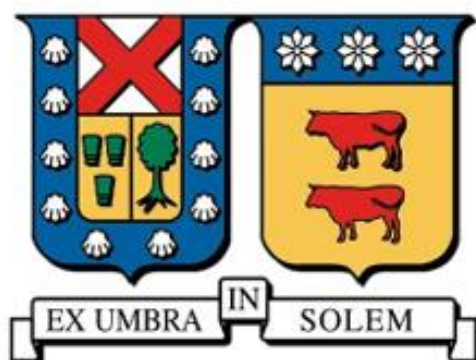


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAISO-CHILE



**“Evaluación comparativa de reactores por lotes
secuenciales con y sin zeolita en los procesos de
nitrificación, parcial y total, y desnitrificación
mixotrófica”**

SEBASTIÁN MATÍAS CHÁVEZ VERDUGO

Memoria presentada para optar al título de

INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

Profesor Guía: Dra. Lorna Guerrero Saldes

Profesor Co-Referente: MSc. Andrea Barahona Lloré

Agosto 2026



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

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

Título del trabajo: "Evaluación comparativa de reactores por lotes secuenciales con y sin zeolita en los procesos de nitrificación, parcial y total, y desnitrificación mixotrófica"

Nombre del candidato(a): _Sebastián Matías Chávez Verdugo_

Carrera / Grado: _Ingeniería Civil Ambiental_

Campus: Casa Central - Valparaíso Departamento: Dpto. De Ingeniería Química y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, _LORNA GUERRERO SALDES_, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

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

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

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

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

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

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

4.- FIRMAS

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

Fecha: _11/9/2026_ Firma:

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: _11/9/2026_ Firma: Sebastián

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

Resumen

La presencia de compuestos nitrogenados y azufrados en residuos industriales líquidos representa una problemática ambiental relevante, especialmente en efluentes asociados a actividades como la acuicultura, la industria porcina y el tratamiento anaerobio de residuos. Estos efluentes pueden presentar altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, baja disponibilidad de carbono orgánico y presencia de especies reducidas de azufre, lo que dificulta su tratamiento mediante esquemas convencionales. En este contexto, la remoción biológica de nitrógeno mediante procesos de nitrificación y desnitrificación constituye una alternativa de interés para disminuir la carga contaminante antes de la descarga.

Tradicionalmente, la remoción de nitrógeno se realiza mediante una etapa aeróbica de nitrificación, en la cual el amonio es oxidado a nitrito y nitrato, seguida de una etapa anóxica de desnitrificación heterótrofa, donde estas especies oxidadas son reducidas a nitrógeno gaseoso utilizando materia orgánica como donador de electrones. Sin embargo, cuando la relación carbono/nitrógeno es baja, la desnitrificación puede verse limitada, por lo que adquieren relevancia alternativas como la nitrificación parcial vía nitrito y la desnitrificación mixotrófica. Esta última combina el uso de carbono orgánico y compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones, permitiendo acoplar la remoción de nitrógeno, azufre y materia orgánica.

El presente estudio se enmarca en el proyecto fondecyt N° 1241199 “*Sequential nitrification – mixotrophic denitrification v/s simultaneous nitrification – mixotrophic denitrification: comparative study of technologies using Chilean zeolite as microbial support*”. Donde el objetivo fue evaluar comparativamente el desempeño de dos reactores por lotes secuenciales, uno control sin soporte, denominado RC, y otro con zeolita como soporte para biomasa adherida, denominado RZ, en los procesos de nitrificación parcial, nitrificación total y desnitrificación mixotrófica. Para ello, se desarrollaron dos etapas experimentales: la Etapa A (98 días), orientada a la nitrificación parcial vía nitrito, y la Etapa B (62 días), enfocada en la puesta en marcha de la nitrificación total vía nitrato. Ambos reactores operaron con un volumen efectivo de 1,5 [L], utilizando una alimentación sintética con nitrógeno amoniacal durante la fase aeróbica y una alimentación anóxica con acetato de potasio y sulfuro de sodio, dosificados en función del nitrito y nitrato generados previamente a partir de las relaciones C/N y S/N las cuales fueron 2 y 1,5 respectivamente.

En cuanto a los resultados obtenidos en la etapa nitrificante, durante los periodos de mayor actividad en el reactor RZ las concentraciones del efluente alcanzaron valores de 58,98 mg NO_3^- - N/L y 37,066 mg N- NO_2^- /L durante la etapa A, en cambio durante la etapa B se obtuvieron 3,86 mg NO_3^- - N/L y 11,79 mg NO_2^- -N/L. En RC se obtuvieron 10,59 mg NO_3^- - N/L y 16,977 mg N- NO_2^- /L en la etapa A y 28,255 mg NO_3^- - N/L 11,70 mg NO_2^- -N/L. Estos resultados evidencian una mayor producción durante la etapa A en cambio durante la etapa B no se evidenció debido al corto periodo de adaptación que tuvo la zeolita.

En etapa desnitrificante, ambos reactores alcanzaron remociones de nitrito y nitrato cercanas al 90 % en ambas etapas, sin embargo, la generación de sulfato no fue tan consistente, en los periodos de mayor actividad la generación de sulfato para RZ fue de 50,98 mg S/L y 15,96 mg S/L en las etapas A y B respectivamente. En RC los valores obtenidos fueron 28,86 mg S/L y 15,96 mg S/L en las etapas A y B. Asimismo, se registró un consumo de COT entre 70 y 90 % en ambos reactores y etapas, evidenciando una coexistencia de microorganismos autótrofos y heterótrofos. En cuanto al pH y OD, presentaron valores en rangos estables en ambas etapas.

Finalmente, los ensayos de actividad desnitrificante autótrofa y heterótrofa confirmaron la presencia de ambas rutas metabólicas en los dos reactores. En la Etapa A, RZ presentó mayores valores de ADA y ADH, alcanzando 5,30 y 7,42 g $\text{N}_2\text{-N}/(\text{g SSV}\cdot\text{d})$, respectivamente, en comparación con 4,77 y 5,30 g $\text{N}_2\text{-N}/(\text{g SSV}\cdot\text{d})$ obtenidos en RC. Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo en la Etapa B, donde la actividad autótrofa fue mayor en RC con 6,89 g $\text{N}_2\text{-N}/(\text{g SSV}\cdot\text{d})$, mientras que RZ alcanzó 4,24 g $\text{N}_2\text{-N}/(\text{g SSV}\cdot\text{d})$; en tanto, la actividad heterótrofa fue similar en ambos reactores, con 4,77 g $\text{N}_2\text{-N}/(\text{g SSV}\cdot\text{d})$. En conjunto, los resultados obtenidos indican que existió actividad asociada a las vías autótrofa y heterótrofa, respaldando el desarrollo de una desnitrificación mixotrófica durante la operación.

Índice

Resumen	2
Capítulo 1: Introducción y objetivos	8
1.1 Introducción.....	8
1.2 Objetivos.....	9
1.2.1 Objetivo general	9
1.2.2 Objetivos específicos.....	9
Capítulo 2: Marco Teórico.....	10
2.1. Problemática del nitrógeno y el azufre en aguas residuales industriales	10
2.1.1 Panorama global y chileno de la contaminación por nutrientes.....	10
2.1.2 Fuentes industriales: acuicultura, industria porcina y digestatos anaerobios.....	11
2.1.3 Impactos ambientales: eutrofización, hipoxia y toxicidad	11
2.1.4 Marco regulatorio chileno	12
2.2 Ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y del azufre.....	13
2.2.1 El ciclo del nitrógeno: formas químicas y transformaciones microbianas.....	13
2.2.2 El ciclo del azufre: reservorios y transformaciones	16
2.2.3 Acoplamiento nitrógeno–azufre en ambientes acuáticos e industriales	17
2.3 Procesos biológicos de remoción de nitrógeno.....	18
2.3.1 Nitrificación convencional: estequiometría, cinética y microorganismos	18
2.3.2 Nitrificación parcial.....	19
2.3.3 Desnitrificación heterótrofa convencional: donadores de electrones y relación C/N.	21
2.3.4 Desnitrificación autótrofa vía azufre: bacterias sulfoxidantes y estequiometría..	22
2.3.5 Desnitrificación mixotrófica: sinergia autótrofa-heterótrofa	22
2.3.6 Nitrificación-desnitrificación simultánea (SND): mecanismos físicos y biológicos	23
2.4 Uso de soportes minerales: la zeolita como material multifuncional	24
2.4.1 Estructura, propiedades y clasificación.....	24
2.4.2 Aplicaciones en tratamiento biológico: soporte de biopelícula.....	26
2.4.3 Zeolita chilena: yacimientos, características y disponibilidad	27
2.5 La biopelícula en el tratamiento biológico.....	27
2.6 Reactores biológicos utilizados en el tratamiento de aguas residuales (discontinuos y continuos).....	28
2.6.1 Fundamentos y comparación.....	28
2.6.2 Reactores secuenciales por lotes (SBR).....	29

2.6.3 Reactores discontinuos de biopelícula (SBBR)	29
2.6.4 Estrategias de puesta en marcha.....	30
2.7 Parámetros operacionales críticos.....	30
2.7.1 Temperatura.....	30
2.7.2 pH y equilibrios de amoníaco libre y ácido nitroso libre	31
2.7.3 Oxígeno disuelto: selección BAO/BNO y rol en la SND	31
2.7.4 Relación C/N	32
2.7.5 Relación S/N	32
2.7.6 Tiempo de retención hidráulico (TRH)	33
2.8 Evaluación del desempeño microbiano	33
2.8.1 Ensayos de actividad desnitrificante heterótrofa (ADH) y autótrofa (ADA).....	33
Capítulo 3: Materiales y Métodos	34
3.1 Estrategia experimental.....	34
3.1.1 Etapa orientada a la nitrificación parcial vía nitrito y desnitrificación mixotrófica	34
3.1.2 Etapa orientada a la nitrificación parcial vía nitrato y desnitrificación mixotrófica	35
3.1.3 Puntos de muestreo y criterios de dosificación	35
3.2 Reactores utilizados en cada etapa.....	36
3.2.1 Descripción general de los reactores y uso de zeolita.....	36
3.2.1 Configuración utilizada en la etapa vía nitrito	37
3.2.2 Configuración utilizada en la etapa vía nitrato.....	38
3.3 Inóculos y sustratos utilizados en cada etapa.....	41
3.3.1 Inóculo.....	41
3.1.2 Sustrato.....	41
3.1.3 Zeolita.....	43
Capítulo 4: Resultados y Discusión:.....	44
4.1 Nitrificación-Desnitrificación	44
4.1.1 Actividad nitrificante.....	44
4.1.2 Actividad desnitrificante	49
4.1.3 Carbono orgánico y nitrógeno total.....	55
4.1.4 pH y Oxígeno disuelto.....	60
4.2 Evolución de la biomasa suspendida mediante SSV	64
4.3 Ensayos de actividad desnitrificante autótrofa y heterótrofa.....	65
Capítulo 5: Conclusiones y Recomendaciones.....	67

5.1 Conclusiones	67
5.2 Recomendaciones	69
Referencias:	70
Anexos:	74
A. Procedimientos Analíticos	74
A.1 Determinación de nitrógeno amoniacal.....	74
A.2 Determinación de nitrito.....	74
A.3 Determinación de nitrato	75
A.4 Determinación de sulfuro	75
A.5 Determinación de sulfato.....	75
A.6 Determinación de carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total ..	76
A.7 Determinación de sólidos suspendidos volátiles	76
A.8 Medición de pH y oxígeno disuelto	76
B. Test ADA y ADH.....	77
C. Propiedades de la zeolita.....	78
D. Balance de nitrógeno.....	78
E. Balance de azufre	83

Índice de Figuras

Figura 2.1. Ciclo microbiano del nitrógeno. Elaboración propia a partir de (Kuypers et al., 2018; Campos et al., 2009.).....	14
Figura 2.2. Ciclo del azufre (Ramírez, 2007).	17
Figura 2.3. Estrategias de concentración de OD(A), amonio libre(B) y temperatura (C)(Campos et al., 2009)	20
Figura 2.4. Unidades estructurales básicas de las zeolitas (Curi et al., 2006).....	25
Figura 3.1. Disposición de los reactores para las mediciones durante etapa orientada a la nitrificación parcial.....	37
Figura 3.2. Vista superior del interior de uno de los reactores utilizados durante la etapa orientada a la nitrificación parcial.	38
Figura 3.3. Esquema de rediseño.....	39
Figura 3.4. Prueba hidráulica aplicada a los reactores rediseñados con el fin de verificar la hermeticidad del sistema antes de su operación experimental..	39
Figura 3.5. Configuración del rediseño de reactores	39
Figura 4.1. Comportamiento del nitrito durante fase anóxica en etapa vía nitrito (a) y vía nitrato (b).	51
Figura 4.2. Evolución de compuestos azufrados en RC durante etapa A.....	53
Figura 4.3. Evolución de compuestos azufrados en RZ durante etapa A	53
Figura 4.4. Evolución de compuestos azufrados en RC durante etapa B.....	54
Figura 4.5. Evolución de compuestos azufrados en RZ durante etapa B.	54

Figura 4.6. Concentraciones de carbono orgánico total en entrada y salida de la fase anóxica para RC (a) y RZ (b) durante la etapa A.....	56
Figura 4.7 Concentraciones de carbono orgánico total en entrada y salida de la fase anóxica para RC (a) y RZ (b) durante la etapa B.....	57
Figura 4.8. Concentraciones de nitrógeno total en entrada y salida de la fase anóxica para RC (a) y RZ (b) durante la etapa A.....	58
Figura 4.9. Concentraciones de nitrógeno total en entrada y salida de la fase anóxica para RC (a) y RZ (b) durante la etapa B.....	59
Figura 4.10. pH promedio por ciclo.	61
Figura 4.11. Concentración de oxígeno disuelto en la fase aerobia durante etapa A.	62
Figura 4.12. OD promedio en etapa B por hora de ciclo.....	63
Figura 4.13. Evolución de solidos suspendidos volátiles durante etapa A.	64
Figura 4.14.Evolución de solidos suspendidos volátiles durante etapa B.	64
Figura 4.15. Actividad desnitrificante autótrofa y heterótrofa en etapa A	65
Figura 4.16. Actividad desnitrificante autótrofa y heterótrofa en etapa B.	66

Índice de Tablas

Tabla 2.1. Formas del nitrógeno y sus estados de oxidación (Kuypers et al., 2018).....	14
Tabla 2.2. Principales tipos de zeolitas naturales (Curi et al., 2006).....	25
Tabla 3.1. Distribución temporal del ciclo operacional durante ambas etapas. Fuente: Elaboración propia, adaptado de (Souza, 2025).	35
Tabla 3.2. Parámetros y procedimientos de medición. Fuente: Elaboración propia.	36
Tabla 3.3 Comparación de las configuraciones de los reactores utilizadas durante las etapas vía nitrito y vía nitrato. Fuente: Elaboración propia.....	40
Tabla 3.4. Concentración de solidos a inicios de etapa B. Fuente: Elaboración propia	41
Tabla 3.5 Composición del RIL en etapa nitrificante. Fuente: adaptado de (Bellenger, 2023)	42
Tabla 3.6. Composición de micronutrientes en etapa nitrificante. Fuente: (Bellenger, 2023)	42
Tabla 3.7. Composición de RIL en etapa desnitrificante. Fuente: (Souza, 2025)	42
Tabla 3.8. Composición de micronutrientes desnitrificantes. Fuente: (Souza, 2025)	43
Tabla 4.1. Ciclos de máxima oxidación de amonio registrados en los reactores RC y RZ en las etapas A y B.....	43
Tabla 4.2. Resultados ensayo de actividad microbiana	43

Capítulo 1: Introducción y objetivos

1.1 Introducción

La presencia simultánea de compuestos nitrogenados y azufrados en residuos industriales líquidos constituye una problemática ambiental relevante. Este tipo de corrientes puede presentarse en actividades como la acuicultura, la producción porcina y el tratamiento anaerobio de residuos, donde pueden coexistir nitrógeno amoniacal, materia orgánica y especies reducidas de azufre. En Chile, el control de estos efluentes es especialmente importante, ya que el Decreto Supremo N.º 90 (MINSEGPRES, 2001) regula las descargas a aguas marinas y continentales superficiales e incorpora, entre otros parámetros, nitrógeno total Kjeldahl, nitrito, nitrato, sulfato y sulfuro (González-Blanco *et al.*, 2021).

En los sistemas convencionales, la remoción biológica de nitrógeno se realiza mediante nitrificación en condiciones aerobias y desnitrificación en condiciones anóxicas. Sin embargo, en efluentes con alta concentración de amonio y baja relación carbono/nitrógeno, como los digestatos anaerobios, estos esquemas pueden requerir una elevada demanda de aireación y la adición de una fuente externa de carbono para favorecer la desnitrificación heterótrofa. En este contexto, han adquirido interés estrategias como la nitrificación parcial vía nitrito, que limita la oxidación del amonio hasta nitrito, evitando su transformación completa a nitrato; la desnitrificación mixotrófica, que utiliza materia orgánica y compuestos inorgánicos reducidos, como el sulfuro, como donadores de electrones para reducir nitrito y nitrato a nitrógeno gaseoso; y la nitrificación-desnitrificación simultánea (SND), que integra ambos procesos dentro de un mismo reactor mediante la coexistencia de condiciones aerobias y anóxicas. Estas estrategias presentan potencial para optimizar la remoción de nitrógeno y disminuir los requerimientos operacionales. (EPA, 2010).

Los reactores secuenciales por lotes permiten controlar de manera flexible las etapas de alimentación, aireación, agitación y sedimentación. Además, la incorporación de zeolita como material de soporte puede favorecer la retención de biomasa y contribuir a amortiguar variaciones de amonio mediante procesos de intercambio iónico. No obstante, el desempeño de estos sistemas también depende del diseño del reactor, de la distribución de aire, del

control del oxígeno disuelto y de la estabilización de la biomasa, factores que influyen directamente en la reproducibilidad y eficiencia del proceso (Guerrero et al., 2016).

La presente memoria evalúa comparativamente dos reactores por lotes con nitrificación y desnitrificación simultáneas: un reactor control sin zeolita (RC) y un reactor con zeolita como soporte (RZ). El estudio considera dos etapas experimentales: la etapa A, operada bajo una estrategia de nitrificación vía nitrito, y la etapa B, desarrollada después de un rediseño de los reactores y orientada a una puesta en marcha vía nitrato. A partir de ambas etapas, se analiza el desempeño de remoción de nitrógeno y compuestos azufrados, el comportamiento de los reactores frente al cambio de ruta operacional y el posible aporte de la zeolita y del rediseño implementado.

