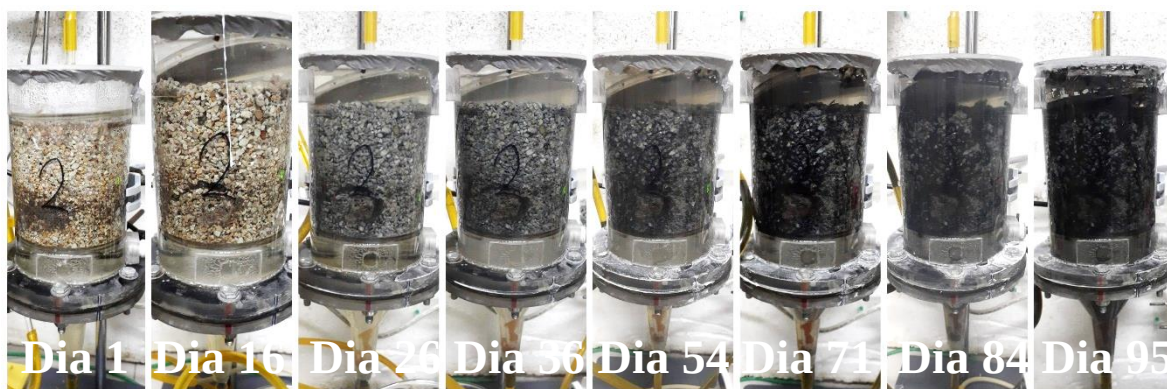


Figura 13. Etapas de formación de la biopelícula en el reactor UAF 2.

De forma cualitativa, similar a lo que describió Moraga (2016), se observó que el reactor 1 completó su enriquecimiento entre el día 54 y 71, rango de tiempo semejante a lo obtenido por González (2019), ya que en ese momento se observó el desprendimiento de la biomasa. Este reactor se mantuvo operando en el mismo modo hasta que el reactor 2 completó su enriquecimiento en el día 95. La diferencia se pudo deber a los problemas de fugas que tuvo

mayormente el reactor 2. Una vez alcanzado este punto se inició la operación continua hasta el día 114.

4.2.1. Potencial de Hidrógeno (pH)

Se midió el pH durante toda la operación de ambos reactores para mantener el seguimiento de las condiciones óptimas para la desnitrificación. Los resultados se muestran en la Figura 14. Se observó que al inicio de la operación los valores de pH fueron ácidos, coherente con la actividad de bacterias desnitrificantes autótrofas, incluso bajando de 5 que es el rango óptimo para la desnitrificación. Fue necesario ir ajustando de manera gradual la concentración de la solución tampón para mantener a ambos reactores dentro del pH óptimo. Una vez entrado en el rango, se mantuvo estable dentro del rango 7 – 8.

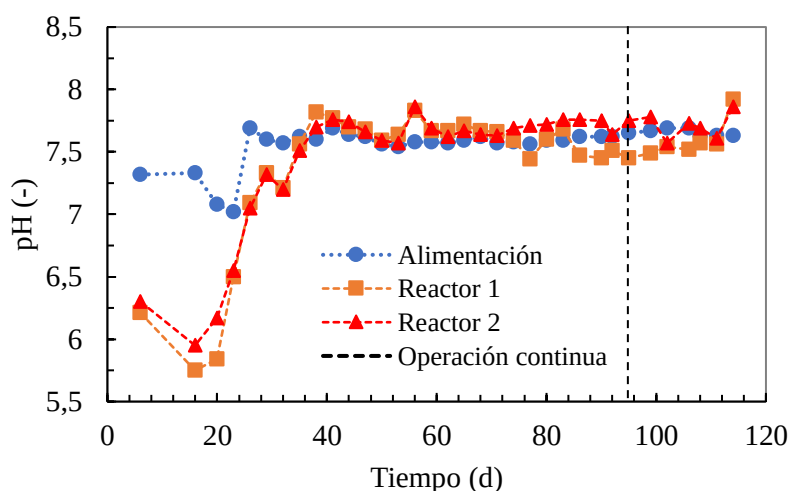


Figura 14. Comportamiento del pH en los reactores UAF durante el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el cambio de etapa).

4.2.2. Compuestos de nitrógeno

Las concentraciones de nitrato y nitrito son los principales compuestos en el proceso de desnitrificación, que permiten realizar un seguimiento de la reacción global y los compuestos intermediarios. En la Figura 15 se aprecian las concentraciones de estos en el reactor 1. Se observó que el porcentaje de remoción de nitrato inició en el rango de 80 a 85%, el cual fue

aumentando a medida que la biomasa se fue adhiriendo a la zeolita. El día 95 el reactor alcanzó su máximo de remoción con un valor del 99,78% para una VCN de 0,046 kgN/(m³·d). Valores similares obtuvo Moraga (2016), donde obtuvo un máximo de 99,18% a una VCN de 0,02 kgN/(m³·d) y Jeria (2016), quien obtuvo un máximo de 99,5% para una VCN de 0,1 kgN/(m³·d). Considerando las diferencias en el tipo de reactor utilizado y la procedencia de las biomasa con los autores indicados, es razonable decir que la propuesta presentada en esta memoria fue efectiva. Posteriormente, iniciada la operación continua, el alto porcentaje obtenido se mantuvo estable cercano al valor de 95% por al menos 3 TRH, con lo cual se concluyó la puesta en marcha siguiendo el criterio dado. La concentración de nitrito se mantuvo cercana a cero durante toda la operación, indicando una desnitrificación completa por parte de las bacterias. El máximo de concentración de nitrito fue de 158 µg N/L, el cual es un valor bajo que no alcanza a inhibir el proceso de desnitrificación, según lo indicado por An *et al.* (2012).

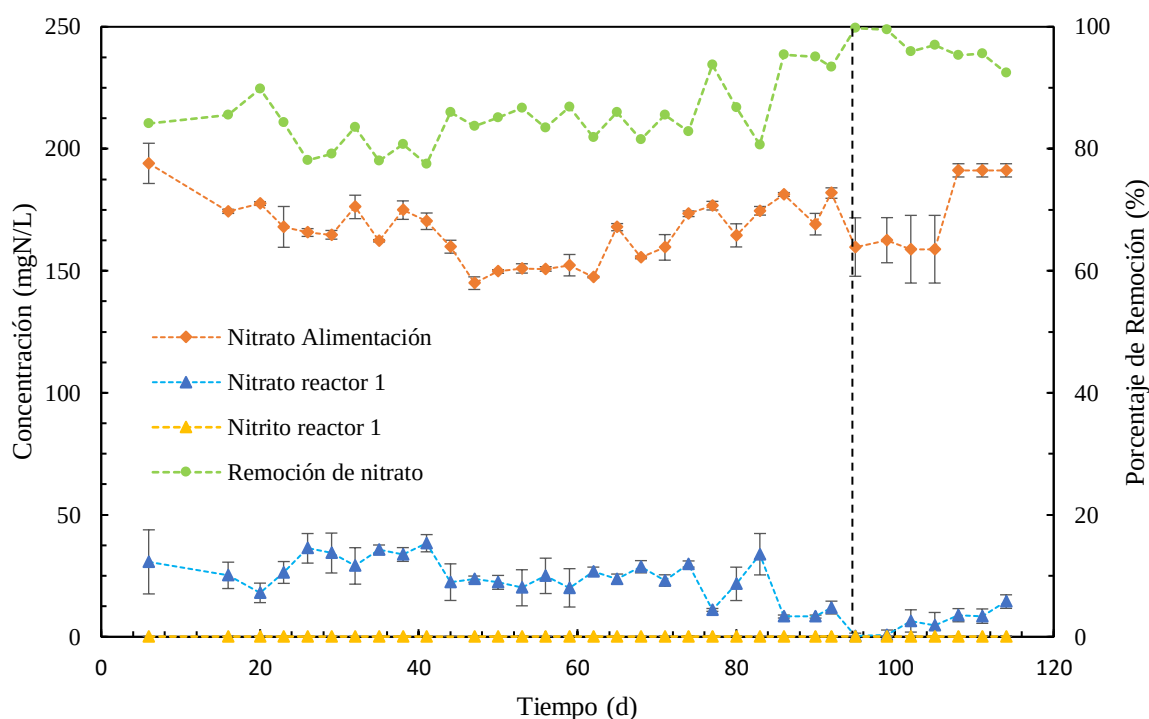


Figura 15. Concentración y porcentaje de remoción de los compuestos nitrogenados en el reactor UAF 1 durante el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el cambio de etapa).

Por otro lado, las concentraciones de nitrato y nitrito en el reactor 2 se ven en la Figura 16. De igual forma se observó que el porcentaje de remoción de nitrato inició en el rango de 75 a 85%, el cual también fue en aumento a medida que la biomasa se fue adhiriendo a la zeolita. El día 114 el reactor alcanzó su máximo de remoción con un valor del 95,38% para una 0,046 kgN/(m³·d), valor comparable con los autores Moraga (2016) y Jeria (2016) ya mencionados. Otros autores que han obtenido resultados similares con otras tecnologías son Lillo (2017) quien obtuvo una remoción máxima de 99,4% para una VCN de 0,55 kgN/(m³·d) y Giuras (2015) que alcanzó una remoción máxima de 85,3% para una VCN de 0,28 kgN/(m³·d). Luego, iniciada la operación continua, el porcentaje de remoción logró estabilizarse cercano al valor de 95% por al menos 3 TRH, con lo cual también se concluyó la puesta en marcha de este reactor. De la misma manera que el reactor 1, la concentración de nitrito se mantuvo cercana a cero durante toda la operación, donde el máximo concentración de nitrito fue de 156 µg N/L, valor que no alcanza a inhibir el proceso de desnitrificación según An *et al.* (2012), indicando también desnitrificación completa en este reactor.