El aporte de esta memoria consiste en integrar la comparación de dos configuraciones de reactor y etapas operacionales dentro de un mismo sistema experimental. Debido a que entre ambos periodos existieron cambios simultáneos de configuración, inóculo y estrategia de operación, el análisis se enfoca en identificar tendencias, limitaciones y factores críticos para futuras optimizaciones del proceso.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar comparativamente el desempeño de dos reactores por lotes, con y sin zeolita, en los procesos de nitrificación parcial, total y desnitrificación mixotrófica.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las condiciones de operación de ambos reactores en las etapas A y B.
- Comparar la remoción de compuestos nitrogenados y azufrados en ambos reactores.
- Identificar tendencias y limitaciones asociadas al uso de zeolita y al rediseño implementado.

Capítulo 2: Marco Teórico

2.1. Problemática del nitrógeno y el azufre en aguas residuales industriales

2.1.1 Panorama global y chileno de la contaminación por nutrientes

La alteración del ciclo biogeoquímico del nitrógeno constituye una de las mayores presiones ambientales que enfrenta la humanidad en el siglo XXI. La invención del proceso Haber-Bosch y la expansión de la agricultura intensiva han más que duplicado la tasa de fijación reactiva de nitrógeno respecto de los flujos naturales, transfiriendo cantidades masivas de nitrógeno reactivo a los sistemas acuáticos, atmosféricos y terrestres (Galloway *et al.*, 2008). Esta transformación ha sido tan profunda que la carga de nitrógeno y fósforo se identifica como una de las fronteras planetarias que la actividad humana ya habría sobrepasado, comprometiendo la estabilidad de los ecosistemas a escala global (Steffen *et al.*, 2015). Por parte de los ecosistemas acuáticos, el ingreso excesivo de nutrientes provenientes de la producción de alimentos, la quema de combustibles fósiles, la acuicultura y las descargas de aguas residuales domésticas e industriales ha acelerado la eutrofización de las zonas costeras durante las últimas décadas (Malone y Newton, 2020).

El nitrógeno reactivo llega a los cuerpos de agua en múltiples formas tales como amonio, nitrito, nitrato y nitrógeno orgánico; su exceso desencadena una serie de efectos negativos que van desde la proliferación de florecimientos algales nocivos hasta el desarrollo de zonas de hipoxia y anoxia (Malone y Newton, 2020). En este contexto, la remoción de nitrógeno de los efluentes industriales antes de su descarga se ha vuelto una prioridad regulatoria y técnica, especialmente en países cuya economía depende fuertemente de actividades productivas que generan residuos líquidos ricos en compuestos nitrogenados, como es el caso de Chile (Buschmann *et al.*, 2009).

Chile posee un lugar particular dentro de esta problemática, debido a la magnitud de la industria salmonera y porcina, dos actividades que producen efluentes con altas cargas de nitrógeno amoniacal y materia orgánica. La gran expansión de la salmonicultura en el sur del país ha estado acompañada de preocupaciones sobre sus impactos en la calidad del agua y la salud de los ecosistemas costeros, incluyendo el aporte de nutrientes y materia orgánica a fiordos y canales de baja renovación hídrica (Buschmann *et al.*, 2009). Estas condiciones

geográficas, sumadas a la sensibilidad de los ecosistemas australes, refuerzan la necesidad de tecnologías de tratamiento robustas y de bajo costo operacional.

2.1.2 Fuentes industriales: acuicultura, industria porcina y digestatos anaerobios

Los efluentes de la industria pesquera y salmonera se caracterizan por elevadas concentraciones de proteínas, materia orgánica y nitrógeno, además de una salinidad variable que puede inhibir a los microorganismos responsables del tratamiento biológico. La digestión anaerobia constituye una alternativa atractiva para el tratamiento primario de estos residuos, ya que permite reducir la carga orgánica y recuperar energía en forma de biogás; sin embargo, el digestato resultante conserva una alta concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+) que debe ser removido en una etapa posterior. (Huiliñir *et al.*, 2011). Los efluentes de la digestión anaerobia de residuos porcinos presentan una problemática análoga: el nitrógeno amoniacal alcanza niveles que resultan inhibitorios incluso para el propio proceso metanogénico, lo que exige estrategias de remoción específicas (Moya *et al.*, 2012).

Una característica distintiva de los efluentes de digestor anaerobio de la industria salmonera y porcina es la coexistencia de compuestos nitrogenados y azufrados. La degradación anaerobia de proteínas y la reducción de sulfato generan sulfuro ($\text{HS}^-/\text{H}_2\text{S}$), especie que, lejos de ser únicamente un contaminante, puede aprovecharse como donador de electrones para la desnitrificación autótrofa (Montalvo *et al.*, 2016). Esta dualidad convierte a dichos efluentes en un caso de estudio idóneo para procesos que acoplan la remoción simultánea de nitrógeno, azufre y carbono, tal como propone el marco del proyecto Fondecyt N° 1241199.

2.1.3 Impactos ambientales: eutrofización, hipoxia y toxicidad

El impacto más común del vertido de nitrógeno es la eutrofización de los cuerpos receptores. El enriquecimiento con nitrógeno y fósforo estimula la productividad primaria y el crecimiento algal excesivo, cuyas dos manifestaciones más frecuentes son la hipoxia y los florecimientos algales nocivos, con consecuencias ecológicas y sociales de gran alcance tales como el declive de la biodiversidad, pérdida de praderas marinas, mortalidad de peces y amenazas a la salud humana (Malone y Newton, 2020). En ambientes estuarinos y costeros, el nitrógeno suele actuar como el nutriente limitante, por lo que su ingreso adicional es considerado la causa primaria de la eutrofización (Malone y Newton, 2020). Más allá de la eutrofización, las distintas formas del nitrógeno presentan toxicidades específicas. El

amoníaco libre (NH_3) es tóxico para la fauna acuática incluso a bajas concentraciones, mientras que el nitrato en agua de bebida se asocia con la metahemoglobinemia infantil, conocida como el 'síndrome del bebé azul', debido a la interferencia del nitrito en el transporte de oxígeno de la sangre (Ward *et al.*, 2018). Adicionalmente, la exposición crónica a nitratos se ha vinculado con riesgos de cáncer y afectación reproductiva (Galloway *et al.*, 2008). Por su parte, la emisión de óxido nitroso (N_2O) durante procesos incompletos de nitrificación-desnitrificación contribuye al calentamiento global y al deterioro de la capa de ozono, dado que el N_2O es un gas de efecto invernadero de elevado potencial (Massara *et al.*, 2017). En cuanto al azufre, el sulfuro de hidrógeno genera olores, corrosión y toxicidad, mientras que la oxidación de compuestos azufrados en la atmósfera se vincula con fenómenos de acidificación (Pang y Wang, 2021).

2.1.4 Marco regulatorio chileno

En Chile, el control de la contaminación por residuos industriales líquidos (RILes) se estructura sobre la Ley N° 19.300 de Bases Generales del Medio Ambiente y un conjunto de normas de emisión específicas que fijan límites máximos de contaminantes según el cuerpo receptor (BCN, 2026). El instrumento central para las descargas directas a aguas superficiales es el Decreto Supremo N° 90 de 2000 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia (MINSEGPRES), que establece la norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales, con el objetivo de prevenir la contaminación de dichos cuerpos de agua mediante el control de parámetros físico-químicos como nitrógeno, fósforo, sólidos suspendidos y demanda bioquímica de oxígeno. Su fiscalización recae principalmente en la Superintendencia del Medio Ambiente (SMA), con competencias específicas de la Superintendencia de Servicios Sanitarios (SISS) sobre las prestaciones de empresas sanitarias (MINSEGPRES, 2001).

Cuando la disposición del efluente se realiza mediante infiltración al subsuelo, rige el Decreto Supremo N° 46 de 2002 del MINSEGPRES, que establece la norma de emisión de residuos líquidos a aguas subterráneas, cuyo objeto es prevenir la contaminación de los acuíferos fijando concentraciones máximas de contaminantes en función de la vulnerabilidad del acuífero receptor (MINSEGPRES, 2003). Por su parte, la gestión de los lodos generados en las plantas de tratamiento (un subproducto inevitable de los procesos biológicos) está regulada por el Decreto Supremo N° 4 de 2009 del MINSEGPRES, que aprueba el

reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas, estableciendo su clasificación sanitaria y las condiciones de almacenamiento, transporte, tratamiento y disposición final (MINSEGPRES, 2009).

Este entramado normativo impone a las industrias salmonera y porcina la obligación de tratar sus efluentes hasta cumplir con los límites de nitrógeno y otros parámetros antes de su descarga, lo que justifica la búsqueda de tecnologías de remoción de nitrógeno eficientes y económicamente viables (BCN, 2026). Las vías de atajo del nitrógeno y los procesos de nitrificación-desnitrificación simultánea, foco de esta investigación, responden precisamente a esta necesidad, al reducir los requerimientos de aireación y de fuente de carbono externa respecto de los esquemas convencionales (Cao *et al.*, 2017).

2.2 Ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y del azufre

2.2.1 El ciclo del nitrógeno: formas químicas y transformaciones microbianas

El nitrógeno es un elemento fundamental para el desarrollo de los seres vivos, debido a que participa en la formación de moléculas esenciales como proteínas y ácidos nucleicos. Aunque la atmósfera representa la principal reserva de nitrógeno en forma de di-nitrógeno molecular (N_2), esta no puede ser utilizada directamente por la mayoría de los organismos, por ende, el crecimiento biológico depende principalmente de formas más asimilables, como el amonio (NH_4^+) y el nitrato (NO_3^-). La presencia y disponibilidad de estas especies en el ambiente está regulada por una serie de transformaciones biogeoquímicas mediadas por comunidades microbianas especializadas, capaces de intervenir en distintas etapas del ciclo del nitrógeno. Además, es notable por la amplitud de sus estados de oxidación, que van desde -3 en el amonio (NH_4^+) hasta $+5$ en el nitrato (NO_3^-), pasando por el nitrógeno molecular (N_2 , estado 0), el óxido nitroso (N_2O , $+1$), el óxido nítrico (NO , $+2$) y el nitrito (NO_2^- , $+3$). Esta versatilidad redox permite que distintos grupos microbianos aprovechen las transformaciones del nitrógeno como fuentes de energía o como aceptores de electrones, articulando un ciclo biogeoquímico complejo que sostiene la vida en la biosfera (Kuypers *et al.*, 2018). La Tabla 2.1 resume las principales formas del nitrógeno y sus estados de oxidación, mientras que la Figura 2.1 representa el ciclo del nitrógeno y sus distintas etapas.

Tabla 2.0.1. Formas del nitrógeno y sus estados de oxidación (Kuypers et al., 2018).

Especie	Fórmula	Estado de oxidación
Amonio / Amoniaco	$\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$	-3
Hidracina	N_2H_4	-2
Hidroxilamina	NH_2OH	-1
Nitrógeno molecular	N_2	0
Óxido nitroso	N_2O	+1
Óxido nítrico	NO	+2
Nitrito	NO_2^-	+3
Nitrato	NO_3^-	+5

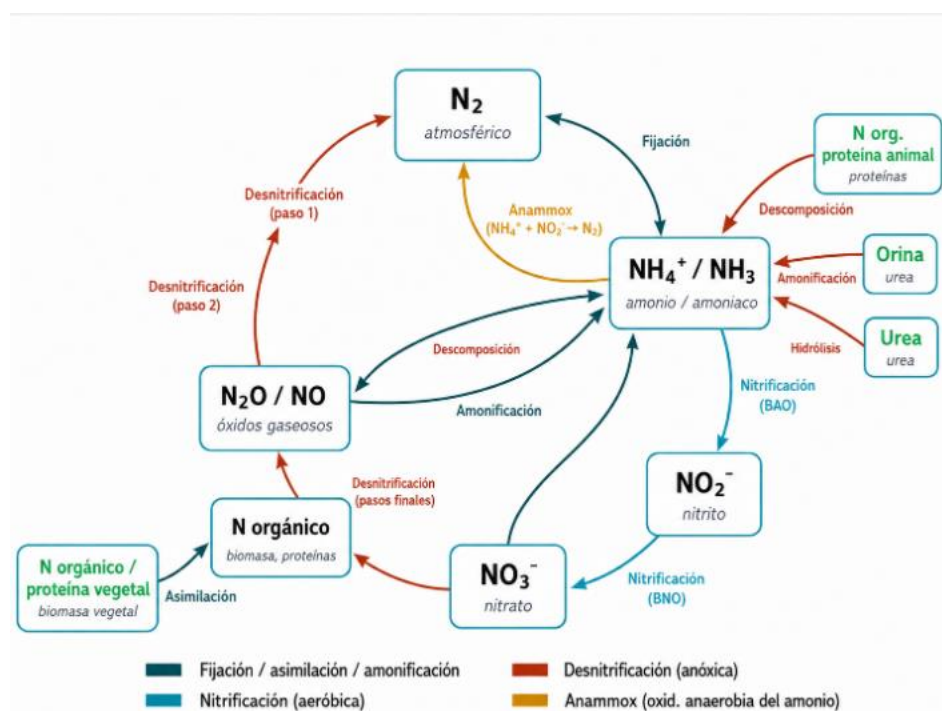


Figura 2.1. Ciclo microbiano del nitrógeno. Elaboración propia a partir de (Kuypers et al., 2018; Campos et al., 2009.)

Las principales etapas del ciclo del nitrógeno representadas en la figura anterior se describen a continuación (Kuypers et al., 2018):

Fijación de nitrógeno: consiste en la conversión del nitrógeno molecular atmosférico (N_2) en formas reducidas que pueden ser incorporadas por los organismos vivos, principalmente amonio (NH_4^+). Este proceso ocurre mayoritariamente por acción de microorganismos

fijadores de nitrógeno, aunque también puede producirse de manera abiótica mediante descargas eléctricas atmosféricas o por procesos industriales, como la síntesis de amoníaco.

Asimilación: corresponde a la incorporación de formas inorgánicas de nitrógeno, como amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-), en la biomasa de los organismos. A través de este proceso, plantas, algas y microorganismos utilizan el nitrógeno disponible en el medio para sintetizar compuestos orgánicos esenciales, tales como aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. De esta manera, el nitrógeno pasa desde formas minerales o inorgánicas hacia formas orgánicas, quedando integrado en la materia viva.

Amonificación: también denominada mineralización, corresponde a la transformación del nitrógeno orgánico presente en restos de biomasa, proteínas, urea u otros compuestos nitrogenados hacia amonio. Este proceso es llevado a cabo principalmente por microorganismos heterótrofos, los cuales degradan la materia orgánica y liberan nitrógeno inorgánico al medio. La amonificación puede desarrollarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, por lo que constituye una etapa relevante en ambientes naturales y en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Nitrificación: es un proceso biológico aeróbico mediante el cual el nitrógeno amoniacal es oxidado progresivamente hasta formas más oxidadas. En la nitrificación total, el amonio o amoníaco es primero oxidado a nitrito por bacterias amonio-oxidantes, como aquellas del género *Nitrosomonas*. Posteriormente, el nitrito es oxidado a nitrato por bacterias nitrito-oxidantes, entre ellas *Nitrobacter* y *Nitrospira*. El nitrato generado puede ser asimilado por organismos fotosintéticos o actuar como aceptor de electrones en procesos de desnitrificación.

Desnitrificación: corresponde a la reducción biológica de nitrato o nitrito hacia formas gaseosas de nitrógeno, principalmente nitrógeno molecular (N_2), pasando por intermediarios como óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O). Este proceso ocurre bajo condiciones anóxicas y es realizado comúnmente por bacterias heterótrofas que utilizan materia orgánica como donador de electrones. Sin embargo, también puede desarrollarse una desnitrificación

autótrofa, en la cual los microorganismos emplean donadores inorgánicos de electrones, tales como compuestos reducidos de azufre o hidrógeno gaseoso (Deb *et al.*, 2024).

2.2.2 El ciclo del azufre: reservorios y transformaciones

El ciclo del azufre comprende un conjunto de transformaciones biogeoquímicas mediante las cuales este elemento circula entre distintas formas químicas y estados de oxidación. En los sistemas acuáticos y en el tratamiento de aguas residuales, el azufre puede encontrarse en especies reducidas, como el sulfuro ($S^{2-}/HS^-/H_2S$, estado de oxidación -2), en formas intermedias como el azufre elemental (S^0) y el tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), o en especies oxidadas como el sulfato (SO_4^{2-} , estado de oxidación $+6$). También puede presentarse como azufre orgánico, formando parte de biomasa, proteínas y compuestos orgánicos sulfurados del tipo R-SH. Esta diversidad de especies permite que el azufre participe en reacciones tanto oxidativas como reductivas, mediadas principalmente por comunidades microbianas especializadas (Montalvo *et al.*, 2016).

En condiciones anaerobias, las bacterias reductoras de sulfato (BRS) utilizan el sulfato como aceptor terminal de electrones, reduciéndolo a sulfuro mediante un proceso conocido como reducción disimilatoria de sulfato. Esta transformación permite a los microorganismos obtener energía y explica la generación de sulfuro en ambientes anaerobios, como sedimentos, digestores anaerobios y digestatos provenientes del tratamiento de residuos orgánicos. De forma complementaria, la degradación de materia orgánica sulfurada puede liberar sulfuro al medio mediante procesos de desulfuración o mineralización. Estos mecanismos son relevantes en efluentes de digestión anaerobia de residuos salmoneros y porcinos, donde pueden coexistir compuestos nitrogenados, materia orgánica y especies reducidas de azufre (Pang y Wang, 2021).

Bajo condiciones aeróbicas o anóxicas, los compuestos reducidos de azufre pueden ser oxidados por bacterias sulfoxidantes. En presencia de oxígeno, especies como el sulfuro, el azufre elemental y el tiosulfato pueden transformarse progresivamente hasta sulfato, proceso que permite a estos microorganismos obtener energía a partir de la oxidación del azufre. Esta oxidación puede ocurrir de manera parcial, generando intermediarios como S^0 o $S_2O_3^{2-}$, o de forma completa, produciendo SO_4^{2-} como especie final. Además, parte del sulfato puede ser incorporado a la biomasa mediante reducción asimilatoria, permitiendo la síntesis de compuestos celulares que contienen azufre. En sistemas de tratamiento biológico, el ciclo del

azufre adquiere especial importancia por su interacción con el ciclo del nitrógeno. Cuando el aceptor de electrones no es el oxígeno, sino nitrato o nitrito, la oxidación de compuestos reducidos de azufre puede acoplarse a la reducción de especies nitrogenadas, dando origen a la desnitrificación autótrofa sulfurooxidante. En este proceso, el sulfuro, el azufre elemental o el tiosulfato actúan como donadores de electrones, mientras que el nitrato o nitrito son reducidos hacia nitrógeno gaseoso. De esta forma, el sulfuro deja de ser únicamente un contaminante asociado a toxicidad, olores y corrosión, y puede ser aprovechado como sustrato para la remoción biológica de nitrógeno. Este acoplamiento entre los ciclos del azufre y del nitrógeno constituye la base de procesos de desnitrificación autótrofa y mixotrófica, orientados a la eliminación simultánea de compuestos nitrogenados y azufrados en residuos líquidos industriales (Di Capua *et al.*, 2019). La Figura 2.2 resume las principales transformaciones microbianas del azufre, destacando la reducción disimilatoria de sulfato bajo condiciones anaerobias, la oxidación de especies reducidas hacia sulfato bajo condiciones aeróbicas o anóxicas, y la ruta de oxidación autótrofa acoplada a la desnitrificación, relevante para la remoción simultánea de nitrógeno y azufre.