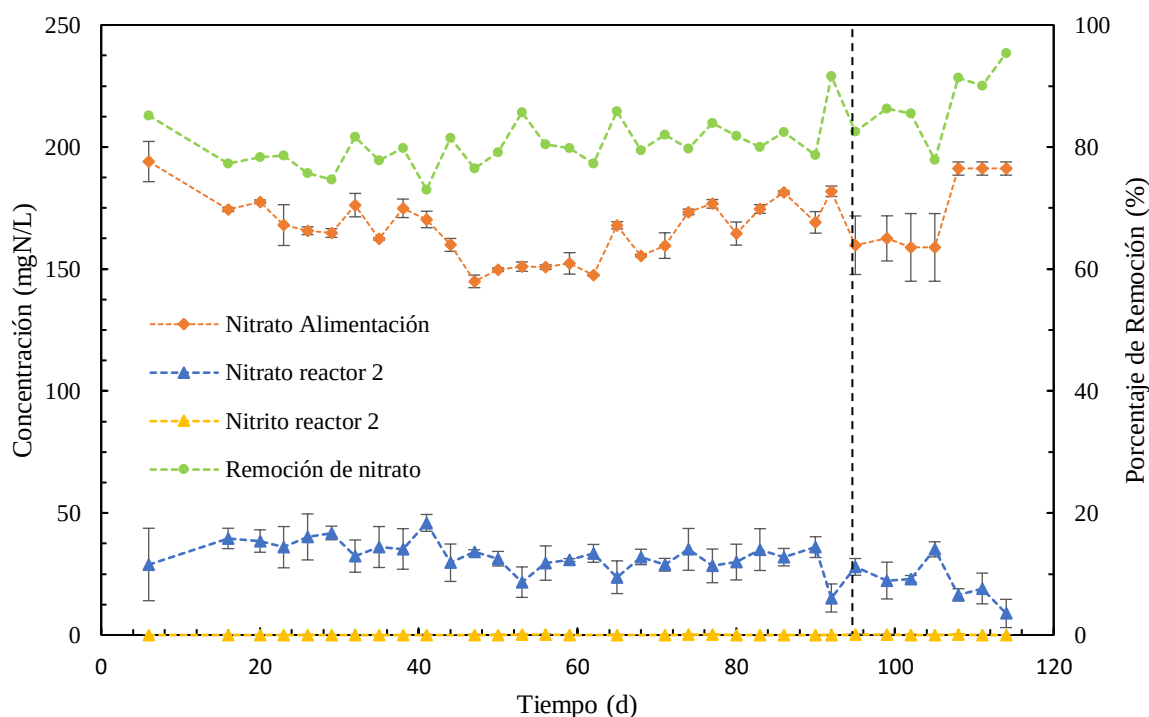


Figura 16. Concentración y porcentaje de remoción de los compuestos nitrogenados en el reactor UAF 2 durante el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el cambio de etapa).

4.2.3. Compuestos de azufre

La concentración de azufre y tiosulfato permiten realizar un seguimiento de la desnitrificación realizada por la biomasa autótrofa. Para el reactor 1 estos valores se muestran en la Figura 17. La remoción de tiosulfato en la mayoría de la etapa *fed batch* se mantiene dentro del rango de 40 – 60%. Considerando que el tiosulfato se añadió en exceso en la alimentación, el resultado es coherente, ya que no se puede remover todo el tiosulfato por desnitrificación. El resultado es similar al obtenido por Guerrero *et al.* (2014) donde lograron un máximo de remoción de solo el 32,5%, pero que fue razonable debido a que el tiosulfato también fue añadido en exceso. Pasado el día 83 la remoción aumentó hasta el rango 80 – 100%, donde alcanzó su máximo 98,89% en los días 95 y 99, para luego estabilizarse a un valor cercano al 87%.

El aumento de remoción se pudo deber a dos razones, la primera es el aumento de la actividad desnitrificante autótrofa, la cual se puede confirmar observando la concentración de sulfato en el reactor que también aumentó en esa fecha, alcanzando su máximo de 1071 mg/L de sulfato producido (357 mg S-SO₄⁻/L). La investigación de Hernández (2014) obtuvo un salto similar, desde el 60,1% al 98,9% de remoción al aumentar la VCN en su reactor, aunque aclara que sus dispersos valores del sulfato producido no terminan de confirmar la hipótesis. Debido a esto la segunda razón se pudo deber a que el tiosulfato se remueve mediante otros mecanismos, como su conversión a azufre elemental y sulfitos debido a presencia de oxígeno, similar a lo observado por Moraga (2016), quien obtuvo un máximo de 96,51% de remoción y notó la formación de un precipitado blanco en el lecho del reactor, que indica una posible presencia de azufre elemental. El mismo precipitado fue observado por González (2019). La investigación de Houghton *et al.* (2016) confirma que la especie bacteriana *Thiomicrospira thermophila* convierte el tiosulfato a azufre elemental a valores de pH entre 5,5 y 8, por otro lado, la investigación de Cron *et al.* (2019) confirma la formación de precipitado de azufre elemental a partir de tiosulfato por parte de la especie *Sulfuricurvum kujiense* en condiciones anaerobias, posiblemente mediante un proceso de organomineralización. Ambas investigaciones podrían confirmar de formación de azufre elemental en el reactor y explicar la alta remoción del tiosulfato.

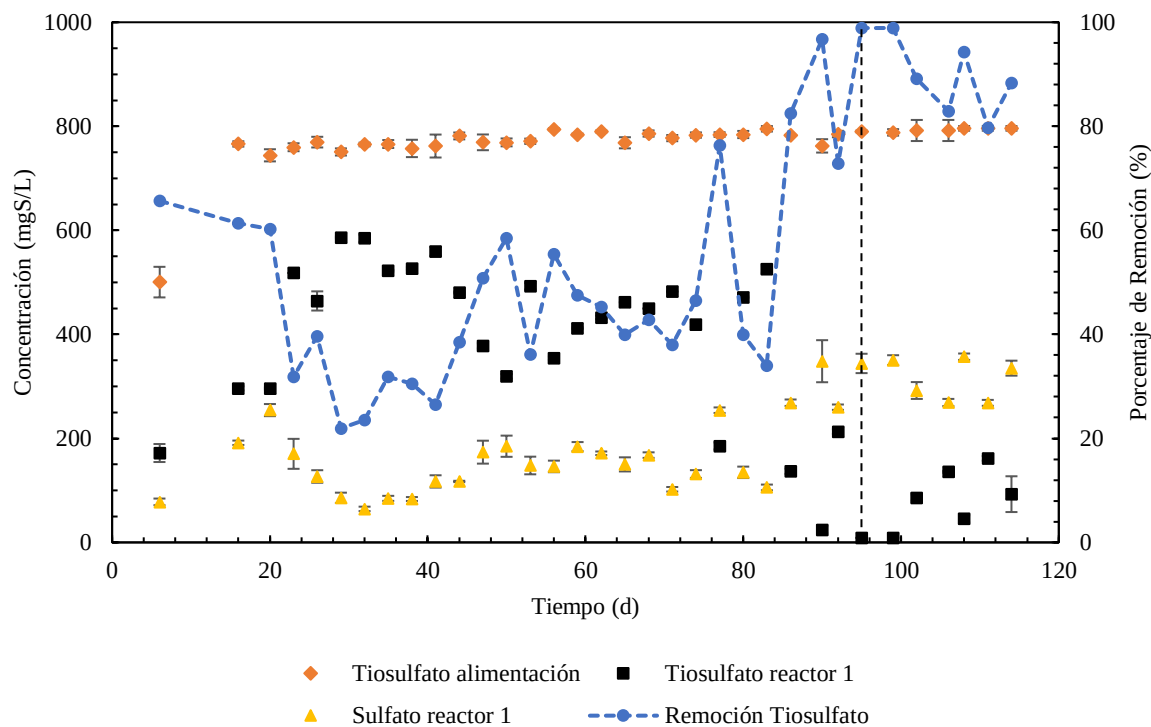


Figura 17. Concentración y porcentaje de remoción de los compuestos azufrados en el reactor UAF 1 durante el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el cambio de etapa).

En la Figura 18 se muestra el balance de masa del azufre para el reactor 1, en donde se aprecia de mejor forma el comportamiento ya señalado de los compuestos de azufre, en donde al inicio solo una parte del tiosulfato se convertía en sulfato, mientras que el resto se descargaba por el efluente. Desde el día 83 comenzó el aumento de la conversión del tiosulfato a sulfato, pero el resto del tiosulfato se convertía posiblemente a otras formas de azufre, como sulfitos, azufre elemental y sulfuros, debido a los mecanismos ya mencionados anteriormente. Estas otras formas de azufre terminaron descargándose o pudieron quedar en el lecho de zeolita sin la posibilidad de ser medidas en el efluente. Para el caso de los sulfuros, la investigación de Yu *et al.* (2022) menciona que la zeolita tiene buenas propiedades adsorbentes de este compuesto, lo que podría respaldar lo mencionado.

La recomendación que nace entonces de esta falta de información es la adición de análisis para parámetros como el azufre elemental y sulfitos, que permitan completar el balance de azufre y permitan entender los diferentes mecanismos en los que participa el tiosulfato, además de un análisis de ADN para lograr verificar la presencia de estas otras especies que interfieren

con el tiosulfato, para así finalmente optimizar de mejor manera el proceso de desnitrificación.

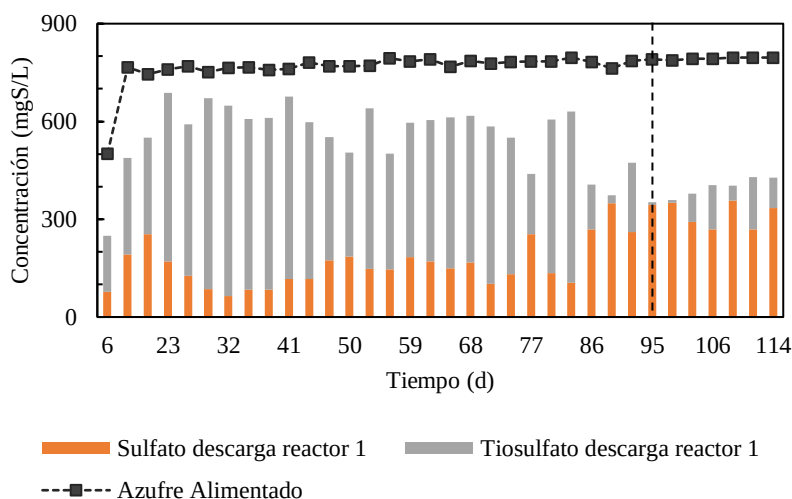


Figura 18. Balance de masa del azufre del reactor UAF 1 en el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el cambio de etapa).

Para el reactor 2 estos valores se ven en la Figura 19. El porcentaje de remoción de tiosulfato en la mayoría de la etapa se mantiene dentro del rango de 20 – 40%. Considerando que el tiosulfato se añadió en exceso en la alimentación, el resultado es coherente, ya que no se puede remover todo el tiosulfato por desnitrificación, similar a lo obtenido por Guerrero *et al.* (2014).

Se observó que en los primeros días la remoción tuvo un valor alto cercano al 60%, donde el primer ciclo fue el máximo de remoción en toda la operación con un valor de 74,67%, pero la producción de sulfato fue baja bastante baja en comparación con el reactor 1 y los días posteriores. Este aumento en la remoción se puede explicar con problemas de fuga durante el armado, que permitió la entrada de una gran cantidad oxígeno al reactor, generando otros procesos de remoción de tiosulfato como se mencionó anteriormente. Pasado el día 20 la remoción se mantuvo en el rango mencionado, donde alcanzó su segundo máximo con un valor de 47,54% el día 92. La producción de sulfato también se mantuvo baja en comparación con el reactor 1, con un máximo de 614 mgSO₄⁻/L (205 mg S-SO₄⁻/L).