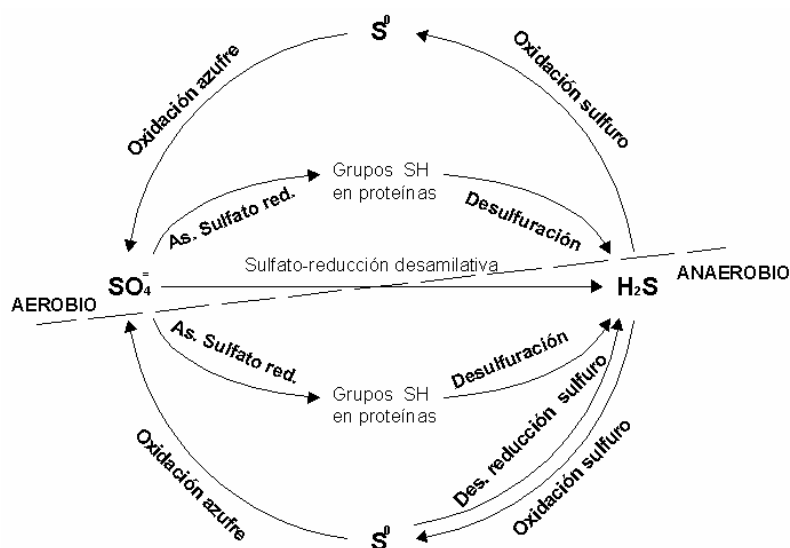


Figura 2.2. Ciclo del azufre (Ramírez, 2007).

2.2.3 Acoplamiento nitrógeno–azufre en ambientes acuáticos e industriales

El acoplamiento entre los ciclos del nitrógeno y el azufre es un fenómeno de creciente interés en el tratamiento biológico de aguas. En sedimentos marinos y en interfaces óxico-anóxicas naturales, la oxidación de sulfuro acoplada a la reducción de nitrato ha sido reconocida como

una vía dominante de transformación del nitrógeno, catalizada por bacterias como *Thiobacillus denitrificans*. En los sistemas de ingeniería, este acoplamiento permite valorizar el sulfuro presente en los efluentes anaerobios: en lugar de ser un contaminante que requiere tratamiento adicional, actúa como donador de electrones inorgánico para la desnitrificación, reduciendo o eliminando la necesidad de fuente de carbono externa (Di Capua *et al.*, 2019). Este principio sustenta la desnitrificación mixotrófica, en la cual conviven donadores de electrones autótrofos (compuestos azufrados) y heterótrofos (materia orgánica), y que constituye el núcleo conceptual del proceso estudiado en esta tesis. La sinergia entre ambos ciclos posibilita tratar simultáneamente nitrógeno, azufre y carbono en un solo sistema, con ventajas tanto económicas como ambientales (Palominos *et al.*, 2025).

2.3 Procesos biológicos de remoción de nitrógeno

La remoción biológica de nitrógeno en aguas residuales se basa en la acción de comunidades microbianas capaces de transformar las distintas especies nitrogenadas presentes en el efluente. Tradicionalmente, este proceso se desarrolla mediante la combinación de una etapa aeróbica de nitrificación y una etapa anóxica de desnitrificación. En la primera, el nitrógeno amoniacal es oxidado hacia nitrito y nitrato; en la segunda, estas especies oxidadas son reducidas hasta nitrógeno gaseoso, permitiendo su eliminación del sistema (Metcalf y Eddy, 2014). El diseño y operación de estos procesos depende de la composición del agua residual, la disponibilidad de carbono orgánico, la concentración de oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y la presencia de compuestos inhibidores. En efluentes con baja relación C/N, como digestatos anaerobios o residuos líquidos previamente estabilizados, la desnitrificación heterótrofa puede verse limitada por la falta de materia orgánica disponible. En estos casos, cobran relevancia las rutas alternativas, tales como la nitrificación parcial, la desnitrificación autótrofa vía azufre y la desnitrificación mixotrófica (Cao *et al.*, 2017).

2.3.1 Nitrificación convencional: estequiometría, cinética y microorganismos

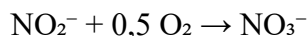
La nitrificación es la oxidación biológica aeróbica del amonio hasta nitrato, y constituye la primera etapa de la remoción biológica de nitrógeno en la mayoría de las plantas de tratamiento (Metcalf y Eddy, 2014). El proceso se realiza en dos pasos secuenciales catalizados por dos grupos funcionales distintos de bacterias autótrofas quimiolitótrofas. En el primer paso, la nitrificación, las bacterias amonio-oxidantes (BAO), como los géneros

Nitrosomonas, *Nitrospira* y *Nitrosococcus*, oxidan el amonio a nitrito; en el segundo, la nitratación, las bacterias nitrito-oxidantes (BNO), como *Nitrobacter*, *Nitrospira* y *Nitrospina*, oxidan el nitrito a nitrato (Ge *et al.*, 2015). Las reacciones estequiométricas simplificadas de ambas etapas son las siguientes (Metcalf y Eddy, 2014).

Nitritación (Ecuación 3.1):



Nitratación (Ecuación 3.2):



Nitrificación total (Ecuación 3.3):



La estequiometría revela dos aspectos operacionales críticos. Primero, la nitrificación completa consume aproximadamente 4,57 [g] de O₂ por cada gramo de nitrógeno amoniacal oxidado, lo que representa una fracción importante del costo energético de aireación en una planta (Rojas, 2017). Segundo, el proceso libera protones (H⁺), consumiendo alcalinidad —cerca de 7,14 g de CaCO₃ por gramo de N-NH₄⁺ oxidado— por lo que la acidificación debe controlarse para mantener el pH en rangos favorables (Metcalf y Eddy, 2014). Las bacterias nitrificantes son autótrofas, es decir, fijan carbono inorgánico (CO₂) para su crecimiento, lo que se traduce en tasas de crecimiento lentas y bajos rendimientos de biomasa en comparación con los organismos heterótrofos (Ge *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista operacional, la nitrificación total permite reducir la concentración de nitrógeno amoniacal, especie que puede presentar toxicidad en ambientes acuáticos. No obstante, este proceso posee una elevada demanda de oxígeno y genera consumo de alcalinidad debido a la liberación de protones durante la oxidación del amonio. Por esta razón, el control del pH, la alcalinidad y el oxígeno disuelto resulta fundamental para mantener la actividad de los microorganismos nitrificantes (Metcalf y Eddy, 2014).

2.3.2 Nitrificación parcial

La nitrificación parcial, también denominada nitritación parcial o vía nitrito, consiste en detener la oxidación del nitrógeno amoniacal en la etapa de nitrito, evitando su conversión posterior a nitrato. Para lograrlo, es necesario favorecer la actividad de las bacterias amonio-oxidantes y limitar la actividad de las bacterias nitrito-oxidantes. Esta ruta ha sido ampliamente estudiada debido a sus ventajas energéticas, ya que reduce el consumo de

oxígeno respecto de la nitrificación total y disminuye la demanda de fuente de carbono en la etapa posterior de desnitrificación (Cao *et al.*, 2017).

El principal desafío de la nitrificación parcial es mantener de forma estable la acumulación de nitrito. Para ello, se han propuesto distintas estrategias de control, entre las que se incluyen la operación a bajas concentraciones de oxígeno disuelto, el manejo del pH y la temperatura, la inhibición selectiva por amoníaco libre o ácido nitroso libre, y el ajuste del tiempo de retención de sólidos. Estas condiciones buscan generar una ventaja competitiva para las bacterias amonio-oxidantes frente a las bacterias nitrito-oxidantes (Ge *et al.*, 2015). Posibles estrategias para llevar a cabo se reflejan en la Figura 2.3.

En reactores biológicos, la vía nitrito resulta especialmente interesante cuando se combina con procesos de desnitrificación, ya que el nitrito puede ser reducido directamente a nitrógeno gaseoso sin pasar por la etapa de nitrato. Esta condición permite acortar la ruta metabólica de remoción de nitrógeno y mejorar la eficiencia del proceso. Sin embargo, la estabilidad de la nitrificación parcial puede verse afectada por cambios en la carga de amonio, el oxígeno disuelto, la composición microbiana y la adaptación de las bacterias nitrito-oxidantes (Duan *et al.*, 2020).

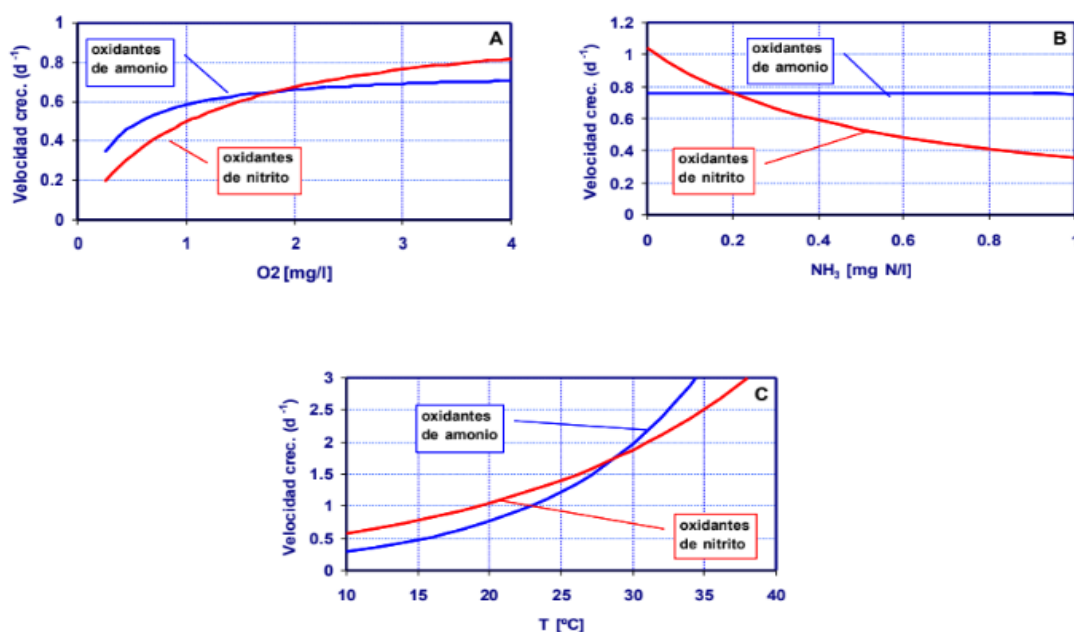
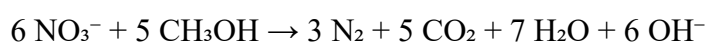


Figura 2.3. Estrategias de concentración de OD(A), amonio libre(B) y temperatura (C)(Campos *et al.*, 2009)

2.3.3 Desnitrificación heterótrofa convencional: donadores de electrones y relación C/N.

La desnitrificación es la reducción secuencial del nitrato a nitrógeno gaseoso bajo condiciones anóxicas, y representa la etapa que efectivamente remueve el nitrógeno del sistema al transferirlo a la fase gaseosa (Metcalf y Eddy, 2014). En la desnitrificación heterótrofa, un amplio conjunto de bacterias facultativas utiliza materia orgánica como donador de electrones y fuente de carbono, mientras el nitrato y el nitrito actúan como aceptores terminales de electrones. La desnitrificación heterótrofa puede representarse mediante la siguiente ecuación estequiométrica (Metcalf y Eddy, 2014):

Desnitrificación heterótrofa con metanol (Ecuación 3.4):



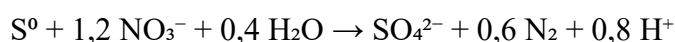
Un parámetro clave de este proceso es la relación entre el carbono orgánico y el nitrógeno (relación C/N). Existe un requerimiento mínimo de materia orgánica para reducir completamente el nitrato; valores bajos de C/N conducen a una desnitrificación incompleta con acumulación de nitrito o nitrato residual, mientras que valores elevados encarecen la operación por el consumo de fuente de carbono externa y generan mayor producción de lodos. En efluentes de digestión anaerobia, la relación C/N suele ser baja debido a la remoción previa de la materia orgánica durante la metanogénesis, lo que penaliza a la desnitrificación heterótrofa y motiva la búsqueda de donadores de electrones alternativos, como los compuestos azufrados (Di Capua *et al.*, 2019). La desnitrificación también regenera parte de la alcalinidad consumida durante la nitrificación, aportando aproximadamente 3,57 [g] de CaCO_3 por gramo de nitrógeno reducido, lo que contribuye a estabilizar el pH del sistema (Metcalf y Eddy, 2014).

Aunque la desnitrificación heterótrofa es ampliamente utilizada en sistemas convencionales de tratamiento, su aplicación puede ser limitada en efluentes con baja carga orgánica disponible, como digestatos anaerobios. En estos casos, resulta necesario evaluar fuentes alternativas de electrones o procesos combinados que permitan sostener la reducción de nitrato y nitrito sin depender exclusivamente de materia orgánica externa (Pang y Wang, 2021).

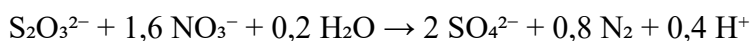
2.3.4 Desnitrificación autótrofa vía azufre: bacterias sulfoxidantes y estequiometría

La desnitrificación autótrofa sulfuroxidante utiliza compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones para reducir el nitrato o el nitrito, prescindiendo total o parcialmente de la materia orgánica. Este proceso es realizado por bacterias sulfoxidantes quimiolitotróficas, entre las que destacan *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Paracoccus* y *Thiosphaera*, que obtienen energía de la oxidación del azufre y fijan carbono inorgánico para su crecimiento. Los donadores de electrones más empleados son el sulfuro ($\text{HS}^-/\text{S}^{2-}$), el azufre elemental (S^0) y el tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), aunque también pueden utilizarse el hidrógeno (H_2) y el hierro ferroso (Fe^{2+}) en procesos autótrofos análogos (Di Capua *et al.*, 2019). Las reacciones estequiométricas de desnitrificación autótrofa con azufre elemental y con tiosulfato se expresan como (Campos *et al.*, 2009):

Desnitrificación autótrofa con azufre elemental (Ecuación 3.5):



Desnitrificación autótrofa con tiosulfato (Ecuación 3.6):



Las principales ventajas de la desnitrificación autótrofa vía azufre son la eliminación de la demanda de carbono orgánico, la reducción de la producción de lodos en torno a un 55 %, la disminución de costos operacionales de hasta un 80 % y la reducción significativa de emisiones de gases de efecto invernadero respecto de la desnitrificación heterótrofa, lo que la posiciona como una tecnología atractiva para el tratamiento de aguas con baja relación C/N (Cui *et al.*, 2019). No obstante, el proceso presenta limitaciones: genera sulfato como producto, consume alcalinidad y puede acumular nitrito, especialmente cuando el suministro de donador de electrones es insuficiente respecto de la relación estequiométrica S/N (Di Capua *et al.*, 2019). El control de la concentración de oxígeno disuelto es esencial, dado que las bacterias sulfoxidantes desnitrificantes operan en condiciones anóxicas, y la presencia de oxígeno favorece la oxidación del azufre desacoplada de la reducción del nitrato (Pang y Wang, 2021).

2.3.5 Desnitrificación mixotrófica: sinergia autótrofa-heterótrofa

La desnitrificación mixotrófica combina, en un mismo sistema, la actividad de desnitrificantes autótrofos que aprovechan donadores inorgánicos de azufre y la de

desnitrificantes heterótrofos que utilizan materia orgánica (Xu *et al.*, 2015). Esta estrategia busca superar las limitaciones de cada vía individual: la desnitrificación heterótrofa se ve penalizada por la baja disponibilidad de carbono en efluentes anaerobios, mientras que la autótrofa produce sulfato en exceso y consume alcalinidad. Al operar de forma conjunta, la fracción heterótrofa aporta la alcalinidad y consume parte del carbono residual, mientras la fracción autótrofa reduce el requerimiento de fuente de carbono externa y limita la producción neta de sulfato (Xu *et al.*, 2015). El resultado es un proceso más robusto, con mayores eficiencias de remoción de nitrógeno total y una comunidad microbiana funcionalmente diversa (Du *et al.*, 2020).

Estudios comparativos han demostrado que los sistemas mixotróficos superan a los puramente autótrofos: por ejemplo, en configuraciones que acoplan desnitrificación autótrofa/mixotrófica con anammox, la eficiencia de remoción de nitrógeno total aumentó del 70 % en condición autótrofa al 97 % en condición mixotrófica (Du *et al.*, 2020). La relación entre carbono, azufre y nitrógeno (C/S/N) es el parámetro determinante para orientar el balance entre ambas vías: a bajas relaciones C/N, la contribución autótrofa domina, mientras que al aumentar el carbono disponible se incrementa la participación heterótrofa (Xu *et al.*, 2015). Trabajos como el de (Peirano *et al.*, 2020), realizado por los equipos de investigación del proyecto Fondecyt han evaluado precisamente la desnitrificación simultánea autótrofa-heterótrofa con alta remoción conjunta de nitrógeno, azufre y carbono, optimizando el proceso mediante metodología de superficie de respuesta. Adicionalmente, se ha documentado la transición desde una desnitrificación autótrofa hacia una mixotrófica, evidenciando la adaptabilidad del consorcio microbiano y la reconfiguración de las comunidades funcionales según la disponibilidad de donadores (Palominos *et al.*, 2025).

2.3.6 Nitrificación-desnitrificación simultánea (SND): mecanismos físicos y biológicos

La nitrificación-desnitrificación simultánea (SND, por sus siglas en inglés) consiste en la ocurrencia concurrente de ambos procesos dentro de un mismo reactor y bajo idénticas condiciones operacionales globales, lo que elimina la necesidad de tanques separados y de ciclos alternados de aireación (Bucci, 2021). La SND es reconocida como una tecnología prometedora para la remoción biológica de nitrógeno debido a su reducido requerimiento de energía y de fuente de carbono, su menor huella estructural y sus menores costos

operacionales frente a los esquemas convencionales de dos etapas (Bucci, 2021). Su viabilidad se explica mediante dos mecanismos complementarios: uno físico y otro biológico.