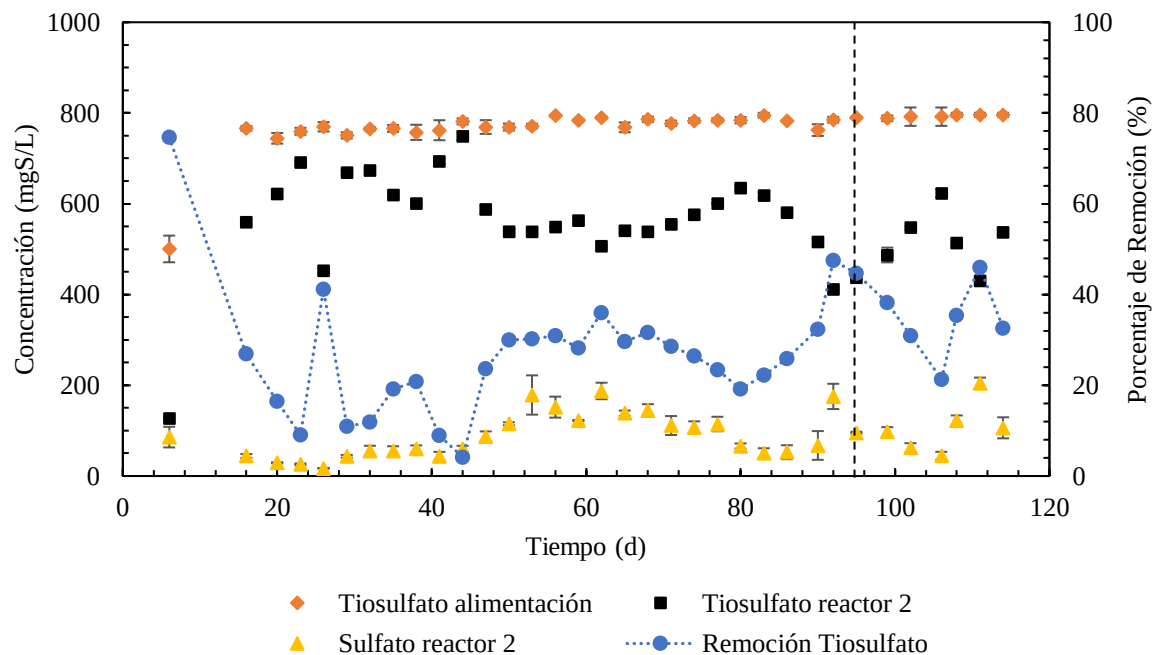


Figura 19. Concentración y porcentaje de remoción de los compuestos azufrados en el reactor UAF 2 durante el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el cambio de etapa).

En la Figura 20 se muestra el balance del azufre para el reactor 2, donde se aprecia que la mayor parte del tiosulfato se descargada en el efluente, una fracción se convierte a sulfato y solo una pequeña parte se transforma en otras especies de azufre, lo que indica un balance más completo en este caso.

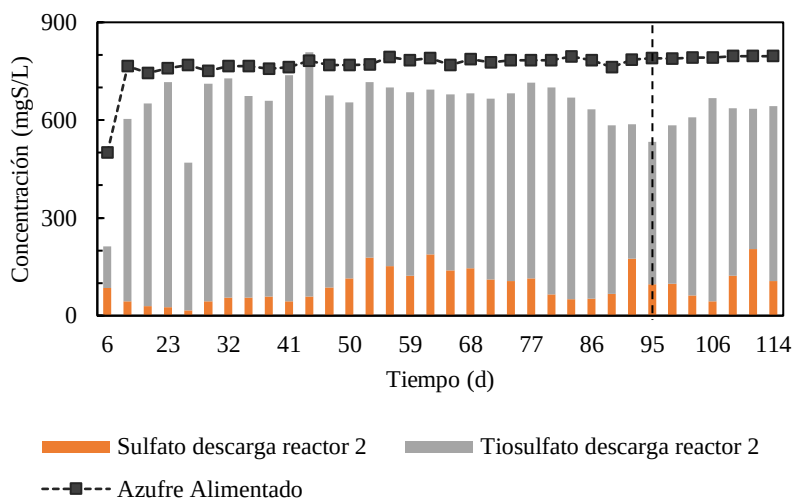


Figura 20. Balance de masa del azufre del reactor UAF 2 en el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el cambio de etapa).

La diferencia en los resultados entre ambos reactores posiblemente se debió a los problemas de fuga en el reactor 2, que impidieron una buena adaptabilidad de los microorganismos al lecho desde el inicio, lo que se comprueba con la mayor duración de la etapa de adherencia, además de que dichas fugas permitieron mayor entrada de oxígeno al reactor, lo que produjo esa leve baja en la eficiencia, en comparación con el reactor 1.

4.2.4. Materia orgánica

Se analizó la concentración de carbono orgánico total (COT) para verificar la remoción del acetato en los reactores, producto de la biomasa heterótrofa.

En la Figura 21 se muestra la concentración de entrada y salida de COT, además de los porcentajes de remoción de ambos reactores. Se observa que en ambos reactores la remoción de COT fue de 100% o valores muy cercanos durante toda la operación. El resultado es razonable, ya que la remoción de materia orgánica en el enriquecimiento heterótrofo también fue cercana al 100%, lo que significa que aún después del enriquecimiento e inoculación al reactor UAF, existen otros géneros de bacterias heterótrofas asimilando la materia orgánica, que se enriquecieron en conjunto con las bacterias heterótrofas convencionales, tal como lo proponen Guo *et al.* (2023).

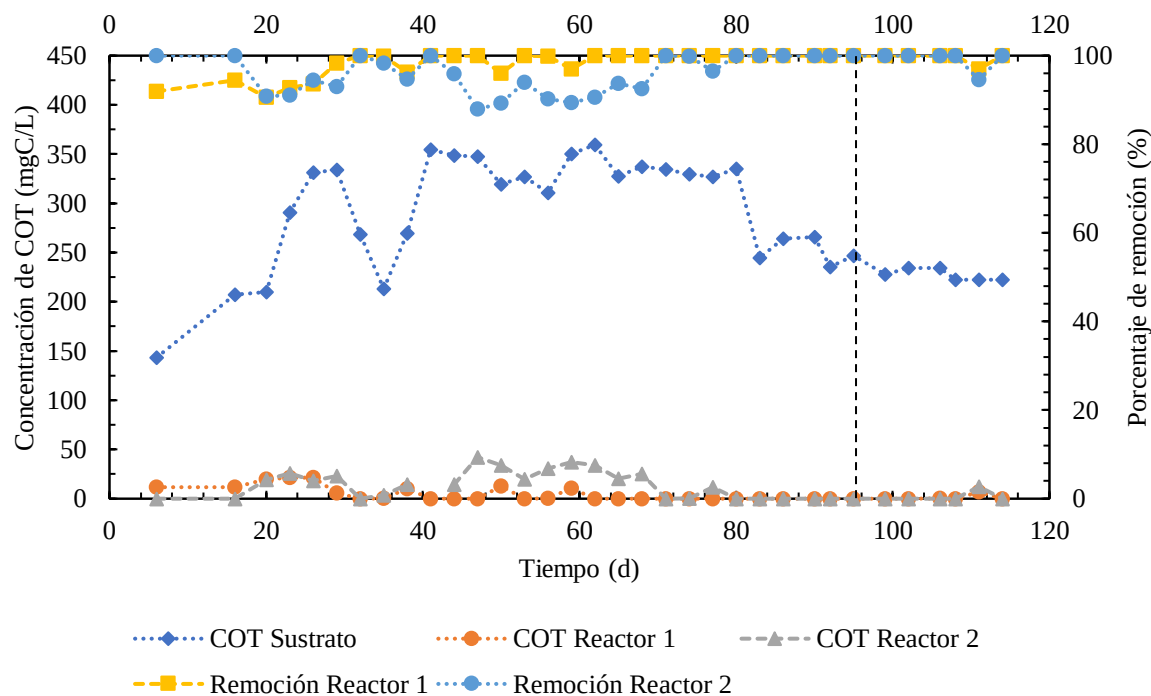


Figura 21. Concentración y porcentaje de remoción del Carbono Orgánico Total en los reactores UAF durante el tiempo de operación. (Línea punteada indicada el cambio de etapa).

4.2.5. Participación de las biomasas

Para medir el porcentaje de participación que tienen las biomasas en la desnitrificación mixotrófica, fue necesario saber la cantidad de nitrato que remueven por separado. Para ello bastaría con realizar los balances por elemento, sin embargo, esto no es factible, ya que existen otros procesos que interactúan con cada elemento e impiden obtener un balance completo.

Para el caso del nitrógeno, si bien se conoce la concentración de nitrato de entrada y salida, se desconoce la concentración de nitrógeno gaseoso producido por la desnitrificación, por lo que no se puede confirmar que todo el nitrato fue removido debido este proceso, además que este balance por sí solo no diferencia la biomasa autótrofa de la heterótrofa. De manera similar ocurre con los compuestos de azufre, en donde se observó que la remoción de tiosulfato fue alta en comparación con la producción de sulfato, implicando que hubo otros procesos de remoción de tiosulfato. Esto último aplica de la misma forma con la materia

orgánica en el balance de carbono. Se optó entonces por utilizar la ecuación (8) de la desnitrificación autótrofa, ya que se asume que el sulfato es el único compuesto que no se ve afectado por otros procesos.

Como se analizó la concentración de sulfato en el efluente y se asume que este se formó únicamente a partir de la desnitrificación autótrofa, por estequiometría se puede conocer la concentración de nitrato que fue utilizado por la biomasa autótrofa. Como además se conoce la remoción total de nitrato en ambos reactores, por diferencia se obtiene la concentración de nitrato utilizado por la biomasa heterótrofa. Si ambos valores se comparan con el total de nitrato removido, se obtiene el porcentaje de participación de cada biomasa en la desnitrificación.

En la Figura 22 se ve el porcentaje de participación en la desnitrificación de ambas biomasas en el reactor 1. Se observa que, en promedio para todo el tiempo de operación, el porcentaje de participación de la biomasa autótrofa fue de una 45,75% y de la biomasa heterótrofa 54,25%. Según el criterio indicado en metodología, estos valores indican que ambas biomasas compitieron por el nitrato de manera similar y reflejando un buen equilibrio en la desnitrificación.

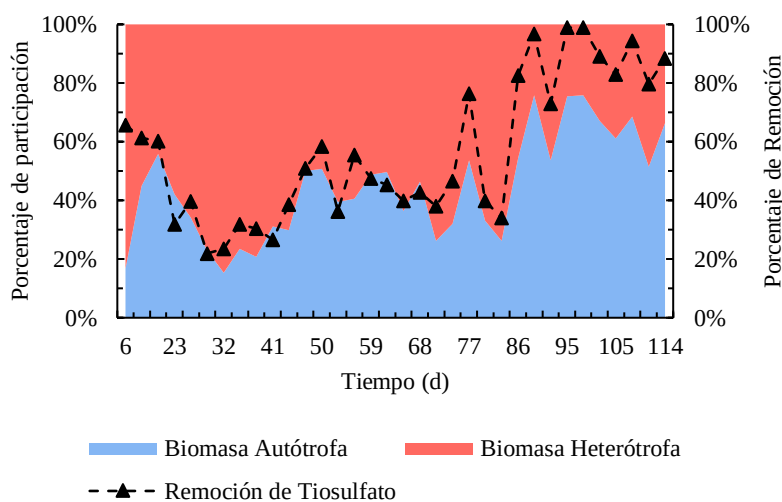


Figura 22. Porcentajes de participación en la desnitrificación de las biomasas del reactor UAF 1.

Además, si se analiza solo el último periodo desde el día 83 en adelante, el porcentaje de participación autótrofa aumentó a un 61,73%. Esto indica que en ese periodo hubo un aumento en la actividad desnitrificante autótrofa. Si bien, el porcentaje de participación de la biomasa heterótrofa en este caso bajó a un 38,27%, no implica que su actividad desnitrificante haya bajado, este hecho se confirma con el aumento en la remoción de nitrato en este mismo periodo como se mostró en la Figura 15.

Del mismo modo en la Figura 23 se observa que, en promedio, el porcentaje de participación de las biomasas en la desnitrificación del reactor 2 son de un 23,4% y 76,6%, para la biomasa autótrofa y heterótrofa respectivamente. En este caso es evidente que la mayor parte de la desnitrificación la realiza la biomasa heterótrofa, ya que además la producción de sulfato fue baja en comparación con la del reactor 1. Esta diferencia con el reactor 1 se pudo deber a la alta remoción de tiosulfato, por los otros mecanismos distintos a la desnitrificación ya mencionados, en los primeros ciclos del reactor 2, causando que la biomasa autótrofa redujera su actividad desde el inicio al estar menos estimulada por la baja concentración de este compuesto. Para lograr un mejor equilibrio, se recomienda aumentar la relación S/N durante la etapa de operación para potenciar la desnitrificación de la biomasa autótrofa.

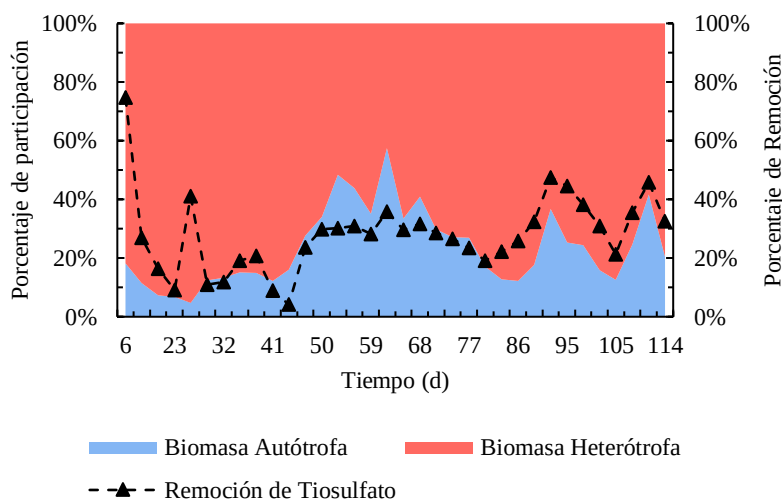


Figura 23. Porcentajes de participación en la desnitrificación de las biomasas del reactor UAF 2.

CAPITULO 5

5. Conclusiones

En esta investigación se realizó la puesta en marcha de dos reactores UAF para desnitrificación mixotrófica a partir de lodos autótrofos y heterótrofos previamente enriquecidos.

El enriquecimiento heterótrofo se operó por 111 días, con una relación final de C/N de 2,62 mol/mol, en donde se alcanzó un máximo de remoción de nitrato de 87,11% y un máximo de remoción de materia orgánica de 98,43%.

Los reactores UAF se operaron en formato *fed batch* por 95 días para la formación de biopelícula, en donde en ambos se logró percibir, de forma cualitativa, la adherencia microbiana en todas sus etapas al soporte de zeolita. El mantener el mismo TRH desde la operación *fed batch* a la operación continua fue crucial para evitar desestabilización en ambos reactores. La puesta en marcha concluyó al cabo de 114 días.

El reactor UAF 1 se puso en marcha de forma exitosa, en donde se alcanzó un máximo de remoción de nitrato de 99,78% a una VCN de 0,046 kgN/(m³·d), un máximo de remoción de tiosulfato de 98,99% y una remoción de acetato de 100%. Además, el porcentaje promedio de participación en la desnitrificación de la biomasa autótrofa y heterótrofa fue de 45,75% y 54,25%, respectivamente, indicando una buena competencia por parte de ambas biomasas, considerando que el rango aceptable es de 40-60%.

El reactor UAF 2 se puso en marcha de forma satisfactoria, en donde se alcanzó un máximo de remoción de nitrato de 95,38% a una VCN de 0,046 kgN/(m³·d), un máximo de remoción de tiosulfato de 47,54% y una remoción de acetato de 100%. En este caso, el porcentaje promedio de participación en la desnitrificación de la biomasa autótrofa y heterótrofa fue de 23,4% y 76,6%, respectivamente, lo cual no indicó un buen equilibrio entre las biomasas, según el criterio dado, lo que se concluye que la alimentación no fue adecuada en este caso y el aumento en la relación S/N es recomendable.

Referencias

- Agarwal, M., Singh, M., & Hussain, J. (2019). Assessment of groundwater quality with special emphasis on nitrate contamination in parts of Gautam Budh Nagar district, Uttar Pradesh, India. *Acta Geochim*, 38, 703-717.
- Albina, P., Durban, N., Bertron, A., Albrecht, A., Robinet, J.-C., & Erable, B. (2019). Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5163.
- An, S., Loden, B., & Nemati, M. (2012). Evaluation of heterotrophic nitrite removal by a sulphide and acetate oxidizing mixed culture originated from an oil reservoir. *Chemical Technology and Biotechnology*, 87(3), 410-417.
- APHA. (2023). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Vigésimo cuarta ed.). American Public Health Association.
- Ávila, K. (2023). Enriquecimiento de microorganismo desnitrificantes autótrofos a partir de un lodo proveniente de una laguna anaerobia que trata purines de cerdo. *Universidad Técnica Federico Santa María*.
- Bao, Y. (2023). Global Carbon Cycle of Earth System Model FIO-ESM with Surface Waves. *EGU General Assembly 2023*, 24-28.
- Bennett, S. P., Soriano-Laguna, M. J., Bradley, J. M., Svistunenko, D. A., Richardson, D. J., Gates, A. J., & Le Brun, N. E. (2019). NosL is a dedicated copper chaperone for assembly of the CuZ center of nitrous oxide reductase. *Chemical Science*, 10(19), 4985-4993.
- Beristain-Cardoso, R. G.-P. (2011). Sulfide and ammonium oxidation, acetate mineralization by denitrification in a multipurpose UASB reactor. *Bioresource Technology*, 102(3), 2549-2554.
- Cabrera, M. (2007). Mineralización y nitrificación: procesos claves en el ciclo del nitrógeno. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur*, 34, 1-9.
- Campos, J. L., Vázquez-Padín, J., Fernández, I., Fajardo, C., Seca, I., Mosquera-Corral, A., & Pampín, R. (2009). *Procesos avanzados de eliminación de nitrógeno: nitrificación parcial, Anammox, desnitrificación autótrofa*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Chung, J. A. (2014). Autotrophic denitrification of nitrate and nitrite using thiosulfate as an electron donor. *Water Research*, 58, 169-178.

- Claros, J. (2012). Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para el tratamiento biológico de corrientes de agua residual con alta carga de nitrógeno amoniacal. *Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València*.
- Creutzig, F., Goetzke, F., Ramakrishnan, A., Andrijevic, M., & Perkins, P. (2023). Designing a virtuous cycle: Quality of governance, effective climate change mitigation, and just outcomes support each other. *Global Environmental Change*, 82, 102726.
- Cron, B., Henri, P., Chan, C. S., Macalady, J. L., & Cosmidis, J. (2019). Elemental Sulfur Formation by Sulfuricurvum kujiense Is Mediated by Extracellular Organic Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2710.
- Cron, B., Henri, P., Chan, C. S., Macalady, J. L., & Cosmidis, J. (2019). Elemental Sulfur Formation by Sulfuricurvum kujiense Is Mediated by Extracellular Organic Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2710.
- Di Capua, F., Pirozzi, F., Lens, P. N., & Esposito, G. (2019). Electron donors for autotrophic denitrification. *Chemical Engineering Journal*, 362, 922-937.
- Du, C.-F., Yang, L., Tang, K., Fang, W., Zhao, X., Liang, Q., . . . Yan, Q. (2021). Ni nanoparticles/V4C3Tx MXene heterostructures for electrocatalytic nitrogen fixation. *Materials Chemistry Frontiers*(5), 2338-2346.
- Espinosa, J., Revah, S., & Le Borgne, S. (2010). Mensaje Bioquímico. *Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimioautótrofas, relevancia ambiental y biotecnología*, 34.
- Fajardo, M. d. (2011). Autotrophic denitrification for treatment of wastewater with high concentration of sulphur and nitrogen compounds. *Universidade de Santiago de Compostela*.
- Fike, D. A., Bradley, A. S., & Rose, C. V. (2015). Rethinking the Ancient Sulfur Cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 43, 593-622.
- Flores-Morales, G., Díaz, M., Arancibia-Avila, P., Muñoz-Carrasco, M., Jara-Zapata, P., Toledo-Montiel, F., & Vega-Román, E. (2021). Removal of nutrients from Organic Liquid Agricultural Waste using filamentous algae. *Brazilian Journal of Biology*, 81(3), 544-550.
- Fortt, F. A. (2014). Puesta en marcha de un reactor de lecho fijo desnitrificante autótrofo, para la remoción de nitrógeno y azufre a partir de nitrito. *Memoria para optar al título de ingeniero*.
- Garrido, M. (2014). Obtención de biomasa enriquecida en bacterias desnitrificantes autótrofas y formación de biopelícula sobre zeolita natural chilena como soporte. *Universidad Técnica Federico Santa María*.