El mecanismo físico se fundamenta en la existencia de gradientes de oxígeno disuelto dentro de los flóculos de lodo o de las biopelículas. Cuando la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido se mantiene baja, el oxígeno no penetra completamente el agregado microbiano; de este modo, la nitrificación aeróbica ocurre en la capa externa oxigenada, mientras que la desnitrificación anóxica se desarrolla en el núcleo interior privado de oxígeno (Yan *et al.*, 2019). Esta coexistencia espacial de microambientes aeróbicos y anóxicos dentro de una misma partícula es la clave del proceso, y explica por qué el tamaño del flóculo o el espesor de la biopelícula, junto con la concentración de oxígeno disuelto, son variables determinantes. El mecanismo biológico, por su parte, invoca la existencia de microorganismos capaces de realizar nitrificación heterótrofa y desnitrificación aeróbica, que llevan a cabo transformaciones del nitrógeno bajo condiciones que tradicionalmente se consideraban excluyentes (Yan *et al.*, 2019).

La literatura reciente coincide en que la creación de condiciones aeróbicas y anóxicas estables dentro de los flóculos, junto con la optimización de la concentración de oxígeno disuelto, constituyen los principales desafíos del proceso SND (Puriel Hernandez, 2019). Se ha reportado que mantener una concentración baja de oxígeno disuelto, del orden de 0,7 [mg/L] en un reactor discontinuo secuencial, favorece la SND y permite alcanzar eficiencias de remoción de amonio y nitrógeno total superiores al 70 %. Los factores críticos que gobiernan la SND incluyen la concentración de oxígeno disuelto, la relación C/N, la temperatura y el tamaño de los flóculos, todos los cuales modulan la estructura y actividad de la comunidad microbiana (Bucci, 2021). Cuando la SND se combina con la vía del nitrito (o nitrato) y con la desnitrificación mixotrófica, como en el caso del proceso estudiado, se potencian aún más las ventajas energéticas y de eficiencia, aunque también se incrementa la complejidad del control operacional (Palominos *et al.*, 2025).

2.4 Uso de soportes minerales: la zeolita como material multifuncional

2.4.1 Estructura, propiedades y clasificación

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos hidratados cuya estructura se organiza en torno a una red tridimensional de tetraedros de sílice (SiO_4) y de alúmina (AlO_4) unidos por sus

átomos de oxígeno (Senila *et al.*, 2022). La sustitución Si^{4+} por Al genera una carga negativa en la estructura, compensada por cationes intercambiables como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , ubicados en los canales y cavidades del cristal (Senila *et al.*, 2022). En la Figura 2.4 se presentan las unidades estructurales básicas de las zeolitas:

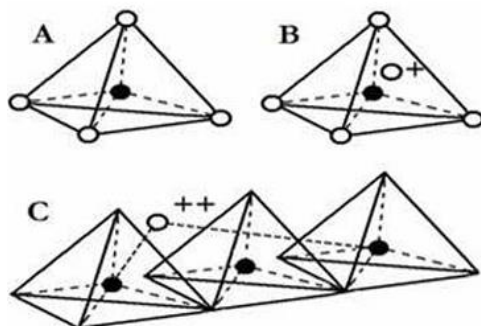


Figura 2.4. Unidades estructurales básicas de las zeolitas (Curi *et al.*, 2006).

Entre sus principales propiedades se encuentran la porosidad, la capacidad de adsorción y el intercambio iónico, asociadas a su elevada área superficial interna y a la presencia de cationes intercambiables. En el tratamiento de aguas residuales, estas características permiten que algunas zeolitas naturales, como la clinoptilolita, retengan amonio (NH_4^+), amortigüen sus variaciones de concentración y actúen como soporte para el crecimiento de microorganismos nitrificantes (Curi *et al.*, 2006). Además de su capacidad de adsorción, las zeolitas presentan una alta capacidad de intercambio iónico. Esta propiedad se explica por la presencia de cationes compensadores de carga, los cuales pueden ser reemplazados por otros cationes presentes en la solución. En el tratamiento de aguas residuales, esta característica resulta especialmente relevante para la remoción de amonio (NH_4^+), debido a la afinidad que presentan algunas zeolitas naturales, como la clinoptilolita, por este ion. De esta forma, la zeolita puede actuar como un reservorio temporal de nitrógeno amoniacal, amortiguando variaciones de concentración en el medio y favoreciendo su posterior transformación biológica por microorganismos nitrificantes adheridos al soporte (Curi *et al.*, 2006).

Las zeolitas se clasifican, según su origen, en naturales y sintéticas. Las zeolitas naturales se forman por la alteración de vidrios volcánicos en presencia de agua y son abundantes en depósitos sedimentarios de origen volcánico (Senila *et al.*, 2022). Para el tratamiento de aguas residuales industriales, la clinoptilolita natural presenta una adecuada relación entre

costo y desempeño y puede utilizarse como soporte para biopelículas (Curi et al., 2006). Los principales tipos de zeolitas naturales y sus características se resumen en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Principales tipos de zeolitas naturales (Curi et al., 2006).

Zeolitas	Fórmula Química
Laumontita	$\text{Ca Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Clinoptilolita	$(\text{Na}, \text{K}, \text{Ca})_{2-3}\text{Al}_3(\text{Al}, \text{Si})_2\text{Si}_{13}\text{O}_{36} \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
Stilbita	$\text{Na Ca}_2\text{Al}_5\text{Si}_{13}\text{O}_{36} \cdot 14\text{H}_2\text{O}$
Phillipsita	$(\text{K}, \text{Na}, \text{Ca})_{1-2}(\text{Si}, \text{Al})_8\text{O}_{16} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Erionita	$(\text{K}_2, \text{Ca}, \text{Na}_2)_2\text{Al}_4\text{Si}_{14}\text{O}_{36} \cdot 15\text{H}_2\text{O}$
Offretita	$(\text{K}_2, \text{Ca})_5\text{Al}_{10}\text{Si}_{26}\text{O}_{72} \cdot 30\text{H}_2\text{O}$
Faujasita	$(\text{Na}_2\text{Ca})\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
Chabazita	$\text{Ca Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{12} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Natrolita	$\text{Na}_2\text{Al}_2\text{Si}_3\text{O}_{10} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Thomsonita	$\text{Na Ca}_2\text{Al}_5\text{Si}_5\text{O}_{20} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Mordenita	$(\text{Ca}, \text{Na}_2, \text{K}_2)\text{Al}_2\text{Si}_{10}\text{O}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Epistilbita	$\text{CaAl}_2\text{Si}_6\text{O}_{16} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Analcima	$\text{Na}, \text{AlSi}_2\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Heulandita	$(\text{Na}, \text{Ca})_{2-3}\text{Al}_3(\text{Al}, \text{Si})_2\text{Si}_{13}\text{O}_{36} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

2.4.2 Aplicaciones en tratamiento biológico: soporte de biopelícula.

El uso de la zeolita como material soporte para el desarrollo de biopelículas nitrificantes y desnitrificantes ha sido documentado en numerosos estudios. La zeolita cumple una función dual: por una parte, amortigua los picos de concentración de amonio mediante adsorción e intercambio iónico, y por otra, aloja una biopelícula que oxida biológicamente el amonio capturado, regenerando así la capacidad de la zeolita de forma continua (Senila *et al.*, 2022). Esta combinación resulta particularmente ventajosa frente a efluentes con cargas de nitrógeno variables o de choque, ya que confiere estabilidad al proceso al desacoplar la captación del amonio de su oxidación biológica (Chen *et al.*, 2026). Investigaciones sobre la *clinoptilolita* como soporte de comunidades bacterianas para el tratamiento de aguas residuales han confirmado que el material favorece la formación de comunidades microbianas activas y diversas, mejorando el desempeño del sistema (Senila *et al.*, 2022). En el ámbito de la desnitrificación autótrofa vía azufre, se ha demostrado que la incorporación de zeolita en reactores tipo UASB mejora la remoción de nitrógeno y estabiliza el proceso, aprovechando tanto su capacidad de retención de amonio como su rol de soporte de biomasa (Montalvo *et al.*, 2016). En reactores discontinuos secuenciales de biopelícula (SBBR), la zeolita ha sido

evaluada como soporte para procesos combinados de nitrificación y desnitrificación mixotrófica, mostrando que, si bien el desempeño de remoción puede ser comparable al de un sistema sin soporte, la presencia de zeolita influye en la composición y abundancia de la comunidad microbiana, especialmente bajo condiciones dirigidas por azufre (Palominos *et al.*, 2025).

2.4.3 Zeolita chilena: yacimientos, características y disponibilidad

Chile cuenta con yacimientos de zeolitas naturales de origen volcánico, lo que hace de la zeolita chilena un recurso local disponible y económico para aplicaciones ambientales. La caracterización de zeolitas chilenas ha evidenciado que se trata principalmente de *clinoptilolita* y *mordenita*, con propiedades de intercambio iónico adecuadas para la remoción de amonio y de metales de aguas residuales (Curi *et al.*, 2006). El aprovechamiento de este recurso nacional como soporte microbiano representa una ventaja estratégica para el desarrollo de tecnologías de tratamiento en el país, alineándose con el objetivo del proyecto Fondecyt N° 1241199 de emplear zeolita chilena como soporte en procesos de nitrificación parcial y desnitrificación mixotrófica (Palominos *et al.*, 2025). La disponibilidad local reduce los costos de transporte y adquisición, y permite valorizar un mineral abundante en el territorio nacional para el tratamiento de los efluentes de sus propias industrias productivas (Curi *et al.*, 2006).

2.5 La biopelícula en el tratamiento biológico

Una biopelícula corresponde a una comunidad de microorganismos adherida a una superficie e inmersa en una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares, conocidas como EPS. Esta matriz está compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, y cumple funciones esenciales para la estabilidad de la biopelícula, tales como favorecer la adhesión celular, inmovilizar a los microorganismos y facilitar la retención de nutrientes y enzimas extracelulares. De esta manera, la biopelícula constituye una estructura organizada y dinámica que permite el desarrollo de comunidades microbianas complejas sobre superficies sólidas o interfaces líquidas (Flemming *et al.*, 2023).

La formación de una biopelícula ocurre de manera progresiva. Inicialmente, las células planctónicas se adhieren de forma reversible a una superficie; luego, esta unión se vuelve irreversible mediante la producción de EPS. Posteriormente, los microorganismos se agregan

y proliferan formando microcolonias, las cuales maduran hasta generar una estructura tridimensional con canales internos que permiten el transporte de nutrientes y la eliminación de productos metabólicos. Finalmente, parte de la biomasa puede desprenderse, permitiendo la colonización de nuevas superficies (Flemming y Wingender, 2010).

En sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, las biopelículas presentan ventajas frente a la biomasa suspendida. Al crecer adheridos a un soporte, los microorganismos se encuentran más protegidos frente a variaciones de pH, presencia de compuestos tóxicos y cambios bruscos de carga. Además, la inmovilización de la biomasa permite retener microorganismos de crecimiento lento, como bacterias nitrificantes y desnitrificantes autótrofas, reduciendo el riesgo de lavado celular y favoreciendo la estabilidad del proceso (Sam, 2021). Asimismo, el espesor de la biopelícula favorece la formación de gradientes de oxígeno, generando zonas externas aeróbicas e internas anóxicas, condición que permite la coexistencia de procesos como nitrificación y desnitrificación dentro de un mismo sistema (Bazaul, 2007).

2.6 Reactores biológicos utilizados en el tratamiento de aguas residuales (discontinuos y continuos)

2.6.1 Fundamentos y comparación

Los reactores biológicos discontinuos tratan volúmenes definidos de agua residual mediante ciclos secuenciales de llenado, reacción, sedimentación y descarga en un mismo tanque, mientras que los sistemas continuos operan con flujo de entrada y salida permanentes y distribuyen estas etapas en unidades separadas. Esta operación por lotes permite ajustar de manera precisa las condiciones ambientales (aireación, mezcla, presencia o ausencia de oxígeno) en cada fase, ofreciendo una elevada flexibilidad para adaptarse a variaciones de carga y composición del afluente y para implementar procesos avanzados de eliminación de nitrógeno y fósforo (Metcalf y Eddy, 2014).

En los sistemas continuos de crecimiento suspendido, como los reactores completamente mezclados (CSTR) y los sistemas convencionales de lodos activados, la aireación se realiza en un reactor de mezcla completa y la separación sólido-líquido en un clarificador secundario con recirculación de lodos, lo que proporciona una operación relativamente estable, pero requiere mayor número de unidades y presenta menor capacidad de imponer secuencias

controladas de condiciones aeróbicas y anóxicas. En el ámbito anaerobio, tecnologías como los reactores de flujo ascendente (UASB) se basan en un lecho granular donde el tiempo de retención de sólidos es superior al tiempo de retención hidráulico, favoreciendo la formación de consorcios microbianos robustos y la producción de biogás, aunque suelen necesitar etapas aeróbicas posteriores para alcanzar altos niveles de eliminación de nitrógeno (Gandarillas, 2016).

2.6.2 Reactores secuenciales por lotes (SBR)

El reactor secuencial por lotes (SBR) es la configuración más representativa de los sistemas discontinuos de crecimiento suspendido, integrando en un único tanque las etapas que en un sistema convencional se realizan en unidades separadas de aireación y sedimentación. Un ciclo típico comprende las fases de llenado, reacción, sedimentación, descarga y, en algunos casos, reposo, cuya duración relativa define el tiempo de ciclo y los tiempos de retención hidráulico y de sólidos del sistema. Durante la fase de reacción pueden alternarse periodos aeróbicos y anóxicos, o mantenerse condiciones de baja oxigenación, lo que convierte al SBR en una herramienta versátil para implementar procesos de nitrificación–desnitrificación, nitrificación parcial y vías de atajo del nitrógeno mediante el control de oxígeno disuelto, pH, amoníaco libre y ácido nitroso libre (Chernicharo y Bressani Ribeiro, 2023). La posibilidad de programar las fases del ciclo permite adaptar la estrategia de operación del SBR al tipo de efluente y a los objetivos de tratamiento, reduciendo el requerimiento de superficie y simplificando la configuración de la planta frente a sistemas continuos equivalentes. Diversos estudios han mostrado que, con un diseño adecuado de la secuencia de aireación y agitación, los SBR pueden alcanzar altas eficiencias de eliminación de nitrógeno y carbono bajo cargas variables, lo que los hace especialmente atractivos para efluentes industriales (Dutta y Sarkar, 2015).

2.6.3 Reactores discontinuos de biopelícula (SBBR)

El reactor discontinuo secuencial de biopelícula (SBBR) incorpora un material soporte para el desarrollo de biomasa adherida, combinando la flexibilidad del ciclo secuencial con las ventajas propias de los sistemas de biopelícula. Al crecer sobre el soporte (zeolita, medios plásticos u otros), la biomasa se retiene con mayor eficacia y se reduce la dependencia de una buena sedimentabilidad del lodo, lo que favorece la permanencia de microorganismos de

crecimiento lento como las bacterias nitrificantes y determinadas desnitrificantes autótrofas (Souza, 2025).

2.6.4 Estrategias de puesta en marcha

La puesta en marcha de reactores nitrificantes y desnitrificantes es una etapa crítica que determina el éxito posterior del proceso, debido al lento crecimiento de las bacterias autótrofas involucradas (Cao *et al.*, 2017). Las estrategias de *start-up* buscan enriquecer y estabilizar las comunidades microbianas deseadas, controlando cuidadosamente las condiciones ambientales durante las primeras semanas o meses de operación (Peirano *et al.*, 2020). Para establecer la nitrificación parcial vía nitrito, la puesta en marcha suele emplear el incremento gradual de la carga de nitrógeno amoniacal junto con la limitación de oxígeno disuelto y el aprovechamiento de la inhibición por amoníaco libre, de modo de favorecer a las BAO y lavar a las BNO, para la nitrificación total es similar solo que con concentraciones de oxígeno disuelto más elevadas (Galloway *et al.*, 2008). Para la desnitrificación mixotrófica, la puesta en marcha implica la adaptación progresiva de un inóculo a la presencia de donadores de electrones azufrados, permitiendo la transición desde una desnitrificación heterótrofa o autótrofa hacia una condición mixotrófica estable (Peirano *et al.*, 2020).

El uso de un soporte como la zeolita durante la puesta en marcha puede acelerar la colonización microbiana y aportar estabilidad frente a las fluctuaciones iniciales, al retener biomasa y amortiguar las concentraciones de amonio (Senila *et al.*, 2022). El rediseño de la configuración del reactor y de su estrategia operacional entre campañas sucesivas —por ejemplo, al transitar desde una operación vía nitrito hacia una vía nitrato, o al incorporar zeolita como soporte— constituye una decisión de diseño que impacta directamente en la rapidez y robustez de la puesta en marcha (Palominos *et al.*, 2025), y es precisamente uno de los ejes comparativos de la presente investigación.

2.7 Parámetros operacionales críticos

2.7.1 Temperatura

La temperatura afecta directamente las velocidades de reacción y la competencia entre los grupos microbianos, por lo que es uno de los parámetros operacionales más relevantes en procesos de nitrificación. Dentro del rango mesófilo, las bacterias nitrificantes presentan una

actividad óptima aproximadamente entre 25 y 30 °C, donde se observan tasas altas de conversión de amonio sin efectos significativos de inhibición térmica, mientras que por debajo de 15 °C su metabolismo se ralentiza y, bajo 10 °C, la nitrificación puede prácticamente detenerse (Alisawi, 2020). Durante la operación de los reactores se mantuvo un rango de temperatura entre los 29 ± 1 °C.

2.7.2 pH y equilibrios de amoníaco libre y ácido nitroso libre

El pH determina tanto la actividad de las bacterias nitrificantes como la formación de especies inhibitorias (amoníaco libre NH_3 y ácido nitroso libre HNO_2).

En condiciones habituales de operación, la nitrificación se mantiene estable en un rango aproximado de pH 7,0–8,0, donde se limita la presencia de HNO_2 y se evita una acumulación excesiva de NH_3 que pueda inhibir a las bacterias. En ese intervalo, la fracción de amoníaco libre es lo suficientemente baja como para no afectar de manera significativa a las BAO, pero puede acercarse al umbral de inhibición de las BNO, lo que se aprovecha en procesos de nitrificación parcial vía nitrito.

Según Anthonisen (Anthonisen *et al.*, 1976), la inhibición de las BNO comienza cuando la concentración de NH_3 se sitúa alrededor de 0,1–1,0 mg N- NH_3 /L, mientras que las BAO requieren concentraciones mucho mayores, del orden de 10–150 mg N- NH_3 /L, lo que permite ajustar pH, amonio y temperatura para inhibir selectivamente a las BNO y acumular nitrito. De forma complementaria, el ácido nitroso libre se vuelve relevante a pH más bajos; en el rango 0,2–2,8 mg N- HNO_2 /L puede inhibir la actividad nitrificante, por lo que valores de pH claramente por debajo de 7 tienden a ser desfavorables para una nitrificación eficiente si no se controlan las concentraciones de nitrito. Para términos de esta investigación los niveles de pH se mantuvieron entre 7,2 y 7,6 dependiendo de la etapa del proceso.