- Ge, X., Vaccaro, B. J., Thorgersen, M. P., Poole II, F. L., Majumder, E. L., Zane, G. M., . . . Arkin, A. (2018). Iron- and aluminium-induced depletion of molybdenum in acidic environments impedes the nitrogen cycle. *Environmental Microbiology*, 21(1), 152-163.
- George, N. (2021). Role of Denitrification in Preventing. *Journal of Aquatic Pollution and Toxicology*, 5(3), 15.
- Giuras, A. (2015). Puesta en marcha de un reactor desnitrificante UASB híbrido para la eliminación simultánea de materia orgánica, nitrógeno y azufre. *Universidad Técnica Federico Santa María*.
- González, E. N. (2019). Puesta en marcha de un reactor anaerobio de lecho fijo con flujo ascendente para desnitrificación autótrofa de aguas residuales provenientes de un biodigestor de purines de cerdo. *Universidad Técnica Federico Santa María*, 76-77.
- Guerrero, L., Aguirre, J., Barahona, A., Huiliñir, C., & Montalvo, S. (2014). Eliminación de nitrato, azufre y materia orgánica compleja mediante desnitrificación simultánea autótrofa y heterótrofa. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (10), 67-75.
- Guo, X., Lai, C.-Y., Hartmann, E. M., & Zhao, H.-P. (2023). Heterotrophic denitrification: An overlooked factor that contributes to nitrogen removal in n-DAMO mixed culture. *Environmental Research*, 16(4), 114802.
- Harris, D. C. (2016). *Análisis químico cuantitativo* (Tercera ed.). Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.
- Hartley, A. J., & Tandon, A. (2022). The Impacts of Climate Change. *Frontiers for Young Minds*, 10, 716479.
- Hasan, M. N., Altaf, M. M., Khan, N. A., Khan, A. H., Khan, A., Ahmed, S., . . . Islam, S. (2021). Recent technologies for nutrient removal and recovery from wastewaters: A review. *Chemosphere*, 277, 130328.
- Hassan, S., Zwain, H., & Dahlan, I. (2013). Development of anaerobic reactor for industrial wastewater treatment: an overview, present stage and future prospects. *Journal of Advanced Scientific Research*, 4(01), 7-12.
- He, D., Adachi, K., Hashizume, D., & Nakamura, R. (2023). Nonenzymatic anaerobic ammonium oxidation through a hydrazine intermediate. *ChemRxiv*.
- Hernández, N. (2014). Diseño y puesta en marcha de un filtro anaerobio para la desnitrificación autótrofa a partir de nitrato. *Universidad Técnica Federico Santa María*.

- Houghton, J. L., Foustoukos, D. I., Flynn, T. M., Vetriani, C., Bradley, A. S., & Fike, D. A. (2016). Thiosulfate oxidation by *Thiomicrospira thermophila*: metabolic flexibility in response to ambient geochemistry. *Environmental Microbiology*, 18(9), 3057-3072.
- Huang, K., Li, Q., Sun, H., Zhang, X.-X., Ren, H., & Ye, L. (2021). Metagenomic analysis revealed the sulfur- and iron- oxidation capabilities of heterotrophic denitrifying sludge. *Ecotoxicology*, 30, 1399-1407.
- IPCC. (2018). Global warming of 1.5° C: An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5° C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change. *Intergovernmental Panel on Climate Change*.
- Jamse, S. N., & Vijayanandan, A. (2023). Recent advances in simultaneous nitrification and denitrification for nitrogen and micropollutant removal: a review. *Springer Nature*, 34, 103 - 123.
- Janssen, A. J., van Leerdam, R., van den Bosch, P., van Zessen, E., van Heeringen, G., & Buisman, C. (2007). Development of a family of large-scale biotechnological processes to desulphurise industrial gasses. *Proceedings of the II International Congress in Biotechniques for Air Pollution Control*, 167-183.
- Jeria, D. (2016). Puesta en marcha de un reactor EGSB para la desnitrificación autótrofa-heterótrofa simultánea, eliminación de nitrógeno, azufre y materia orgánica. *Universidad Técnica Federico Santa María*.
- Jin, R., Yang, G., Yu, J., & Zheng, P. (2012). The inhibition of the Anammox process: a review. *Chemical Engineering Journal*, 197, 67-79.
- Jing, C., Ping, Z., & Mahmood, Q. (2009). Simultaneous sulfide and nitrate removal in anaerobic reactor under shock loading. *Bioresource Technology*, 100(12), 3010-3014.
- Kant, K. (2020). Evaluating the Impact of Climate Change and Growing Problem of Global Warming: An Empirical Investigation. *Turkish Online Journal of Qualitative Inquiry*, 11(2), 682-687.
- Kumar, M., Sharma, M. K., & Malik, D. S. (2023). An appraisal to hydrochemical characterization, source identification and potential health risks of sulphate and nitrate in groundwater of Bemetara district, Central India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(1046).
- Larios, R. G., & Castro, J. (2021). Pérdidas de nitrógeno por volatilización a partir de dos fuentes nitrogenadas y dos métodos de aplicación. *Siembra*, 8(2).
- Li, Y., & Yu, J. (2021). Emerging applications of zeolites in catalysis, separation and host-guest assembly. *Nature Review Materials*, 6, 1156-1174.

- Li, Y., Cai, Y., Chen, T., & Bao, X. (2022). Zeolites: A series of promising biomaterials in bone tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 1066552.
- Lillo, O. (2017). Puesta en marcha y operación de un reactor EGSB mediante desnitrificación autótrofa-heterótrofa simultánea para la eliminación de nitrógeno, azufre y materia orgánica. *Universidad Técnica Federico Santa María*.
- Liu, L., Xu, Y., Pan, H., Yu, C., Liu, Q., Wei, C., . . . Pan, J. (2023). Performance, comparison and utilization of reduced sulfur (−2) compounds (S^{2−}, FeS and SCN[−]) in autotrophic denitrification process by thiosulfate-driven autotrophic denitrifier. *Environmental Research*, 231(2), 116219.
- Liu, Z., & Zhang, L. (2023). The Paleoproterozoic and Neoproterozoic Carbon Cycle Promoted the Evolution of a Habitable Earth. *Acta Geologica Sinica*, 97(1), 316-326.
- Lu, J., Hong, Y., Wei, Y., Gu, J.-D., Wu, J., Wang, Y., . . . Lin, J.-G. (2021). Nitrification mainly driven by ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in an anammox-inoculated wastewater treatment system. *AMB Express*, 11(158).
- Lv, Y.-T., Zhang, X., Zhu, C., Lin, L., Sun, T., Wang, X., & Wang, L. (2022). Micro-analysis of nitrous oxide accumulation in denitrification under acidic conditions: The role of pH and free nitrous acid. *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102767.
- Ma, J., Liu, H., Dang, H., Wu, X., Yan, Y., Zeng, T., . . . Chen, Y. (2023). Realization of nitrite accumulation in an autotrophic-heterotrophic denitrification system using different S/N/C ratios coupled with ANAMMOX to achieve nitrogen removal. *Chemical Technology and Biotechnology*, 98(1), 269-281.
- Maldona, Y. (2020, Noviembre 2). Retrieved from Ciclo del carbono: Etapas, importancia y características: <https://geologiaweb.com/geologia-general/ciclo-carbono/>
- McCormick, M. (2022). An Artificial Neural Network for Simulation of an Upflow Anaerobic Filter Wastewater Treatment Process. *Sustainability*, 14(13), 7959.
- Metcalf & Eddy. (2014). *Wastewater Engineering Treatment and Resource Recovery* (5ta ed.). McGraw-Hill Education.
- Meza, A. (2009). Control de calidad de las aguas en Chile. *Tierra Adentro*, 83, 42-45.
- Montalvo, S., & Guerrero, L. (2022). *Tratamiento Anaerobio de Residuos: Producción de biogás*. Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María.
- Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., & de la Rubia, M. A. (2012). Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. *Applied Clay Science*, 58, 125-133.

- Moraes, B. S., Souza, T. S., & Foresti, E. (2012). Effect of sulfide concentration on autotrophic denitrification from nitrate and nitrite in vertical fixed-bed reactors. *Process Biochemistry*, 47(9), 1395-1401.
- Moraga, S. (2016). Puesta en Marcha de un reactor anaerobio de lecho fijo con flujo ascendente para remover azufre, nitrato, y materia orgánica a través de la desnitrificación simultánea. *Universidad Técnica Federico Santa María*.
- Muñoz, C. (2015). Operación de un reactor anaerobio de lecho fijo desnitrificante autótrofo para la remoción simultánea de azufre y nitrógeno a partir de nitrato. *Universidad Técnica Federico Santa María*, 49.
- Oliveira, A. K., Paulo, J. B., Sousa, E. M., & Lima, K. L. (2014). Removal of sulfides and oil from produced water. *Brazilian journal of petroleum and gas*, 8(3), 81-88.
- Pajares, S., & Bohannan, B. J. (2016). Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1045.
- Peirano, C., Guerrero, L., Barahona, A., M. S., C., H., Da Silva, C., & Borja, R. (2020). Assessment of simultaneous autotrophic–heterotrophic denitrification with high removal of nitrogen, sulfur and carbon: optimization through response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(3), 361-638.
- Peng, Y., Guo, J., Horn, H., Yang, X., & Wang, S. (2012). Achieving nitrite accumulation in a continuous system treating low-strength domestic wastewater: switchover from batch start-up to continuous operation with process control. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94, 517-526.
- Reddy, K. R., Kandou, V., Havrelock, R., El-Khattabi, A. R., Cordova, T., Wilson, M. D., . . . Trujillo, C. (2023). Reuse of Treated Wastewater: Drivers, Regulations, Technologies, Case Studies, and Greater Chicago Area Experiences. *Sustainability*, 15(9), 7495.
- Riffat, R. (2013). *Fundamentals of Wastewater treatment and engineering*. New York: CRC Press, LCC. Taylor & Francis Group.
- Sachs, J., Schmidt-Traub, G., Mazzucato, M., Messner, D., Nakicenovic, N., & Rockström, J. (2019). Six transformations to achieve the sustainable development goals . *Nature sustainability*, 2(9), 805-814.
- Santa, J., Mores, P., Scenna, N., Mussati, S., Gernaey, K., & Mussati, M. (2017). Estudio comparativo de sistemas SBR para eliminación de C, N y P. convencional versus nitrificación externa. *VI Simposio Argentino de Informática Industrial (SII)-JAIIO* 46.

- Sarrazin, F., Nguyen, T., Musolff, A., Ebeling, P., Batool, M., Sarker, P., . . . Kumar, R. (2023). Long-term dynamics of nitrogen export from European catchments. *EGU General Assembly 2023*, (pp. egu23-4144). Vienna.
- Simonton, D. S., & King, S. (2013). Hydrogen Sulfide Formation and Potential Health Consequences in Coal Mining Regions. *Water Quality, Exposure and Health*, 5, 85-92.
- Singh, S. A. (2022). Nitrates in the environment: A critical review of their distribution, sensing techniques, ecological effects and remediation. *Chemosphere*, 287, 131996.
- Sun, S., Liu, J., Zhang, M., & He, S. (2020). Thiosulfate-driven autotrophic and mixotrophic denitrification processes for secondary effluent treatment: Reducing sulfate production and nitrous oxide emission. *Bioresource Technology*, 300, 122651.
- Tang, K., An, S., & Nemati, M. (2010). Evaluation of autotrophic and heterotrophic processes in biofilm reactors used for removal of sulphide, nitrate and COD. *Bioresource Technology*, 101(21), 8109-8118.
- Torrentó, C. C. (2010). Denitrification of groundwater with pyrite and Thiobacillus denitrificans. *Chemical Geology*, 278(1-2), 80-91.
- Wang, Q., Zhang, Q., Han, Y., Zhang, D., Zhang, C.-C., & Hu, C. (2022). Carbon cycle in the microbial ecosystems of biological soil crusts. *Soil Biology and Biochemistry*, 171, 108729.
- Wang, S., Jiang, L., Hu, Q., Liu, X., Yang, S., & Shao, Z. (2020). Elemental sulfur reduction by a deep-sea hydrothermal vent Campylobacterium Sulfurimonas sp. NW10. *Environmental Microbiology*, 23(2), 965-979.
- Weigelhofer, G. H.-K. (2018). Phosphorus and Nitrogen Dynamics in Riverine Systems: Human Impacts and Management Options. In S. Schmutz, & J. Sendzimir (Eds.), *Riverine Ecosystem Management* (Vol. 8). Springer, Cham.
- Whaley-Martin, K., Marshall, S., Colenbrander Nelson, T. E., Twible, L., Jarolimek, C. V., King, J. J., . . . Warren, L. A. (2020). A Mass-Balance Tool for Monitoring Potential Dissolved Sulfur Oxidation Risks in Mining Impacted Waters. *Mine Water and the Environment*, 39, 291-307.
- Xu, G., Peng, J., Feng, C., Fang, F., Chen, S., Xu, Y., & Wang, X. (2015). Evaluation of simultaneous autotrophic and heterotrophic denitrification processes and bacterial community structure analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 6527-6536.
- Yang, Q., Peng, Y., Liu, X., Zeng, W., Mino, T., & Satoh, H. (2007). Nitrogen Removal via Nitrite from Municipal Wastewater at Low Temperatures using Real-Time Control

- to Optimize Nitrifying Communities. *Environmental Science & Technology*, 41(23), 8159 - 8164.
- Yu, C., Qiao, S., & Zhou, J. (2023). Sulfide-driven nitrous oxide recovery during the mixotrophic denitrification process. *Journal of Environmental Sciences*, 125, 443-452.
- Yu, T., Chen, Z., Liu, Z., Xu, J., & Wang, Y. (2022). Review of Hydrogen Sulfide Removal from Various Industrial Gases by Zeolites. *Separations*, 9(9), 229.
- Zhang, D., Cheng, L., Zhang, S., & Zheng, J. (2023a). Denitrification performance and microbial community analysis of sulfur autotrophic denitrification filter for low-temperature treatment of landfill leachate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(2), 109314.
- Zhang, L., Su, J., Ali, A., Huang, T., Chen, C., & Yang, W. (2023b). A biofilm reactor based on slow-release carbon source effectively improved the continuous denitrification capacity of slightly polluted surface water at low carbon to nitrogen ratio. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(2), 109552.
- Zhou, L., Lai, Y., Shao, Z., Jian, Y., & Zhuang, W.-Q. (2023a). Keystone bacteria in a thiosulfate-driven autotrophic denitrification microbial community. *Chemical Engineering Journal*, 470, 144321.
- Zhou, X., Yuan, Y., Huang, Z., Lin, Y., Li, Z., & Dongkun. (2023b). Advances in research of Anammox process in MBR. *E3S Web of Conferences*, 385(02032).
- Zita, A. (2022). Ciclo del carbono. *Todamateria*(1). Retrieved from <https://www.todamateria.com/ciclo-del-carbono/>

Anexos

A. Materiales complementarios.

Tabla 11. Características de la zeolita del lecho del reactor UAF.

Propiedad	Magnitud
Mineralogía	Clinoptilolita-Mordenita.
Granulometría	3,0 – 5,0 mm
Composición química	SiO ₂ :64,19 CaO :3,42
	TiO ₂ :0,51 Na ₂ O :0,75
	Al ₂ O ₃ :11,65 K ₂ O :1,60
	Fe ₂ O ₃ :2,53 P ₂ O ₅ :0,03
	MnO :0,03 PxC :14,64
	MgO :0,66
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	86,82 a 112,88 cmol/kg
Superficie específica (método BET)	446 a 480 m ² /g
Estabilidad química (pH)	8,9

Tabla 12. Listado de equipos complementarios utilizados para el montaje del reactor UAF.

Listado de equipos	Descripción	Cantidad
Bomba peristáltica	LongerPump BT300-2J con 2 cabezales	2
Bomba peristáltica	LongerPump BT300-2J con 2 cabezales	2
Mangueras	De goma/silicona, 5 mm interior	2 m
Controlador de temperatura	Barnant Company	1
Calefactor	Somela 2000W	1
Temporizador	-	1
Estanque	de plástico, 6L	2
Cámara aislada	de polietileno expandido	1
Soporte Universal	-	2
Nuez y aro	-	2
Pinza de bureta	-	2

B. Determinación de nitrato. Método espectrofotométrico ultravioleta (APHA, 2023).

Principio

Este procedimiento se fundamenta en la utilización de la técnica con luz ultravioleta, donde se evalúa la absorbancia del nitrato a 200 nm, siendo apropiada para aguas con una baja presencia de materia orgánica. La curva de calibración confirma la Ley Lambert-Beer hasta 1 mg N/L. La medición a 220 nm facilita la rápida determinación del nitrato, ya que la materia orgánica no absorbe en esa magnitud y el nitrato no lo hace a 275 nm, permitiendo así una segunda medición para corregir el valor de nitrato. La corrección puede variar según la naturaleza de los distintos tipos de aguas. Se añade 1 mL de ácido clorhídrico 1 N para eliminar posibles interferencias. Se sugiere realizar el análisis inmediato de las muestras o, en su defecto, congelarlas lo más pronto posible.

Equipos y materiales

- Espectrofotómetro ultravioleta UV-VIS para trabajar 200 a 300 nm.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Solución patrón NO_3^- (Merck art.1.19811.0500)
- Material de uso común en laboratorio.

Reactivos

- Agua sin nitratos: Emplear agua bidestilada o destilada y desionizada de la máxima pureza para la preparación de todas las soluciones y diluciones.
- Solución intermedia de nitrato: Diluya 100 mL de la solución de nitrato principal a 1000 mL con agua; 1,00 mL equivalente a 10,0 μg de N-NO_3^- . Conserve también con 2 mL de CHCl_3/L . Esta solución permanece estable durante 6 meses. La solución patrón se puede preparar sometiendo nitrato de potasio (KNO_3) a un proceso de secado en un horno a 105°C durante 24 horas. Luego, se disuelven 0,7218 g en agua

y se diluyen a 1000 mL; 1,00 mL equivale a 100 μg de N-NO_3^- . Conservar añadiendo 2 mL de CHCl_3/L . Esta solución se mantiene estable durante al menos 6 meses.

- Solución de ácido clorhídrico, HCl 1N. Este se prepara diluyendo 83 mL de HCl concentrado a 1000 mL con agua. Conservar en botella ámbar y estandarizar con carbonato de calcio, previamente secado a 206-270°C por una 1 h.

Preparación de la curva estándar:

Se preparan estándares de calibración de N-NO_3^- en el rango de 0 a 7 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ mediante la dilución a 50 mL de los siguientes volúmenes de la solución intermedia de nitrato: 0; 1,00; 2,00; 4,00; 7,00... 35,0 mL. Se trata los estándares de NO_3^- de la misma manera que las muestras.

Procedimiento

- a. Tratamiento de la muestra: A 50 mL de muestra clara, filtrada si es necesario, se añade 1 mL de solución de HCl y mezclar bien.
- b. Medición espectrofotométrica: Se mide la absorbancia o transmitancia frente a agua bidestilada ajustada a absorbancia cero o transmitancia 100%. Utilizar una longitud de onda de 220 nm para obtener la lectura de NO_3^- y una longitud de onda de 275 nm para determinar la interferencia debido a la materia orgánica disuelta.

Cálculo

Para las muestras y estándares, reste dos veces la lectura de absorbancia a 275 nm de la lectura a 220 nm para obtener la absorbancia debido a NO_3^- . Construya una curva estándar graficando la absorbancia debido a NO_3^- frente a la concentración de N-NO_3^- del estándar. Utilice las absorbancias corregidas de las muestras para obtener las concentraciones de las muestras directamente a partir de la curva estándar. NOTA: Si el valor de corrección es más del 10% de la lectura a 220 nm, no utilice este método.

C. Determinación de nitrito. Método Colorimétrico (APHA, 2023).

Principio:

La determinación de nitrito (NO_2^-) se realiza mediante la formación de un tinte azopúrpura rojizo producido a un pH de 2,0 a 2,5 mediante el acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con N-(1-naftil)-etilendiamina dihidroclorada (diclorhidrato de NED). El rango aplicable para mediciones espectrofotométricas es de 10 a 1000 μg de $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$. El sistema de color sigue la ley de Beer hasta 180 μg de N/L con una trayectoria de luz de 1 cm a 543 nm. Para concentraciones más altas de NO_2^- puede determinarse diluyendo la muestra.

Tratamiento de la muestra

Se deben eliminar los sólidos suspendidos mediante filtración. Nunca ha de usarse conservantes ácidos para muestras que se analizarán para NO_2^- . Se debe realizar la determinación rápidamente en muestras frescas para evitar la conversión bacteriana de NO_2^- a NO_3^- o NH_3 . Para la conservación a corto plazo durante 1 a 2 días, congelar la muestra a -20°C o almacenarla a 4°C .

Equipos y materiales

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

Reactivos y soluciones

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

- Patrón Nitrito (Merck art. 106549)

Procedimiento

- a. Preparación de reactivo de color: A 800 mL de agua, agregar 100 mL de ácido fosfórico al 85% y 10 g de sulfanilamida. Después de disolver completamente la sulfanilamida, añadir 1 g de N-(1-naftil)-etilendiamina dihidroclorada. Mezclar para disolver y luego diluir a 1 L con agua. La solución es estable durante aproximadamente un mes cuando se almacena en una botella oscura en el refrigerador.
- b. Solución stock de nitrito: Diluir 0,1 mL de la solución patrón de NO_2^- (1000 mg/L) a 500 mL de agua (esta solución tiene una concentración de 200 $\mu\text{g/L}$). Preparar en el momento. En caso de no contar con solución patrón, se deben disolver 1,232 gramos de NaNO_2 (1 mL = 250 μg), previamente secado a 105°C por una hora, al menos, y enfriar en desecador (20 minutos), luego revalorar con permanganato de potasio. Aforar a 1000 mL.
- c. Tratamiento de la muestra: Si la muestra contiene sólidos suspendidos, filtrar a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm . Si el pH de la muestra no está entre 5 y 9, ajustar a ese rango con HCl 1N o NH_4OH según sea necesario. A 50,0 mL de muestra, o a una porción diluida a 50,0 mL, añadir 2 mL de reactivo de color y mezclar. Entre 10 minutos y 2 horas después de agregar el reactivo de color a las muestras y estándares, mida la absorbancia a 543 nm.

Cálculo

Construir una curva estándar graficando la absorbancia de los estándares frente a la concentración de NO_2^- . Calcular la concentración de la muestra directamente a partir de la curva.

D. Determinación de Amonio. Método de fenol (APHA, 2023).

Principio

Se forma un compuesto intensamente azul, indofenol, mediante la reacción de amoníaco, hipoclorito y fenol catalizado por nitroprusiato de sodio. La complejación de magnesio y calcio con citrato elimina la interferencia producida por la precipitación de estos iones a un pH elevado. No hay interferencia de otras formas trivalentes de nitrógeno. Elimine la turbidez interferente por destilación o filtración. Si hay presencia de sulfuro de hidrógeno, elimínelo acidificando las muestras a un pH de 3 con HCl diluido y aireando vigorosamente hasta que no se pueda detectar más el olor a sulfuro.