2.7.3 Oxígeno disuelto: selección BAO/BNO y rol en la SND

El oxígeno disuelto (OD) es el aceptor de electrones clave de la nitrificación y, al mismo tiempo, una herramienta de selección entre bacterias amonio-oxidantes (BAO) y nitrito-oxidantes (BNO). Para nitrificación se recomienda operar con OD en torno a 3–4 [mg/L], evitando valores inferiores a 0,5 mg/L, que inhiben fuertemente la oxidación de amonio y nitrito (Rodríguez *et al.*, 2014). En nitrificación parcial se emplean deliberadamente concentraciones de OD más bajas, típicamente alrededor de 1,0 –2,5 mg/L

(Guo *et al.*, 2009), de modo que las BAO, más tolerantes a condiciones microaeróbicas, sigan oxidando amonio mientras se limita la actividad de las BNO y se acumula nitrito. En sistemas con biopelícula, estos niveles de OD, combinados con la difusión limitada de oxígeno en el espesor del biofilm, generan microzonas externas aeróbicas e internas anóxicas que permiten la nitrificación en la periferia y la desnitrificación simultánea en el interior, constituyendo la base de la nitrificación-desnitrificación simultánea (SND) (Espinosa-Ortiz *et al.*, 2023).

2.7.4 Relación C/N

La relación carbono/nitrógeno (C/N) determina la disponibilidad de materia orgánica como fuente de carbono y donador de electrones para la desnitrificación heterótrofa. Cuando esta relación es baja, la reducción de nitrato o nitrito puede ser incompleta, favoreciendo la acumulación de especies nitrogenadas oxidadas. En cambio, un exceso de carbono puede aumentar la producción de biomasa y los costos operacionales asociados a la adición de sustratos externos (Metcalf y Eddy, 2014). En sistemas de nitrificación-desnitrificación simultánea y en procesos mixotróficos, la relación C/N también influye en el equilibrio entre las rutas heterótrofas y autótrofas. Una baja disponibilidad de carbono favorece el uso de compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones, mientras que una mayor disponibilidad de materia orgánica incrementa la participación de la vía heterótrofa. Por ello, el control de esta relación permite orientar el proceso según las características del efluente y los objetivos de remoción (Flemming *et al.*, 2023). Para términos de la investigación, se utilizó una razón C/N de 2

2.7.5 Relación S/N

La relación azufre/nitrógeno (S/N) es un parámetro clave en la desnitrificación autótrofa y mixotrófica, ya que define la disponibilidad de compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones para la reducción de nitrato o nitrito. Un déficit de azufre puede limitar la desnitrificación y generar acumulación de especies nitrogenadas, mientras que un exceso puede incrementar la producción de sulfato y afectar la alcalinidad del sistema (Di Capua *et al.*, 2019). En procesos mixotróficos, la relación S/N debe evaluarse junto con la relación C/N, debido a que ambas regulan la contribución relativa de las vías autótrofa y heterótrofa. Un balance adecuado entre carbono orgánico y azufre reducido favorece la remoción conjunta de nitrógeno, azufre y materia orgánica, evitando acumulación de

intermediarios y mejorando la estabilidad operacional (Peirano *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2015). Para términos de la investigación, se utilizó una razón S/N de 1.5.

2.7.6 Tiempo de retención hidráulico (TRH)

Es el tiempo medio que el agua residual permanece en el reactor. El TRH se mantuvo fijo tanto en el proceso de nitrificación como el de desnitrificación correspondiendo a un día por fase y por ende dos días por ciclo.

2.8 Evaluación del desempeño microbiano

2.8.1 Ensayos de actividad desnitrificante heterótrofa (ADH) y autótrofa (ADA)

Permiten evaluar la capacidad de la biomasa para reducir nitrato o nitrito bajo condiciones controladas. En la actividad desnitrificante heterótrofa (ADH), la reducción de las especies nitrogenadas ocurre utilizando materia orgánica como donador de electrones, mientras que en la actividad desnitrificante autótrofa (ADA) se emplean compuestos inorgánicos reducidos, principalmente especies sulfuradas como sulfuro, azufre elemental o tiosulfato (Di Capua *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2015).

Estos ensayos resultan relevantes en sistemas mixotróficos, ya que permiten diferenciar la contribución relativa de las rutas heterótrofa y autótrofa en la remoción de nitrógeno. La comparación entre ADH y ADA entrega información sobre la adaptación metabólica del consorcio microbiano y permite interpretar si la desnitrificación está asociada principalmente al uso de carbono orgánico, compuestos reducidos de azufre o una combinación de ambos. En el contexto de reactores orientados a la remoción simultánea de nitrógeno, azufre y materia orgánica, la determinación de estas actividades constituye una herramienta complementaria al seguimiento fisicoquímico del proceso. Su aplicación permite evaluar la estabilidad y el desempeño del sistema en la etapa desnitrificante (Palominos *et al.*, 2025).

Capítulo 3: Materiales y Métodos

3.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental se estructuró en dos etapas, definidas de acuerdo con la ruta de nitrificación que se buscó favorecer. En ambas se evaluaron un reactor control sin material de soporte (RC) y un reactor con zeolita (RZ). Cada ciclo operacional comprendió una fase aerobia destinada a la oxidación del nitrógeno amoniacal, seguida de una fase anóxica orientada a la reducción de nitrito y nitrato mediante desnitrificación mixotrófica. La primera etapa estuvo orientada a la nitrificación parcial vía nitrito, mientras que la segunda se enfocó en la nitrificación total vía nitrato y se desarrolló utilizando la configuración posterior al rediseño de los reactores.

3.1.1 Etapa orientada a la nitrificación parcial vía nitrito y desnitrificación mixotrófica

Esta etapa tuvo una duración de 98 días y estuvo orientada a favorecer la oxidación del nitrógeno amoniacal hasta nitrito, limitando su transformación posterior a nitrato. Cada ciclo comenzó con la incorporación de 1 L de afluente sintético nitrificante. La fase nitrificante contempló 12 h de aireación continua, seguidas de un periodo de 10 h sin aireación y con agitación mecánica, destinado a disminuir la concentración de oxígeno disuelto antes de la sedimentación y el vaciado. Posteriormente, se desarrolló la fase anóxica de desnitrificación mixotrófica. En esta fase se incorporaron acetato de potasio y sulfuro de sodio como donadores de electrones orgánico e inorgánico, respectivamente, con el propósito de favorecer la reducción de nitrito y nitrato mediante la acción conjunta de microorganismos desnitrificantes heterótrofos y autótrofos. La reacción anóxica se mantuvo durante 24 h bajo agitación mecánica.

La secuencia definida para esta etapa respondió a la necesidad de establecer, dentro de un mismo ciclo, condiciones diferenciadas para la oxidación parcial del amonio y para la reducción posterior de nitrito y nitrato. En este contexto, el periodo intermedio sin aireación tuvo como finalidad disminuir el oxígeno disuelto remanente antes del inicio de la fase anóxica, contribuyendo así a generar un ambiente más adecuado para la desnitrificación.

En la Tabla 3.1 se dispone la duración de cada etapa correspondiente al régimen de operación:

Tabla 3.1. Distribución temporal del ciclo operacional durante ambas etapas. Fuente: Elaboración propia, adaptado de (Souza, 2025).

Etapas	Tiempo [h]
Llenado	0,05
Nitrificación	12
Caída de OD	10
Sedimentación	0,5
Vaciado	0,05
Llenado	0,05
Desnitrificación	24
Sedimentación	0,5
Vaciado	0,05
Duración ciclo	47,2

3.1.2 Etapa orientada a la nitrificación parcial vía nitrato y desnitrificación mixotrófica

Esta etapa tuvo una duración de 60 días y estuvo orientada a promover la oxidación sucesiva del nitrógeno amoniacal hasta nitrato. Para ello, se utilizó la configuración posterior al rediseño de los reactores y se mantuvieron condiciones de aireación destinadas a favorecer la actividad conjunta de las bacterias oxidantes de amonio y de las bacterias oxidantes de nitrito. Una vez concluida la fase nitrificante, las concentraciones de nitrito y nitrato generadas se utilizaron para determinar las dosis requeridas de acetato de potasio y sulfuro de sodio. Posteriormente, se desarrolló la fase anóxica de desnitrificación mixotrófica bajo agitación mecánica, evaluándose la reducción de las especies nitrogenadas oxidadas y el consumo de los donadores de electrones adicionados. Cabe destacar que la distribución temporal de esta estrategia es la misma que en la etapa orientada a la nitrificación parcial (Tabla 3.1). En términos operacionales, esta etapa correspondió a la puesta en marcha del sistema bajo una ruta de nitrificación total vía nitrato.

3.1.3 Puntos de muestreo y criterios de dosificación

En ambas etapas experimentales se tomaron muestras al inicio y al término de las fases nitrificante y desnitrificante. Durante la fase nitrificante se determinaron las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato, con el propósito de evaluar la oxidación del nitrógeno amoniacal y la generación de especies nitrogenadas oxidadas. Durante la fase desnitrificante se

analizaron nitrito, nitrato, sulfuro, sulfato, carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total. El pH y el oxígeno disuelto en la primera etapa se registraron de manera puntual al inicio y al término de las fases correspondientes, en la segunda etapa, el oxígeno disuelto se logró registrar de manera continua durante la fase aerobia gracias a cambios en el rediseño del reactor. Los métodos analíticos empleados y la frecuencia de medición se resumen en la Tabla 3.2, mientras que los procedimientos de cálculo correspondientes a cada parámetro se presentan en el Anexo, de acuerdo con lo establecido en el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017).

Tabla 3.2. Parámetros y procedimientos de medición. Fuente: Elaboración propia.

Parámetro	Analito	Método analítico	Frecuencia	Referencia
Compuestos nitrogenados	NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-	Espectrofotometría	Cada día	(APHA, 2017)
Compuestos Azufrados	SO_4^{2-} , S^{2-}	Espectrofotometría y electrodo	Cada día, etapa desnitrificación	-
Potencial de hidrógeno	pH	Electrodo selectivo	Cada día	(APHA, 2017)
Oxígeno disuelto	OD	Electrodo selectivo	Continua durante etapa aeróbica	-
Sólidos suspendidos totales y volátiles	SST y SSV	Gravimetría	Cada 7 días	(APHA, 2017).

Las dosis de acetato de potasio y sulfuro de sodio se calcularon a partir de la concentración total de nitrito y nitrato medida al término de la fase nitrificante. Se utilizaron relaciones C/N de 2 y S/N de 1,5, con el propósito de aportar carbono orgánico y azufre reducido como donadores de electrones para las rutas heterótrofa y autótrofa de la desnitrificación mixotrófica, respectivamente. En la dosificación de sulfuro de sodio se incorporó un 60 % adicional para compensar la pureza del reactivo y las pérdidas asociadas a su volatilización.

3.2 Reactores utilizados en cada etapa.

3.2.1 Descripción general de los reactores y uso de zeolita

Se utilizaron dos reactores biológicos secuenciales por lotes, con un volumen efectivo de 1,5 L. El reactor control (RC) operó sin material de soporte, mientras que al reactor RZ se le incorporó zeolita natural como soporte para el desarrollo de biomasa adherida. Ambos sistemas contaron con mecanismos de aireación, agitación mecánica, alimentación, toma de muestras, descarga del sobrenadante y purga de lodos.

La zeolita utilizada provino de la Región del Maule y correspondió principalmente a una mezcla de *clinoptilolita* y *mordenita*. Previo a su incorporación, el material fue molido y tamizado hasta alcanzar un tamaño promedio de 1 mm, y posteriormente se secó a 105 °C durante 48 h con el fin de eliminar humedad y estandarizar sus condiciones de uso. En el RZ se adicionaron 15 g de zeolita/g SSV. Sus propiedades mineralógicas, capacidad de intercambio catiónico y aplicaciones en el tratamiento biológico se describen con mayor detalle en anexo C.

3.2.1 Configuración utilizada en la etapa vía nitrito

Durante la etapa orientada a la nitrificación parcial vía nitrito se utilizaron dos reactores cilíndricos de vidrio ámbar, con un volumen efectivo de operación de 1,5 L. Cada reactor contó con salidas inferiores destinadas a la descarga del sobrenadante tratado, toma de muestras y purga de lodos, además de una abertura superior para la alimentación del sistema y la medición de oxígeno disuelto. La aireación se realizó mediante difusores cerámicos porosos ubicados en el fondo del reactor, alimentados por una bomba de aire, mientras que la homogenización del licor mezcla se efectuó mediante agitación mecánica, la aireación permitió mantener concentraciones de oxígeno disuelto entre 4 y 6 mg O₂/L durante la fase aeróbica, y la agitación se mantuvo entre 90 y 105 rpm, destinada a mantener homogéneo el licor de mezcla y favorecer el contacto entre la biomasa y los sustratos. Los reactores se ubicaron dentro de una cámara de poliestireno expandido, con el propósito de reducir las variaciones de temperatura y aislarlos de las condiciones ambientales externas.



Figura 3.1. Disposición de los reactores para las mediciones durante etapa orientada a la nitrificación parcial.

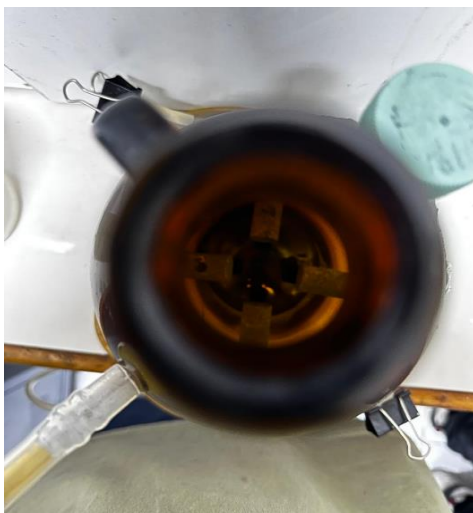


Figura 3.1. Vista superior del interior de uno de los reactores utilizados durante la etapa orientada a la nitrificación parcial.

3.2.2 Configuración utilizada en la etapa vía nitrato

Antes de iniciar la etapa orientada a la nitrificación total vía nitrato, se modificó la configuración de los reactores considerando las recomendaciones de Souza (2025). La nueva configuración contempló el uso de reactores transparentes, lo que permitió observar con mayor claridad el comportamiento del licor de mezcla y detectar posibles fugas durante la operación. En la tapa de cada reactor se incorporó un orificio de carga de aproximadamente 3 cm de diámetro, destinado a facilitar la alimentación del sistema, junto con un puerto independiente de entre 2 y 3 cm de diámetro para la instalación del medidor de oxígeno disuelto (OD). Estas modificaciones mejoraron el acceso al interior del reactor y facilitaron el seguimiento de las variables operacionales. Asimismo, los difusores de piedra porosa se ubicaron aproximadamente a 4,5 cm de la base de cada reactor, con el propósito de mejorar la distribución del aire durante la fase aerobia y favorecer una mezcla más homogénea. En las conexiones de entrada de aire se instalaron acoples rápidos, destinados a facilitar el montaje y desmontaje de las líneas de suministro, disminuir las fugas y mantener una aireación más estable durante la operación. El rediseño también incluyó salidas laterales independientes para la evacuación de gases, la descarga del sobrenadante tratado y la purga de lodos. En conjunto, estas modificaciones facilitaron las labores de alimentación, muestreo y mantenimiento, además de mejorar el control operacional y las condiciones para el

seguimiento experimental. La Figura 3.3 presenta el esquema técnico utilizado para la confección de los reactores.

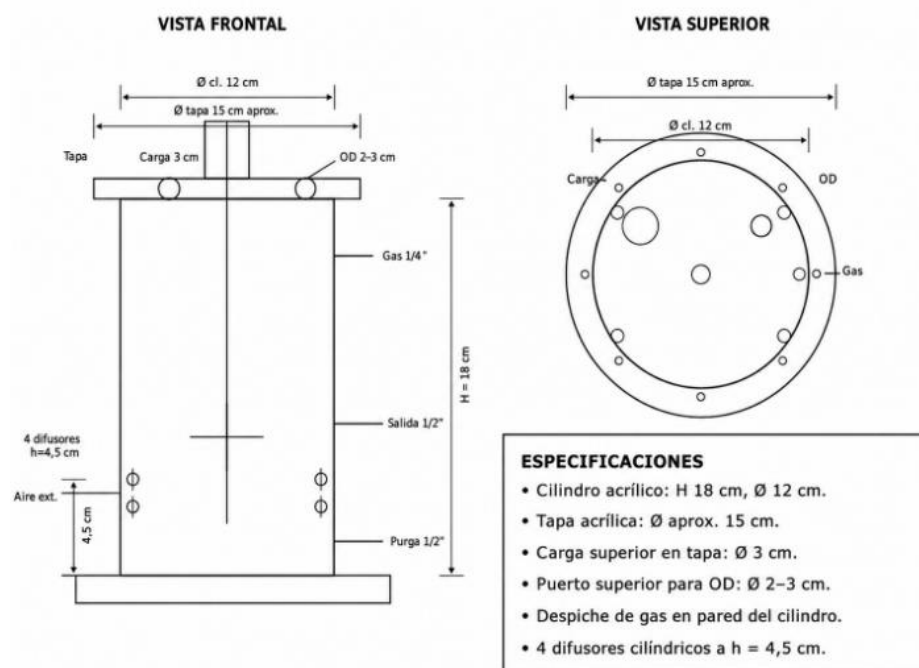


Figura 2.3. Esquema de rediseño.

Una vez incorporadas las modificaciones descritas, se realizaron pruebas hidráulicas como se observa en la Figura 3.4.



Figura 3.4. Prueba hidráulica aplicada a los reactores rediseñados con el fin de verificar la hermeticidad del sistema antes de su operación experimental.

Posteriormente, se incorporaron los inóculos correspondientes: lodo sin zeolita en el reactor RC y lodo con zeolita en el reactor RZ. Finalmente, ambos reactores se instalaron en la cámara de poliestireno expandido utilizada previamente, con el propósito de reducir las variaciones de temperatura durante la operación. La configuración final del sistema posterior al rediseño se presenta en la Figura 3.5.



Figura 3.5. Configuración del rediseño de reactores.

Con el propósito de sintetizar las modificaciones incorporadas en el rediseño, en la Tabla 3.3 se comparan las principales características de las dos configuraciones utilizadas.

Tabla 3.3. Comparación de las configuraciones de los reactores utilizadas durante las etapas vía nitrito y vía nitrato. Fuente: Elaboración propia.

Criterio de comparación	Configuración inicial	Configuración posterior al rediseño
Material del reactor	Vidrio ámbar	Acrílico
Sistema de aireación	Difusores en el fondo	Difusores elevados a 4,5 cm
Entrada de aire	Conexiones convencionales	Acoples rápidos
Medición de oxígeno disuelto	Medición puntual	Puerto superior para medición continua
Observación del proceso	Visibilidad limitada	Mejor observación de mezcla y posibles fugas

3.3 Inóculos y sustratos utilizados en cada etapa.

3.3.1 Inóculo

Durante la etapa orientada a la nitrificación parcial vía nitrito se mantuvo la biomasa presente en los reactores RC y RZ, proveniente de la operación experimental desarrollada previamente por Souza (2025). Originalmente, cada reactor había sido inoculado con 500 mL de una mezcla constituida por un 70 % de lodo nitrificante y un 30 % de lodo desnitrificante, equivalentes a 350 y 150 mL, respectivamente.

Para iniciar la etapa orientada a la nitrificación total vía nitrato, cada reactor fue reinoculado con 500 mL de una nueva mezcla de lodos, preparada conservando la proporción de 70 % de lodo nitrificante y 30 % de lodo desnitrificante. Adicionalmente, se incorporaron 100 mL de biomasa remanente de la etapa anterior. Esta biomasa se mantuvo separada según su reactor de procedencia; es decir, el remanente del RC se reincorporó al reactor control y el correspondiente al RZ se añadió al reactor con zeolita. De esta manera, cada sistema recibió un volumen total de 600 mL de inóculo, permitiendo conservar parte de la biomasa previamente adaptada a sus respectivas condiciones operacionales.

Al inicio de la etapa vía nitrato, se determinó la concentración de sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles en ambos reactores, con el fin de caracterizar la biomasa inicial disponible para el proceso. Los resultados se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Concentración de solidos a inicios de etapa B. Fuente: Elaboración propia

Parámetro	RC	RZ
SST mg/L	17788	9077
SSV mg/L	11600	4566

3.1.2 Sustrato

En la operación de los reactores se utilizó una alimentación sintética preparada con el propósito de simular las características de un residuo industrial líquido proveniente del sobrenadante de un digestor anaerobio, donde la alimentación de bicarbonato de sodio se realiza según la relación estequiométrica de la reacción de nitratación. (Bellenger, 2023). La composición de la alimentación se presenta en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Composición del RIL en etapa nitrificante. Fuente: adaptado de (Bellenger, 2023)

Compuesto	Fórmula	Concentración g/L
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	0,1-0,3
Fosfato dipotásico	K ₂ HPO ₄	3,685
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	9,21
Cloruro de sodio	NaCl	0,2
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	0,312-0,936

De forma complementaria, se adicionó 1 mL/L de solución de micronutrientes nitrificantes, con el propósito de aportar elementos traza necesarios para el desarrollo de la biomasa. La composición de esta solución se detalla en la Tabla 3.6. Esta suplementación permitió mantener la disponibilidad de cofactores esenciales para las rutas metabólicas involucradas en la oxidación biológica del amonio.

Tabla 3.6. Composición de micronutrientes en etapa nitrificante. Fuente: (Bellenger, 2023)

Compuesto	Fórmula	Concentración g/L
EDTA	—	5,0
Cloruro férrico	FeCl ₃ ·6H ₂ O	5,0
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,6
Cloruro de manganeso	MnCl ₂ ·4H ₂ O	5,0
Sulfato de cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,5
Cloruro de calcio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5,5
Molibdato de amonio	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1,1
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ ·5H ₂ O	5,0

Asimismo, al igual que en la etapa nitrificante, se incorporó 1 mL de solución de micronutrientes específicos para desnitrificación, con el fin de favorecer la actividad metabólica de la biomasa y contribuir a la eficiencia del proceso. La composición del sustrato y de la solución de micronutrientes utilizados en la etapa anóxica se presenta en las Tablas 3-4 y 3-5, respectivamente.

Tabla 3.7. Composición de RIL en etapa desnitrificante. Fuente: (Souza, 2025)

Compuesto	Fórmula	Concentración g/L
Acetato de potasio	CH ₃ CO ₂ K	Variable*
Sulfuro de sodio	Na ₂ S	Variable*
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	1,5
Fosfato dipotásico	K ₂ HPO ₄	2,3
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	5,75

Tabla 3.8. Composición de micronutrientes desnitrificantes. Fuente: (Souza, 2025)

Compuesto	Fórmula	Concentración g/L
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
Sulfato ferroso (I) heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
Cloruro de zinc	ZnCl_2	1,0
Carbonato de calcio	CaCO_3	2,0
Tetrahidrato de cloruro de magnesio (II)	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,5
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
Ácido clorhídrico	HCl (37%)	50
Cloruro de níquel (II) hexahidratado	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
Ácido bórico	H_3BO_3	0,25

3.1.3 Zeolita

Para la operación experimental se utilizó zeolita natural proveniente de la Región del Maule. Previo a su incorporación al sistema, el material fue molido y tamizado hasta obtener un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. Posteriormente, la zeolita fue secada en estufa a 105 °C durante 48 horas,

Durante la etapa de armado al reactor con soporte (RZ) se le adicionó zeolita en una proporción de 15 g de zeolita por g de sólidos suspendidos volátiles (SSV), mientras que el reactor control (RC) se mantuvo sin adición de material soporte.

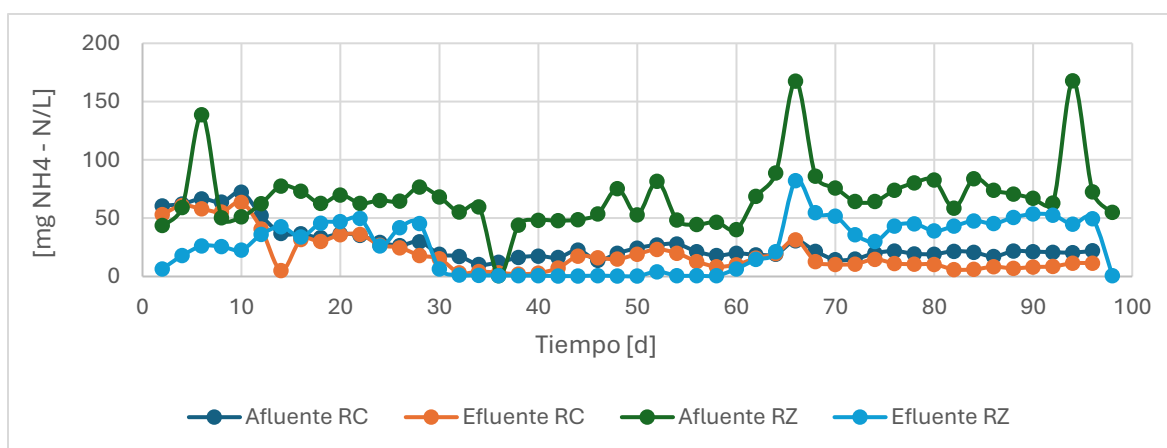
Capítulo 4: Resultados y Discusión:

4.1 Nitrificación-Desnitrificación

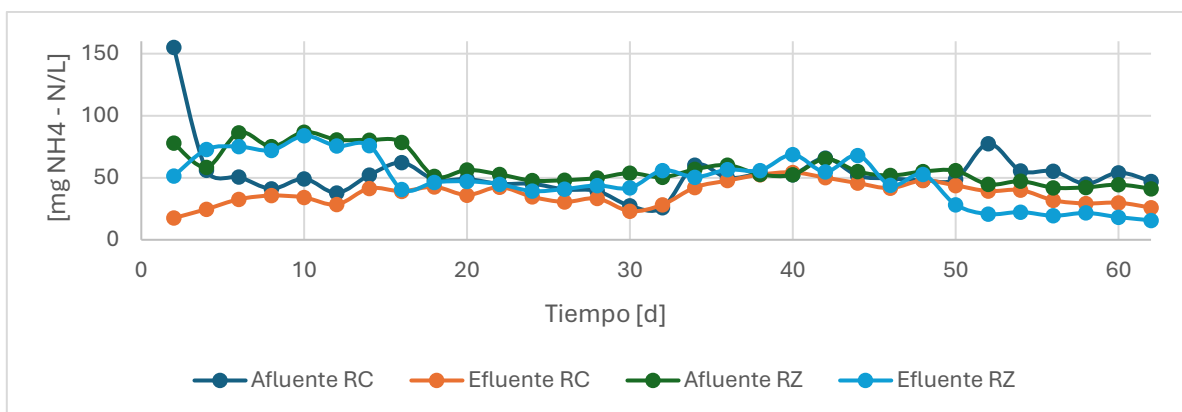
El desempeño de los reactores RC y RZ se analizó separadamente durante las Etapas A y B, orientadas a la nitrificación parcial vía nitrito y a la puesta en marcha de la nitrificación total vía nitrato, respectivamente. En ambas etapas se evaluó la oxidación aerobia del amonio y la posterior reducción anóxica del nitrito y nitrato mediante desnitrificación mixotrófica. Asimismo, se analizó la generación de sulfato como producto de la oxidación autótrofa del sulfuro empleado como donador de electrones, debido a que esta especie presenta un menor impacto que el sulfuro al momento de la descarga.

4.1.1 Actividad nitrificante

Para evaluar el comportamiento de la etapa nitrificante, se determinaron las concentraciones de los principales compuestos nitrogenados mediante las metodologías analíticas descritas en los Anexos. Estos parámetros permitieron realizar el seguimiento de la oxidación del amonio y analizar su transformación hacia especies nitrogenadas oxidadas durante la operación de los reactores. En la Figura 4.1 se presenta la evolución de la concentración de amonio en ambas etapas, lo que permite comparar la respuesta operacional del reactor control y del reactor con zeolita a lo largo del periodo experimental.



(a)



(b)

Figura 4.1. Concentración de amonio en el sistema en etapa vía nitrito (a) y vía nitrato (b).

En la etapa A, los mayores porcentajes de oxidación de amonio se registraron entre los días 30 y 50 en ambos reactores, alcanzando valores máximos de 82 y 98 % para RC y RZ respectivamente, lo que representa actividad de las BAO en la conversión del amonio presente en el sistema, la diferencia entre estos se asocia con la presencia de biomasa adherida en el soporte, la cual favorece la retención de microorganismos nitrificantes y contribuye a la oxidación del amonio dentro del sistema (Palominos *et al.*, 2025). La carga alimentada durante estos días fue de $14,71 \pm 3,33$ mg NH₄ - N/L para RC y de $54,02 \pm 9,25$ mg NH₄ - N/L para RZ.

En la etapa B, los mayores porcentajes de oxidación de amonio se concentraron al final de esta etapa, entre los días 50 y 60 en ambos reactores, alcanzando valores máximos de 35 y 43 % para RC y RZ respectivamente. En particular, las bacterias nitrificantes presentan bajas tasas de crecimiento (Zhang *et al.*, 2022), por lo que su recuperación después de una perturbación puede ser lenta. La tendencia observada durante esta etapa es coherente con dicho comportamiento, puesto que al comienzo no se evidenció una actividad nitrificante regular, mientras que hacia el final se registró un incremento en los porcentajes de oxidación. La carga alimentada en este periodo fue de $50,67 \pm 5,75$ mg NH₄ - N/L en ambos reactores.

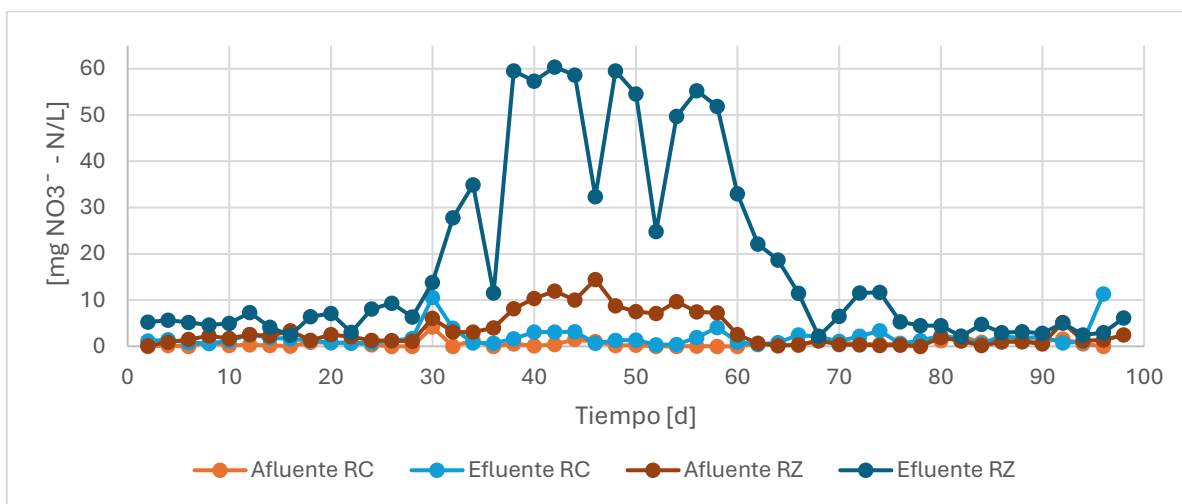
Tabla 4.1. Ciclos de máxima oxidación de amonio registrados en los reactores RC y RZ en las etapas A y B.

Reactor-Etapa	Día	% de oxidación	Carga inicial → final [mg/L]
RC-A	38	81,8	16,33 → 2,98
RZ-A	40	98,5	48,31 → 0,74
RC-B	52	35,8	77,41 → 49,66
RZ-B	56	43,0	42,03 → 23,97

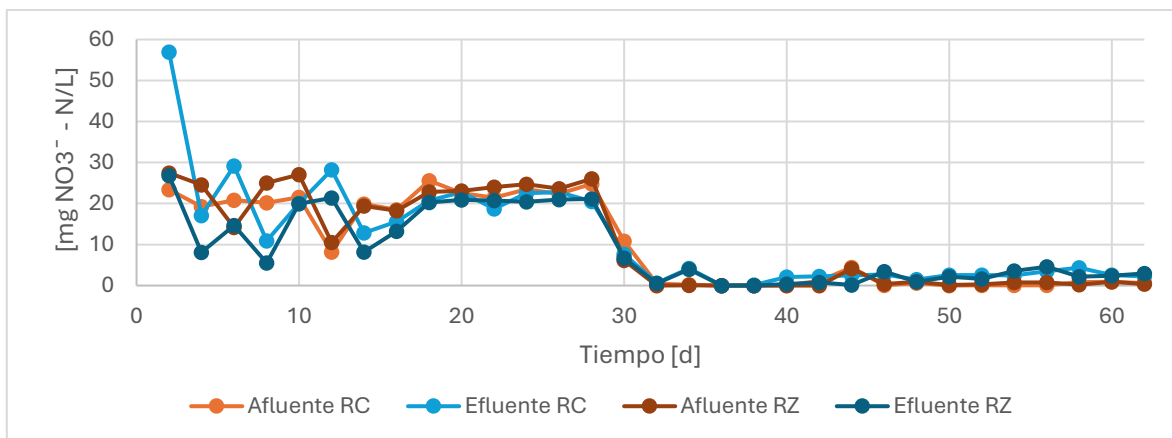
En la nitrificación parcial (etapa A), el objetivo principal es favorecer la oxidación del amonio hasta nitrito, promoviendo la acumulación de esta especie dentro del sistema y limitando la oxidación posterior hacia nitrato. Para ello, se busca favorecer la actividad de las BAO y restringir el desarrollo o actividad de las BNO. En cambio, durante la nitrificación total (etapa B), se busca la oxidación completa del amonio hasta nitrato, por lo que resulta necesario que ambas etapas del proceso nitrificante se desarrollen adecuadamente: primero la conversión de amonio a nitrito por parte de las BAO y, posteriormente, la oxidación de nitrito a nitrato por las BNO.

La diferencia entre ambas modalidades depende del control de variables operacionales como la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno disuelto, ya que estos parámetros influyen directamente sobre la actividad y competencia entre los grupos microbianos nitrificantes. Por ello, el análisis de especies nitrogenadas resulta clave para distinguir si el sistema tendió hacia una nitrificación parcial o hacia una nitrificación total, así como para identificar posibles limitaciones asociadas a la estabilidad del consorcio nitrificante.

El comportamiento del nitrato y nitrito en la fase aerobia se ve representado en las Figura 4.2 y 4.3 respectivamente:



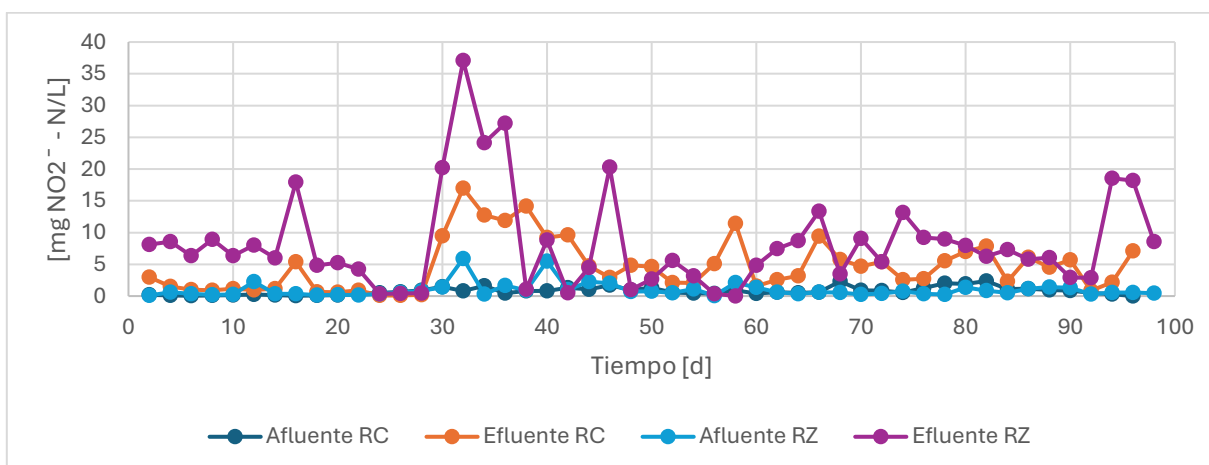
(a)



(b)

Figura 4.2. Comportamiento del nitrato durante fase aerobia en etapa vía nitrato (a) y vía nitrato (b).

En la etapa A la mayor formación de nitrato en RZ se concentró entre los días 38 y 44, a pesar de que en esta etapa se buscaba favorecer la generación de nitrito, este es un indicio de que las BAO y BNO presentaron coexistencia durante este periodo, lo que generó un aumento de 10,10 a 58,98 mg NO_3^- - N/L. Por parte de RC la mayor generación de nitrato se registró en el día 30 aumentando de 4,17 a 10,59 mg NO_3^- - N/L. En cambio, en la etapa B el resultado más representativo para RC ocurrió en el día 12, en dicho ciclo, el nitrato aumentó desde 8,302 hasta 28,255 mg N/L. Para RZ la mayor formación de nitrato acompañada por una disminución de amonio se registró en el día 34 y aumentó de 0,09 a 3,89 mg N/L.