Equipo y Materiales

- Espectrofotómetro para uso a 640 nm con una longitud de trayectoria de luz de 1 cm o más.
- Hipoclorito de sodio, solución comercial, aproximadamente 5 (Esta solución se descompone lentamente una vez que se rompe el sello del tapón de la botella. Reemplazar aproximadamente cada 2 meses).
- Solución patrón NH_4 (1000 mg/L).

Reactivos y soluciones

- Solución de Fenol: Mezclar 11,1 mL de fenol licuado ($\geq 89\%$) con alcohol etílico al 95% v/v hasta alcanzar un volumen final de 100 mL. Preparar semanalmente. Se debe usar guantes y protección ocular al manipular fenol; utilizar una buena ventilación para minimizar la exposición del personal a esta sustancia volátil tóxica.
- Nitroprusiato de sodio, 0.5% p/v: Disolver 0,5 g de nitroprusiato de sodio en 100 mL de agua desionizada. Almacenar en una botella ámbar por hasta 1 mes.
- Citrato alcalino: Disolver 200 g de citrato trisódico y 10 g de hidróxido de sodio en agua desionizada. Diluir a 1000 mL.

- Solución oxidante: Mezclar 100 mL de solución de citrato alcalino con 25 mL de hipoclorito de sodio. Preparar diariamente.

Procedimiento

- a. A una muestra, filtrada de ser necesario, de 25 mL en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, añadir, mezclando bien después de cada adición, 1 mL de solución de fenol, 1 mL de solución de nitroprusiato de sodio y 2.5 mL de solución oxidante.
- b. Cubrir las muestras con film de plástico o película de parafina.
- c. Permitir que el color se desarrolle a temperatura ambiente (22 a 27°C) en luz tenue durante al menos 1 hora. El color es estable durante 24 horas.
- d. Medir la absorbancia a 640 nm.

Para la curva de calibración, preparar un blanco y al menos otros dos estándares diluyendo la solución estándar de amoníaco en el rango de concentración de la muestra. Tratar los estándares de la misma manera que las muestras.

Cálculo

Calcule la concentración de la muestra comparando la absorbancia de la muestra con la curva estándar.

E. Determinación de sulfatos. Método turbidimétrico (APHA, 2023).

Principio

El ion sulfato (SO_4^{2-}) se precipita en un medio de ácido acético con cloruro de bario (BaCl_2) para formar cristales de sulfato de bario (BaSO_4) de tamaño uniforme. La absorbancia de la suspensión de BaSO_4 puede ser medida mediante espectrofotometría y la concentración de SO_4^{2-} se determina mediante la comparación de la lectura con una curva estándar.

La presencia de color o materia suspendida en grandes cantidades puede interferir. Se puede eliminar algo de materia suspendida mediante filtración. Concentraciones de sílice superiores a 500 mg/L pueden interferir, y en aguas que contienen grandes cantidades de material orgánico, puede ser difícil precipitar BaSO₄ satisfactoriamente. En aguas potables, no hay iones, aparte de SO₄²⁻, que formarán compuestos insolubles con bario en condiciones fuertemente ácidas. Realice la determinación a temperatura ambiente; la variación en un rango de 10°C no causará un error apreciable.

Equipo y Materiales

- Material común de vidrio de uso en laboratorio, ejemplos: varillas de vidrio, vasos precipitados, volumétricos.
- Espectrofotómetro, para usar a 420 nm, con una trayectoria de luz de 1 cm.

Reactivos

- Solución acondicionadora: se utiliza como método de suspensión para los iones sulfato al ser leídos en el espectrofotómetro. Es de vital importancia, ya que al no usarla precipitaría todo el analito en el momento de la adición de cloruro de bario. La preparación debe ser en orden, agregando a un vaso precipitado de un litro y mezclando después de cada adición: 300 mL de agua destilada, 30 mL de ácido clorhídrico concentrado, 100 mL de alcohol isopropílico, 75 gramos de cloruro de sodio. Finalmente, añadir 50 mL de glicerol medidos en probeta, mezclar todo y llevar a volumen final de 500 mL con agua destilada. Esta solución es estable durante seis meses en frasco ámbar a temperatura ambiente.
- Cristales de cloruro de bario, BaCl₂, de 20 a 30 *mesh*. En la estandarización, se produce turbidez uniforme con este rango de mallas y el amortiguador adecuado.
- Solución estándar de sulfato: Preparar una solución estándar de sulfato como se describe a continuación; 1,00 mL = 100 µg de SO₄²⁻. Disolver 0,1479 g de Na₂SO₄ anhidro en agua destilada y diluya a 1000 mL.

Procedimiento

- a. Formación de turbidez de sulfato de bario: Medir 100 mL de muestra, o una porción adecuada hasta completar 100 mL, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Añadir 20 mL de solución amortiguadora y mezclar en el aparato de agitación. Mientras se agita, agregar una cucharada de cristales de BaCl_2 y comenzar a cronometrar inmediatamente. Agitar durante 60 ± 2 s a velocidad constante.
- b. Medición de la turbidez de sulfato de bario: Después de que se ha terminado el período de agitación, verter la solución en la celda de absorción del fotómetro y medir la turbidez a los 5 ± 0.5 minutos.
- c. Preparación de la curva de calibración: Estimar la concentración de SO_4^{2-} en la muestra comparando la lectura de turbidez con una curva de calibración preparada llevando estándares de SO_4^{2-} a través de todo el procedimiento. Espaciar los estándares en incrementos de 5 mg/L en el rango de 0 a 40 mg/L de SO_4^{2-} . Por encima de 40 mg/L, la precisión disminuye y las suspensiones de BaSO_4 pierden estabilidad. Verificar la confiabilidad de la curva de calibración ejecutando un estándar con cada tres o cuatro muestras.
- d. Corrección por color y turbidez de la muestra: Corregir el color y la turbidez de la muestra ejecutando blancos a los que no se agregó BaCl_2 .

Cálculo

La concentración puede ser leída directamente en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración, pero es necesario considerar la dilución.

F. Tiosulfato (Harris, 2016).

Principios

Se determina el tiosulfato presente en las muestras mediante Yodometría, un método volumétrico indirecto en el cual los oxidantes reaccionan con un exceso de iones yoduro, y el yodo liberado se determina con un reductor estándar, como el tiosulfato de sodio. La conservación y almacenamiento deben realizarse en envases de vidrio o polipropileno. Su

almacenamiento en refrigerador no debe extenderse por más de dos días (4°C); de lo contrario, congelar no más allá de siete días.

Equipo y Materiales

- Matraces Erlenmeyer de 50 mL
- Bureta de 30 mL para el Tiosulfato
- Bureta de 30 mL para Yodo
- Pipeta aforada de 10 mL y 20 mL
- Gotero
- Matraz de aforo de 1 L
- Botella ámbar de 1 L
- Matraces de aforo de 100 mL

Reactivos y soluciones

- Solución de tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,1 N.
- Yoduro de potasio (KI) al 10%.
- Cloroformo (CHCl_3).
- Solución de almidón al 1%.
- Solución de yodo 0,1 N.
- Yodato de Potasio (KIO_3) 0,1 N, patrón primario.
- Yoduro de Potasio libre de Yodato (KI).

Procedimiento

- La muestra se toma en envases de polipropileno y se analiza en el transcurso de unos minutos; no se almacena. De la muestra, tomada en triplicado, se extraen 10 mL, previamente filtrados, y se transfieren a un matraz Erlenmeyer. Luego, se titula con una solución de yodo 0,1000 N aproximadamente desde una bureta hasta que la muestra cambie de incolora a amarillo pálido. Posteriormente, se valora con tiosulfato de sodio, también desde una bureta 0,1000 N aproximadamente, hasta que la muestra

adquiera un color incoloro. Se añaden unas gotas de almidón para verificar la presencia de trazas de yodo; en caso afirmativo, se observará un color verdoso, y se debe continuar titulando hasta que la muestra quede incolora.

- Preparación de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): Se pesan 25.0 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en una balanza granataria y se transfieren a una botella ámbar de un litro. Utilizando agua recién hervida y previamente enfriada, se agregan diez gotas de cloroformo y se lleva a volumen, homogeneizando la solución. Se deja reposar durante un par de días para su posterior estandarización.
- Estandarización de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) con Yodato de Potasio (KIO_3): Se toma una alícuota de 10 mL de yodato de potasio (patrón primario) y se transfiere cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer. Se agregan 10 mL de ácido clorhídrico 1 N o 5 mL de ácido sulfúrico 2 N y 10 mL de yoduro de potasio al 10%. La valoración con tiosulfato se realiza hasta que hay un cambio de color a amarillo pálido. Luego, se agregan 5 gotas de almidón y se continúa valorando hasta que el color azul vinoso cambie a incoloro. Se realiza en triplicado.
- Solución de Iodo 0,1 N: Se pesan 20 gramos de yoduro libre de yodato p.a. en 30-40 mL de agua destilada en un matraz aforado de un litro con tapa esmerilada. Luego, se pesan 12,7 gramos de yodo resublimado sobre un vidrio reloj y se transfieren cuantitativamente al matraz. Tras agitar hasta que el yodo se disuelva, se deja reposar por veinte minutos y se lleva al aforo. Se conserva en un frasco con tapa de vidrio esmerilado en un lugar frío y oscuro.
- Estandarización de la solución de yodo con tiosulfato: En un matraz Erlenmeyer, se agregan 10 mL de la solución de yodo preparada y se titula con la solución valorada de tiosulfato de sodio (patrón secundario) hasta obtener un color amarillo pálido. Se anota el gasto y se realiza en duplicado.
- Solución de almidón: Se prepara una pasta con un gramo de almidón soluble y una pequeña cantidad de agua. Luego, se agrega, con buena agitación, a 100 mL de agua hirviendo y se hierve durante un minuto. Se deja enfriar y se añaden tres gramos de yoduro de potasio.

Cálculo

Conociendo el volumen utilizado de yodos consumido por el yodo de la solución de tiosulfatos como patrón primario se calculan los milimoles totales consumidos por la solución estándar. Al saber el volumen de yodo agregado a la muestra se tiene los moles totales de yodo. Al restar ambas cantidades sabremos la cantidad de milimoles consumidos por la muestra y de acuerdo con la relación:

$$1 \text{ mL de } I_2 = 0,1581 \text{ g de } Na_2S_2O_3 \cdot H_2O$$

G. Carbono Orgánico Total (APHA, 2023).

Principio

La muestra se homogeneiza y diluye según sea necesario, y una micro porción se inyecta en una cámara de reacción calentada, empacada con un catalizador oxidante como óxido de cobalto, metales del grupo del platino o cromato de bario. El agua se vaporiza y el carbono orgánico se oxida a CO_2 y H_2O . El CO_2 proveniente de la oxidación del carbono orgánico e inorgánico se transporta en corrientes de gas portador y se mide mediante un analizador infrarrojo no dispersivo o titulación coulombimétrica. Dado que se mide el carbono total, el carbono inorgánico debe eliminarse por acidificación y desgasificación o medirse por separado y el TOC obtenerse por diferencia.