(a)

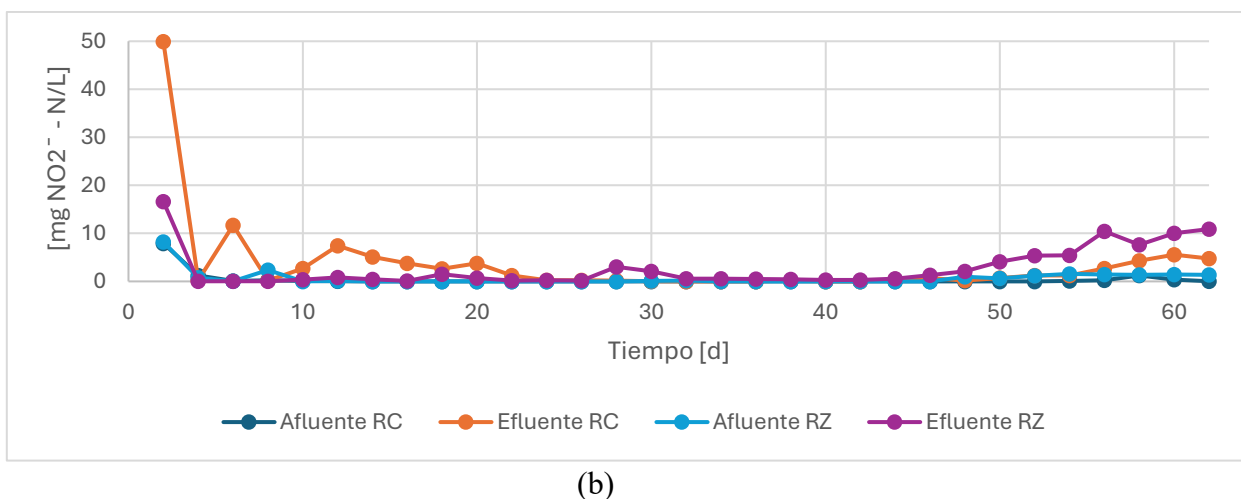


Figura 4.3. Comportamiento del nitrato durante fase aerobia en etapa vía nitrato (a) y vía nitrato (b).

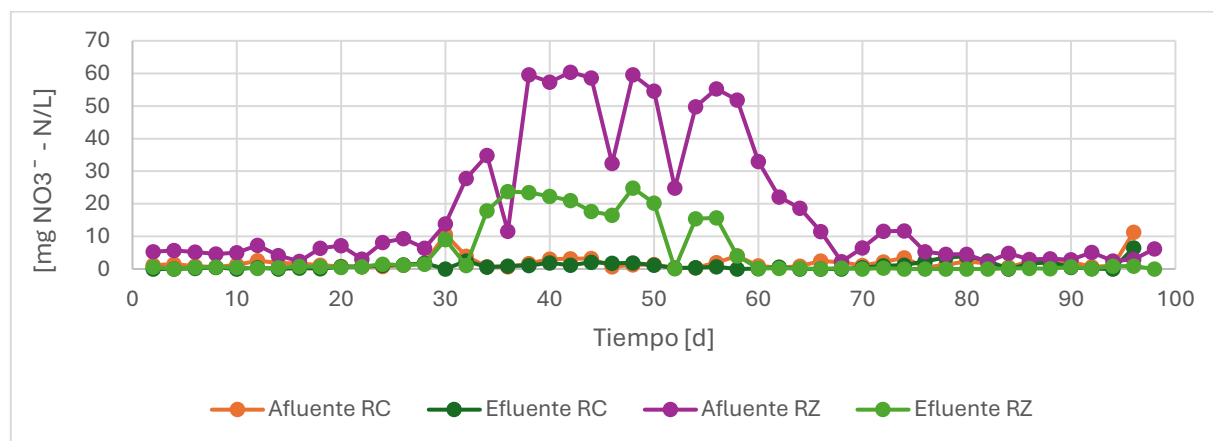
Durante la etapa A, se observó formación neta de nitrato durante la fase aerobia en 45 de los 48 ciclos de RC y en 44 de los 48 ciclos de RZ. Las mayores acumulaciones se registraron en el día 32. En RC, el nitrato aumentó desde 0,779 hasta 16,977 mg N-NO₃⁻/L, correspondiente a una formación neta de 16,197 mg N-NO₃⁻/L. En RZ aumentó desde 5,906 hasta 37,066 mg N-NO₃⁻/L. En la etapa B, excluyendo el primer ciclo de RC debido a su carga inicial atípicamente elevada de amonio, el resultado más representativo ocurrió el día 6, cuando el nitrato aumentó desde 0,13 hasta 11,70 mg NO₃⁻-N/L. En RZ, la mayor formación se concentró al final de la etapa, entre los días 56 y 62, alcanzándose el día 62 un aumento desde 1,77 hasta 11,79 mg NO₃⁻-N/L. Debido a que esta etapa buscaba favorecer la formación de nitrato, la acumulación final de nitrato indica que su oxidación posterior no se mantuvo estable, particularmente en RZ, lo que sugiere un desequilibrio entre la actividad de las BAO y BNO después del rediseño.

En conjunto, la respuesta de los reactores no coincidió de manera estable con la estrategia prevista para cada etapa. Durante la etapa vía nitrato se observaron acumulaciones puntuales de nitrato, especialmente en RZ; sin embargo, su alta variabilidad impidió confirmar una nitrificación parcial controlada. Del mismo modo, en la etapa rediseñada vía nitrato no se registró una formación sostenida de nitrato que permitiera establecer una nitrificación total estable. Este comportamiento podría relacionarse con la reinoculación, las modificaciones del sistema y la falta de acondicionamiento previo de la biomasa nitrificante, factores que habrían limitado la adaptación y el equilibrio entre BAO y BNO. Por ello, los ciclos

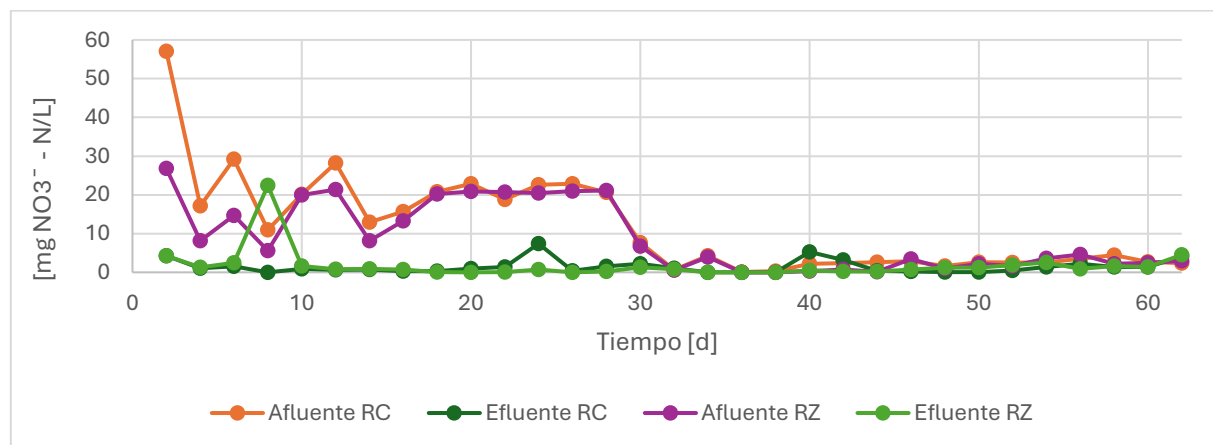
posteriores al rediseño pueden interpretarse principalmente como una fase de reactivación y adaptación del sistema.

4.1.2 Actividad desnitrificante

La actividad desnitrificante fue evaluada mediante la comparación entre las concentraciones de NO_3^- -N y NO_2^- -N registradas al término de la etapa nitrificante (afluente) y aquellas obtenidas al final de la etapa anóxica (efluente), tal como se presenta en las Figuras 4.4 y 4.5. Esta comparación permitió estimar la capacidad de los reactores para reducir las especies nitrogenadas oxidadas generadas durante la fase aeróbica.



(a)



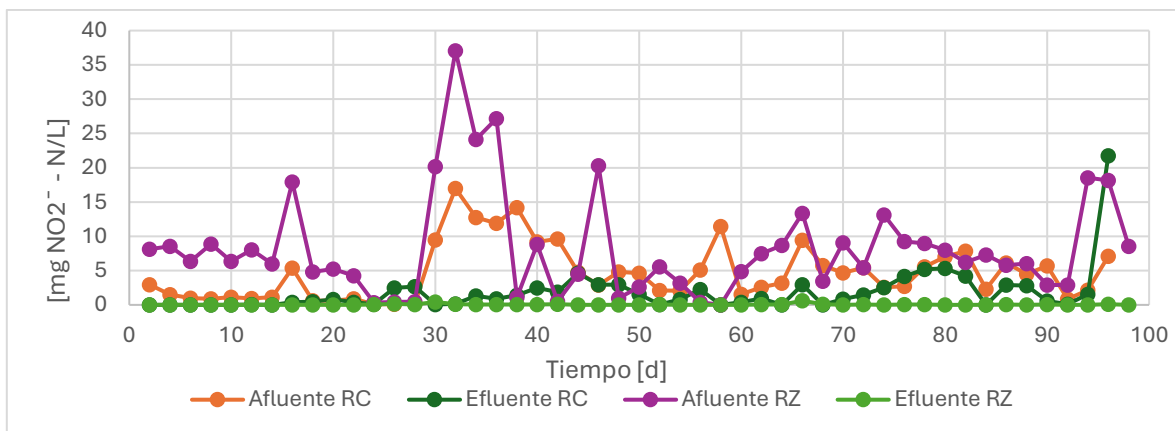
(b)

Figura 4.4. Comportamiento del nitrato durante fase anóxica en etapa vía nitrito (a) y vía nitrato (b).

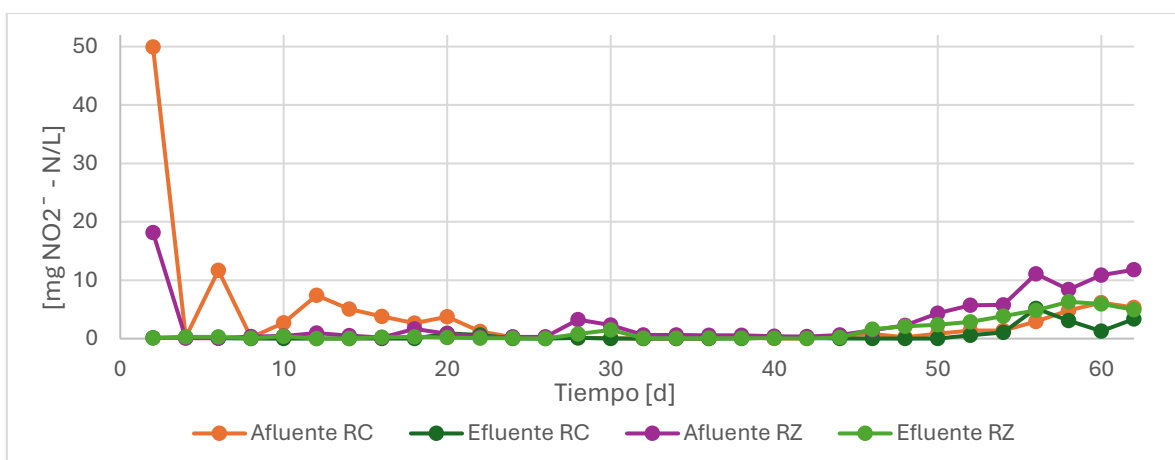
Durante la etapa A, RC presentó disminución de nitrato en 36 de los 48 ciclos. La mayor remoción se registró el día 30, cuando la concentración disminuyó desde 10,59 hasta 0 mg NO_3^- -N/L, equivalente a una remoción de 10,59 mg N/L y 100 %. Sin embargo, la

disponibilidad inicial de nitrato fue generalmente baja y el comportamiento perdió regularidad hacia el final de la etapa. En RZ se observó disminución de nitrato en 47 de los 48 ciclos. La mayor remoción absoluta ocurrió el día 58, cuando la concentración disminuyó desde 51,87 hasta 4,01 mg NO_3^- -N/L, correspondiente a una reducción de 47,85 mg N/L y 92,3 %. No obstante, entre los días 38 y 56 se registraron elevadas concentraciones iniciales y cantidades residuales de hasta 24,83 mg NO_3^- -N/L, evidenciando que la desnitrificación fue incompleta en varios ciclos. Durante la etapa B, RC presentó disminución de nitrato el mayor descenso se registró el día 2, desde 57,06 hasta 4,25 mg NO_3^- -N/L, equivalente a 52,81 mg N/L y 92,5 %. Debido a que este ciclo correspondió a la puesta en marcha y presentó una concentración inicial excepcionalmente alta, un resultado más representativo se observó el día 12, cuando el nitrato presente disminuyó desde 28,26 hasta 0,64 mg NO_3^- -N/L, alcanzando una remoción de 97,7 %. La disminución fue consistente durante los primeros diez ciclos, pero perdió regularidad hacia el final de la etapa, cuando también disminuyó la disponibilidad inicial de nitrato.

En RZ, la mayor reducción ocurrió el día 2, desde 26,81 hasta 4,25 mg NO_3^- -N/L, correspondiente a 22,56 mg N/L y 84,1 %. Posteriormente, el día 26 se registró la remoción completa de los 20,98 mg NO_3^- -N/L presentes al inicio. Sin embargo, hacia el final de la etapa la respuesta fue menos estable; el día 62, por ejemplo, la concentración aumentó aparentemente desde 2,95 hasta 4,55 mg NO_3^- -N/L. En conjunto, ambos reactores mostraron capacidad para disminuir el nitrato durante la fase anóxica, pero la respuesta dependió de su disponibilidad inicial y varió a lo largo de la operación. RZ presentó la disminución más regular durante la etapa A, mientras que RC mostró mayor regularidad durante la etapa B.



(a)



(b)

Figura 4.5. Comportamiento del nitrato durante fase anóxica en etapa vía nitrato (a) y vía nitrato (b).

Durante la etapa vía nitrato, RC presentó una disminución de nitrato en 41 de los 48 ciclos. La mayor reducción ocurrió el día 32, cuando la concentración disminuyó desde 16,98 hasta 0,17 mg NO_2^- -N/L, equivalente a una remoción aparente de 99,0 %. No obstante, el comportamiento fue variable y en siete ciclos la concentración final fue superior a la inicial. En RZ, el nitrato disminuyó en 47 de los 48 ciclos comparables. La mayor reducción se produjo el día 32, desde 37,07 hasta 0,11 mg NO_2^- -N/L, correspondiente al 99,7 %. Además, las concentraciones finales permanecieron por debajo de 1 mg NO_2^- -N/L durante toda la etapa. Esto evidencia una reducción de nitrato más regular en RZ durante esta etapa, indicando una influencia de la zeolita en los procesos de desnitrificación.

Durante la etapa rediseñada vía nitrato, RC presentó disminución de nitrato en 26 de los 31 ciclos. El mayor descenso se registró el día 2, desde 49,92 hasta 0,10 mg NO_2^- -N/L,

equivalente al 99,8 %. Debido al carácter excepcional de esta concentración inicial, un resultado posterior más representativo ocurrió el día 6, cuando el nitrito disminuyó desde 11,70 hasta 0,05 mg NO_2^- -N/L. La reducción fue completa o cercana a completa al comienzo de la etapa, pero perdió efectividad hacia el final.

En RZ, se observó disminución de nitrito en 27 de los 31 ciclos. El mayor descenso ocurrió el día 2, desde 18,16 hasta 0,13 mg NO_2^- -N/L, correspondiente al 99,3 %. Posteriormente, la disponibilidad de nitrito permaneció generalmente baja hasta el último periodo. El día 62, la concentración disminuyó desde 11,79 hasta 4,94 mg NO_2^- -N/L, equivalente a una reducción del 58,1 %. Entre los días 56 y 62 permanecieron concentraciones finales de entre 4,83 y 6,31 mg NO_2^- -N/L, lo que evidencia que la reducción anóxica no fue suficiente para consumir completamente el nitrito disponible.

En conjunto, ambos reactores mostraron capacidad para disminuir el nitrito durante la fase anóxica. RZ presentó la respuesta más regular durante la etapa vía nitrito (A), mientras que en la etapa rediseñada (B) ambos sistemas mostraron una reducción menos completa hacia el final, especialmente RZ debido a la acumulación de concentraciones residuales. Por consiguiente, se observó una ventaja de la zeolita durante la etapa A, en cambio en la etapa B debido al corto tiempo de operación, la zeolita no logró adaptarse al funcionamiento del proceso.

Con respecto a los compuestos azufrados (S^2 -S y SO_4^{2-} -S), relacionados a la actividad autótrofa del sistema, se analizó su evolución durante las dos etapas estudiadas. Para el análisis de los compuestos azufrados durante la fase anóxica, la concentración inicial corresponde al valor registrado al inicio de la desnitrificación (I-DES), mientras que la concentración final representa el valor obtenido al término de esta fase (F-DES). Tanto el sulfuro como el sulfato se expresaron en base azufre mg S/L. Las Figuras 4.6 y 4.7 muestran la evolución del sulfuro añadido como sustrato a los sistemas y la repercusión que tuvo en la formación de sulfato en la etapa A.