Se mide el carbono inorgánico inyectando la muestra en una cámara de reacción donde se acidifica. En condiciones ácidas, todo el carbono inorgánico se convierte en CO_2 , que se transfiere al detector y se mide. Bajo estas condiciones, el carbono orgánico no se oxida y solo se mide el carbono inorgánico. Alternativamente, convierta los carbonatos inorgánicos en CO_2 con ácido y elimine el CO_2 mediante purga antes de la inyección de la muestra. La muestra contiene solo la fracción de carbono orgánico no purgable del carbono total; también es necesario realizar una determinación de carbono orgánico purgable para medir el TOC.

La eliminación de carbonato y bicarbonato por acidificación y purga con gas purificado resulta en la pérdida de sustancias orgánicas volátiles. Los compuestos volátiles también

pueden perderse durante la mezcla de la muestra, especialmente si la temperatura aumenta. Otra pérdida importante puede ocurrir si las partículas grandes que contienen carbono no ingresan a la aguja utilizada para la inyección. La filtración, aunque es necesaria para eliminar la materia orgánica particulada cuando solo se va a determinar el DOC, puede resultar en la pérdida o ganancia de DOC, dependiendo de las propiedades físicas de los compuestos que contienen carbono y de la adsorción o desorción de material carbonáceo en el filtro. Se debe verificar los filtros por su contribución al DOC analizando un blanco filtrado. Tenga en cuenta que cualquier contacto con material orgánico puede contaminar una muestra. Evitar vidrio contaminado, envases de plástico y tubos de goma. Analizar blancos de tratamiento de muestra, sistema y reactivos.

Se requieren temperaturas de combustión superiores a 950°C para descomponer algunos carbonatos. Los sistemas que utilizan temperaturas más bajas deben destruir los carbonatos mediante acidificación. El carbono elemental puede no oxidarse a temperaturas más bajas, pero generalmente no está presente en muestras de agua ni se forma durante la combustión de muestras diluidas. La ventaja de usar temperaturas más bajas (680°C) es que se minimiza la fusión de sales disueltas, lo que resulta en valores de blanco más bajos. Los gases liberados durante la combustión, como agua, compuestos de haluros y óxidos de nitrógeno, pueden interferir con el sistema de detección. Consulte las recomendaciones del fabricante sobre la selección adecuada de materiales para el eliminador y verifique cualquier interferencia de matriz. La principal limitación de las técnicas de alta temperatura es la magnitud y variabilidad del blanco. Los fabricantes de instrumentos han desarrollado nuevos catalizadores y procedimientos que producen blancos más bajos, lo que resulta en niveles de detección más bajos.

Concentración mínima detectable: 1 mg C/L o menos, dependiendo del instrumento utilizado. Esto se puede lograr con la mayoría de los analizadores de combustión a alta temperatura, aunque el rendimiento del instrumento varía. La concentración mínima detectable puede reducirse concentrando la muestra o aumentando la porción tomada para el análisis.

Equipo y Materiales

- Analizador de carbono orgánico total, utilizando técnicas de combustión.
- Accesorios para muestreo, inyección y preparación de muestras, según lo prescrito por el fabricante del instrumento.
- Mezclador o homogeneizador de muestras.
- Agitador magnético y barras de agitación recubiertas de TFE.
- Aparato de filtración y filtros de 0,45 μm de diámetro de poro. Preferiblemente, utilice filtros de jeringa HPLC sin TOC detectable. También se pueden utilizar filtros de fibra de vidrio o membrana de plata. Enjuague los filtros antes de usar y supervise los blancos de filtro.

Reactivos y Soluciones

- Agua de reactivo: Preparar reactivos, blancos y soluciones estándar a partir de agua de reactivo con un valor de TOC inferior a $2 \times$ el LDM.
- Ácido: Ácido fosfórico, H_3PO_4 . También se puede utilizar ácido sulfúrico, H_2SO_4 .
- Solución madre de carbono orgánico: Disolver 2,1254 g de biftalato de potasio anhidro de grado estándar primario, $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$, en agua libre de carbono y diluir a 1000 mL; 1,00 mL = 1,00 mg de carbono. Preparar estándares de control de laboratorio utilizando cualquier otro compuesto de carbono orgánico apropiado de pureza, estabilidad y solubilidad en agua adecuadas. Conservar acidificando con H_3PO_4 o H_2SO_4 a un $\text{pH} \leq 2$ y almacene a 4°C .
- Solución madre de carbono inorgánico: Disolver 4,4122 g de carbonato de sodio anhidro, Na_2CO_3 , en agua, agregar 3,497 g de bicarbonato de sodio anhidro, NaHCO_3 , y diluir a 1000 mL; 1,00 mL = 1,00 mg de carbono. Alternativamente, usar cualquier otro compuesto de carbonato inorgánico de pureza, estabilidad y solubilidad en agua adecuadas. Mantener bien tapado. No acidificar.
- Gas portador: Oxígeno o aire purificado, libre de CO_2 y con menos de 1 ppm de hidrocarburos (como metano).
- Gas de purga: Cualquier gas libre de CO_2 e hidrocarburos.

Procedimiento

a. Operación del instrumento: Seguir las instrucciones del fabricante para el ensamble, prueba, calibración y operación del analizador. Ajustar a la temperatura óptima de combustión antes de utilizar el instrumento; monitorear la temperatura para asegurar su estabilidad.

b. Tratamiento de la muestra: Si una muestra contiene sólidos grandes o materia insoluble, homogenizar hasta obtener una replicación satisfactoria. Analizar un blanco de homogeneización que consista en agua de reactivo llevada a través del tratamiento de homogeneización. El instrumento disponible proporciona una determinación separada de carbono inorgánico (carbonato, bicarbonato, CO₂ libre) y carbono total, omitir la descarbonatación y determinar el TOC por diferencia entre TC y carbono inorgánico. Si se va a determinar el carbono orgánico disuelto, filtrar la muestra a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro; analizar un blanco de filtración.

c. Inyección de la muestra: Extraer una porción de muestra preparada con una jeringa equipada con una aguja de punta roma. Seleccionar el volumen de la muestra de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Remover las muestras que contengan partículas con un agitador magnético. Seleccionar el tamaño de aguja consistente con el tamaño de partícula de la muestra. También se pueden utilizar otras técnicas de inyección de muestra, como bucles de muestra. Inyectar muestras y estándares en el analizador de acuerdo con las indicaciones del fabricante y registrar la respuesta. Repetir la inyección hasta obtener medidas consecutivas que sean reproducibles dentro del $\pm 10\%$.

d. Preparación de la curva de calibración: Esto no es necesario para instrumentos provistos con una lectura digital de la concentración.

Con la mayoría de los analizadores TOC, no es posible determinar blancos separados para agua de reactivo, reactivos y todo el sistema. Además, algunos analizadores TOC producen un blanco variable e irregular que no se puede corregir de manera confiable. En muchos laboratorios, el agua de reactivo es el principal contribuyente al valor del blanco. Minimizar los errores utilizando agua de reactivo y reactivos bajos en carbono. Inyectar muestras y

blancos procedimentales (que consisten en agua de reactivo llevada a través de cualquier paso de preanálisis; los valores son típicamente más altos que los de agua de reactivo) y determina las concentraciones de carbono orgánico en las muestras directamente a partir de la lectura o las mediciones del instrumento al comparar la respuesta del instrumento corregida con la curva de calibración. Los instrumentos con detectores coulombimétricos no requieren curvas de calibración. Analizar regularmente muestras de control de laboratorio para confirmar el rendimiento del instrumento (ver Control de calidad, a continuación). Estos detectores acumulan el blanco del sistema; por lo tanto, monitorea regularmente el blanco del sistema.

Cálculo

Leer la respuesta del instrumento corregida de los estándares y muestras restando la respuesta del blanco de agua de reactivo de la del estándar y la muestra. El instrumento prepara una curva de estándares de respuesta del instrumento corregida vs. concentración de TOC. Resta el blanco procedural de la respuesta del instrumento de cada muestra y compara con la curva de estándares para determinar el contenido de carbono. Luego, aplica el factor de dilución correspondiente cuando sea necesario y resta el carbono inorgánico del carbono total para así determinar el TOC por diferencia.

H. pH (APHA, 2023).

Principios

La medición del pH se efectúa para controlar la estabilidad del reactor, al ser esta una variable crítica ya que al bajar de los 6,5, se considera que el medio se está acidificando y la población de bacterias podría disminuir al no estar en el rango óptimo de crecimiento, y por lo tanto su capacidad de degradación que las caracteriza disminuye, en este escenario se aumenta el pH agregando un exceso de bicarbonato para aumentar la alcalinidad de alimentación preparada para el reactor. Este procedimiento se realiza a fin de verificar que el valor se mantenga entre 6 y 8, que es el rango que permite el crecimiento de *Thiobacillus Denitrificans* óptimamente.

Equipos y materiales:

- Vaso precipitado 100mL
- Piseta.
- Soluciones calibración buffer pH 4, 7,10
- pH ThermoScientific Orion 370 PerpHecT® LogR Meter

Procedimiento

- a. Efectuar calibración del pH metro entre las medidas de pH 4 – 7 - 10
- b. Sumergir electrodo y esperar a que se estabilice se anota la medida.

Cálculo

Directamente de la lectura entregada por el equipo.

I. Cálculo de tampón difosfato

El objetivo de utilizar una solución tampón es amortiguar los cambios bruscos de pH en un medio, a través del equilibrio que se forma entre un ácido y una base débil. La efectividad de la solución a la hora de amortiguar dichos cambios dependerá principalmente de la concentración de esta. Lógicamente a una mayor concentración la amortiguación será mayor, pero también implicará un uso excesivo y costoso de los reactivos a utilizar. Para determinar la concentración óptima dependerá exclusivamente del experimento a realizar, la cual debe ir variando durante su transcurso, según los objetivos que este requiera hasta lograrlo.

Para calcular una solución tampón o *buffer*, se utiliza la ecuación de Henderson-Hasselbach. Se debe iniciar con un pH objetivo a la que la solución mantendrá estable y un ácido débil junto a su base conjugada. Para la presente investigación se utilizó fosfato monopotásico KH_2PO_4 y fosfato dipotásico K_2HPO_4 y un pH objetivo de 7. Entonces, para 1 L de solución se tienen las siguientes ecuaciones.

$$pH_{Objetivo} = pK_a + \log \frac{[K_2HPO_4]}{[KH_2PO_4]} \quad (13)$$

$$Molaridad_{Solución} = [K_2HPO_4] + [KH_2PO_4] \quad (14)$$

El valor aproximado de pKa del equilibrio entre los fosfatos es de 7.2. Con ambas ecuaciones, se despeja la concentración de cada reactivo a utilizar, lo que se logra fácilmente en hoja de cálculo. La cantidad de cada reactivo a utilizar se obtiene a través de los pesos moleculares de cada uno.