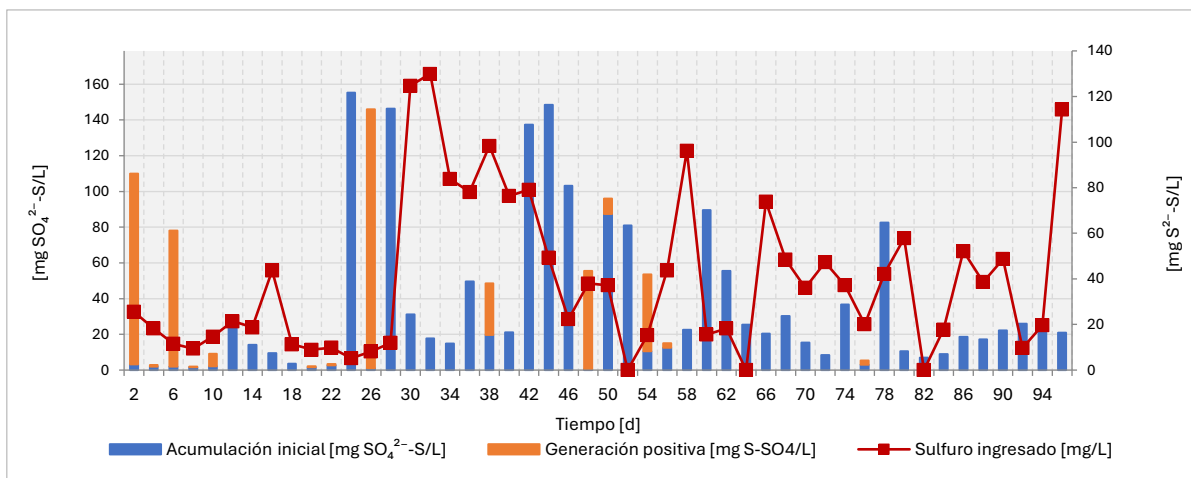


Figura 4.6. Evolución de compuestos azufrados en RC durante etapa A

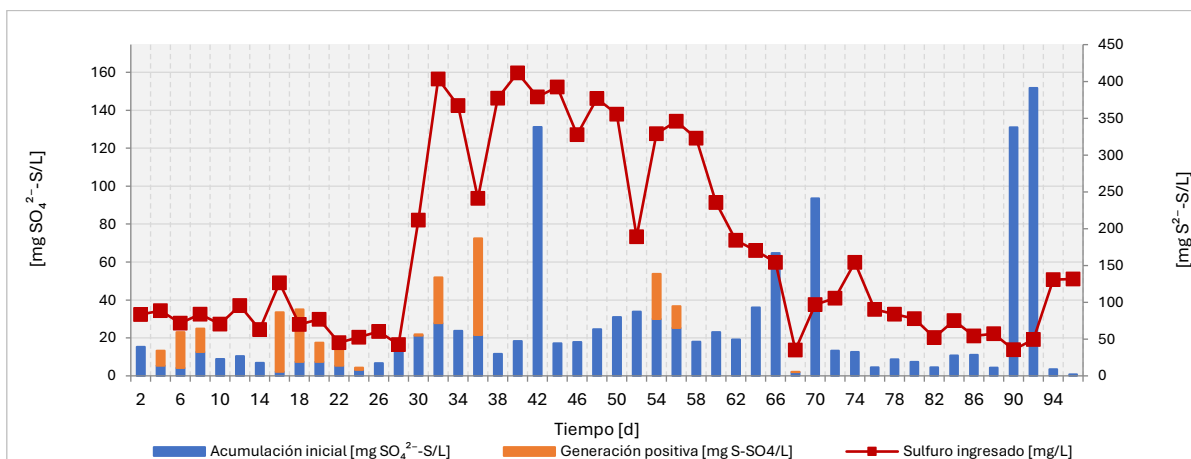


Figura 4.7. Evolución de compuestos azufrados en RZ durante etapa A

La formación de sulfato durante esta etapa no fue sostenida, registrándose aumentos en 14 de los 48 ciclos de cada reactor. En RC, el máximo numérico se presentó el día 26, cuando el sulfato aumentó desde 1,06 hasta 145,93 mg SO₄²⁻-S/L. Sin embargo, solamente se disponía de 1,19 mg S/L de sulfuro y los NO_x aumentaron durante la fase anóxica, por lo que este dato se consideró atípico y no representativo del proceso. Un resultado más coherente ocurrió el día 38, cuando el sulfuro disminuyó desde 122,50 hasta 0 mg S/L y el sulfato aumentó desde 19,62 hasta 48,48 mg SO₄²⁻-S/L, correspondiente a una generación de 28,86 mg S/L y una recuperación aparente del 23,6 %. En RZ, la mayor generación de sulfato de la etapa se registró el día 36, con un aumento desde 21,49 hasta 72,48 mg SO₄²⁻-S/L, equivalente a 50,98 mg S/L. En este ciclo, el sulfuro disminuyó desde 555 hasta 0 mg S/L, por lo que solamente el 9,2 % del sulfuro consumido fue recuperado como sulfato.

La formación de intermediarios azufrados durante la oxidación incompleta del sulfuro ha sido informada previamente, especialmente cuando existe un exceso de donador de electrones (Sun et al., 2021). Por lo tanto, la generación de sulfato observada en algunos ciclos respalda una participación parcial de la vía autótrofa y, al analizarse junto con la reducción de nitrito y nitrato, demuestra indicios de desnitrificación mixotrófica.

Las Figuras 4.8 y 4.9 muestran la evolución del sulfuro añadido como sustrato a los sistemas y la repercusión que tuvo en la formación de sulfato en la etapa B.

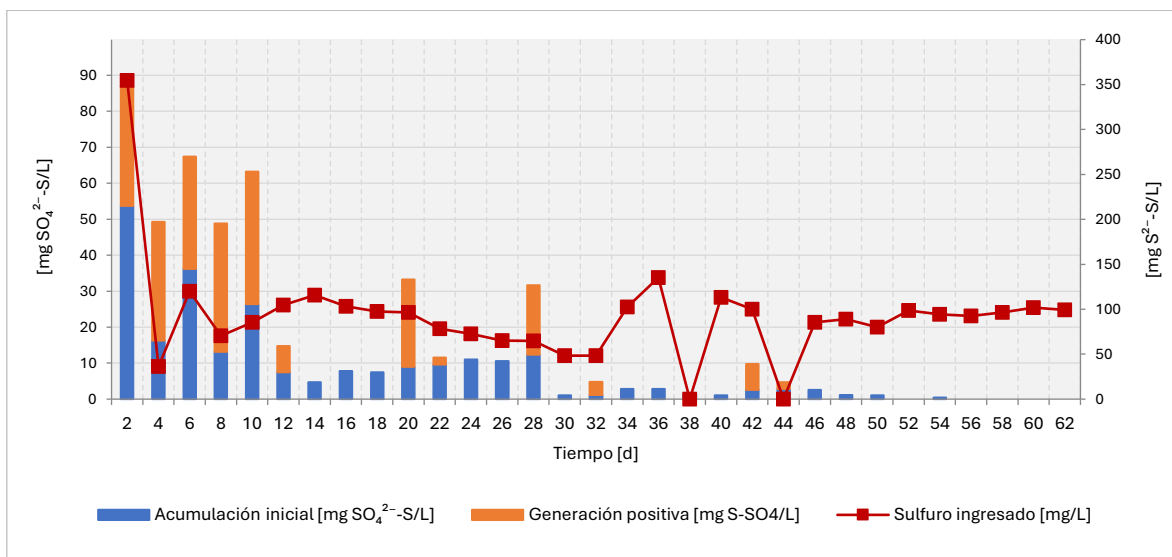


Figura 4.8. Evolución de compuestos azufrados en RC durante etapa B.

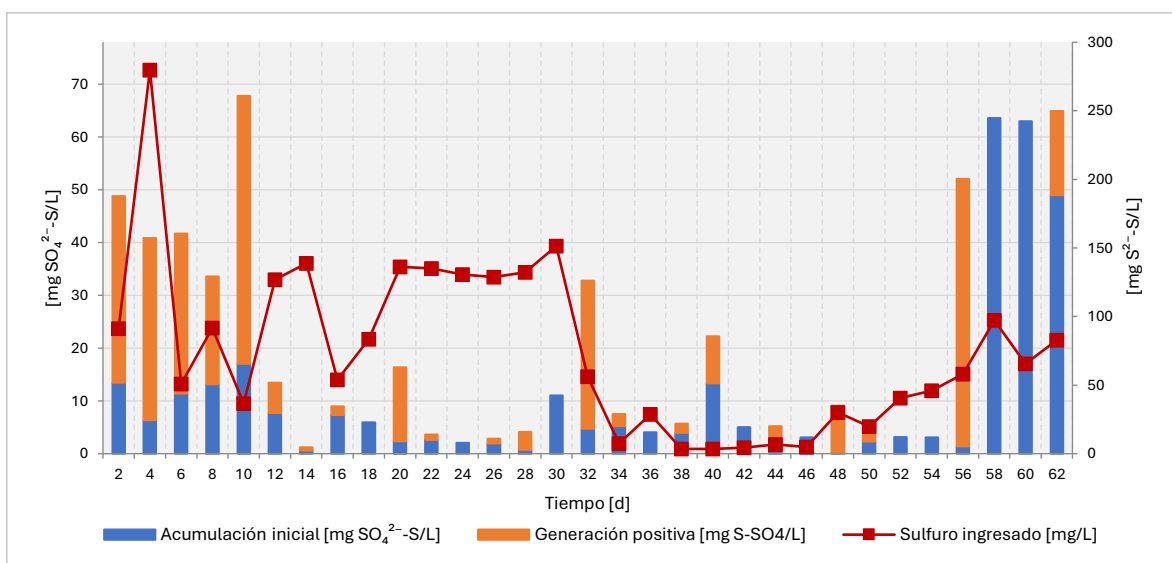


Figura 4.9. Evolución de compuestos azufrados en RZ durante etapa B.

En RC se observó formación de sulfato en 12 de los 31 ciclos de esta etapa. El resultado más consistente se presentó el día 10, cuando el sulfuro disminuyó desde 41,13 hasta 0 mg S/L y el sulfato aumentó desde 26,44 hasta 63,23 mg SO_4^{2-} -S/L. La generación de 36,78 mg S/L representó una recuperación aparente del 89,4 % del sulfuro consumido.

RZ presentó aumentos de sulfato en 21 de los 31 ciclos, frecuencia superior a RC. El máximo numérico ocurrió también el día 10, con una generación de 50,73 mg S/L; sin embargo, esta cantidad correspondió al 123,0 % del sulfuro disponible, por lo que no puede atribuirse completamente a su oxidación. El resultado más representativo se observó el día 62 de la etapa, cuando el sulfuro disminuyó desde 42,00 hasta 0 mg S/L y el sulfato aumentó desde 48,98 hasta 64,94 mg SO_4^{2-} -S/L, equivalente a una generación de 15,96 mg S/L y una recuperación aparente del 38,0 %.

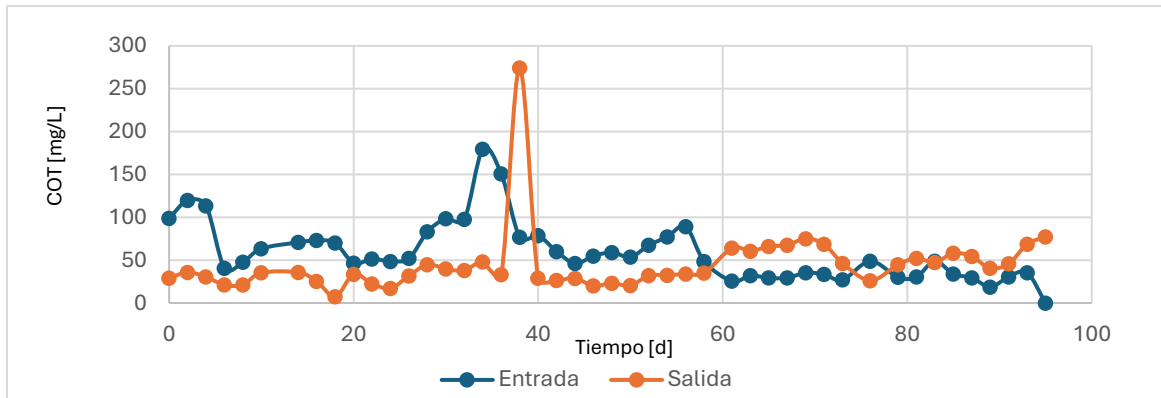
En conjunto, ambos reactores presentaron una desaparición frecuente del sulfuro, mientras que la formación de sulfato fue variable y solo coincidió claramente con la reducción de NO_x en ciclos específicos. Estos resultados respaldan una posible participación del sulfuro como donador de electrones dentro de la desnitrificación mixotrófica, pero no permiten cuantificar su contribución ni demostrar una ventaja sostenida de la zeolita.

Según (Cardoso *et al.*, 2006), una disponibilidad limitada de nitrato respecto del sulfuro favorece su oxidación parcial a azufre elemental, mientras que su conversión completa en sulfato requiere concentraciones suficientes de nitrato.

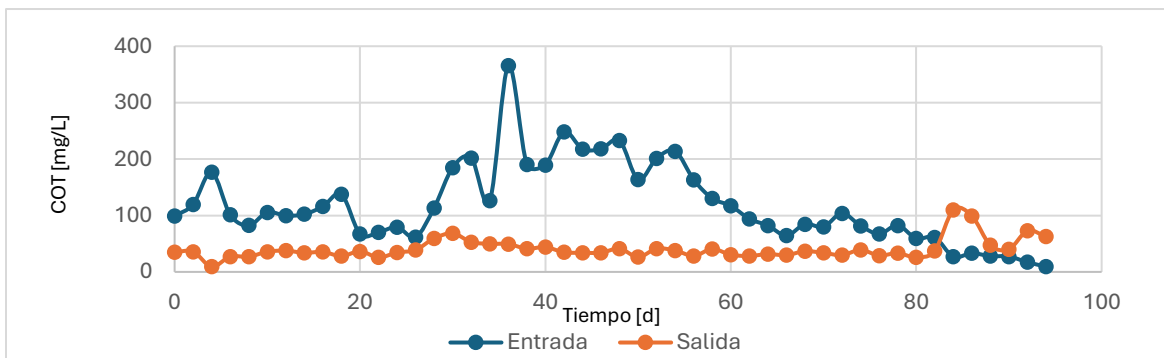
En conjunto, la reducción de nitrato y nitrito, junto con el consumo de acetato y sulfuro y la formación de sulfato, indica que se logró desnitrificación mixotrófica en ambos reactores, mediante la acción conjunta de las vías heterótrofa y autótrofa (Palominos *et al.*, 2025).

4.1.3 Carbono orgánico y nitrógeno total

El carbono orgánico total (COT) y el nitrógeno total (TN) fueron determinados en el afluente y efluente de la fase de desnitrificación mediante el equipo multi N/C 3100. Estos parámetros permitieron complementar el análisis del proceso, evaluando la disponibilidad de materia orgánica y la concentración global de nitrógeno en el sistema. La evolución de COT durante las etapas A y B se presentan en las Figuras 4.10 y 4.11, respectivamente:

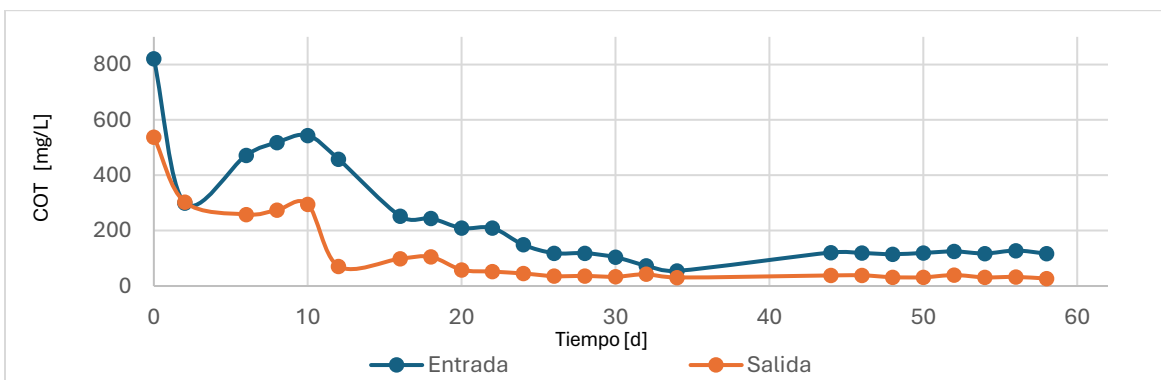


(a)

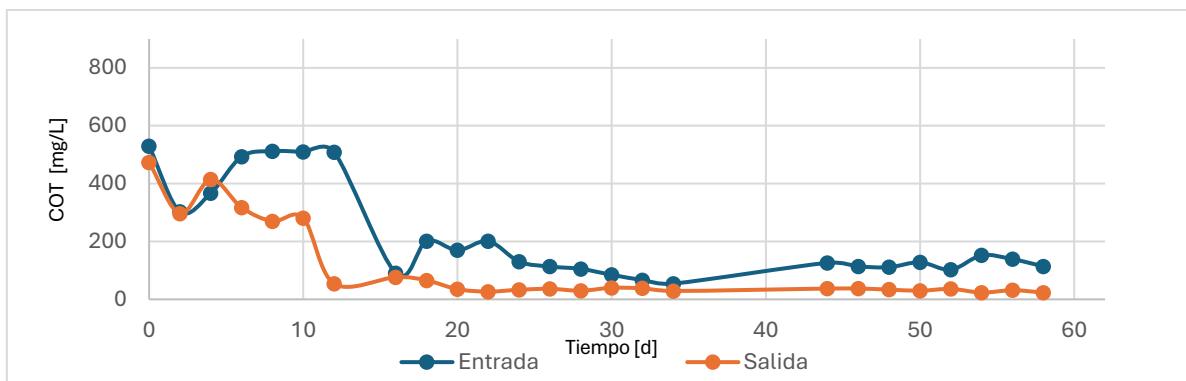


(b)

Figura 4.10. Concentraciones de carbono orgánico total en entrada y salida de la fase anóxica para RC (a) y RZ (b) durante la etapa A.



(a)



(b)

Figura 4.11. Concentraciones de carbono orgánico total en entrada y salida de la fase anóxica para RC (a) y RZ (b) durante la etapa B.

Durante la Etapa A, el COT disminuyó durante la fase anóxica en 30 de los 46 ciclos emparejados de RC. La mayor disminución se registró el día 34, cuando la concentración pasó desde 179,50 hasta 48,24 mg/L, equivalente a una reducción del 73,1 %. El consumo fue regular durante la primera parte de la etapa, con disminuciones en 23 de los primeros 24 ciclos; sin embargo, después del día 50 solamente se observaron reducciones en siete de los 22 ciclos restantes. Esta pérdida de regularidad indica una menor utilización aparente del carbono hacia el final de la etapa, también se identificó en el RC un resultado atípico el día 38, cuando el COT aumentó desde 76,97 hasta 274,40 mg/L. Este incremento coincidió con un aumento pronunciado del TN en el mismo ciclo, por lo que no se consideró representativo del comportamiento biológico y podría estar relacionado con la heterogeneidad de la muestra o con la presencia variable de biomasa y sólidos.

En RZ, el COT disminuyó en 42 de los 48 ciclos de la etapa A. La mayor reducción ocurrió el día 36, desde 365,90 hasta 49,42 mg/L, correspondiente a un 86,5 %. Además, la concentración final fue inferior a la inicial en todos los ciclos registrados hasta el día 72. Durante el último periodo esta tendencia se mantuvo solamente en cinco de los once ciclos. La mayor estabilidad de RZ se atribuye al empleo de zeolita como soporte, debido a que este material favorece la retención de biomasa y la cinética de remoción (Guerrero et al., 2016). Los aumentos puntuales de COT podrían incluir la liberación de productos microbianos solubles bajo condiciones anóxicas, aunque estos compuestos no fueron determinados (Xie et al., 2010). Durante la etapa B, el consumo de COT fue más regular en ambos reactores. RC presentó disminuciones en 23 de los 24 ciclos, registrándose el máximo el día 12, desde

458,30 hasta 71,37 mg/L, equivalente a un 84,4 %. RZ presentó disminuciones en 24 de los 25 ciclos y su máximo también ocurrió el día 12, cuando la concentración pasó desde 508,80 hasta 54,06 mg/L, correspondiente al 89,4 %. Las únicas excepciones fueron aumentos puntuales observados el día 2 en RC y el día 4 en RZ. Asimismo, la magnitud de las disminuciones fue cercana a la remoción de carbono orgánico de 56,2 % reportada para un proceso mixotrófico alimentado con acetato y sulfuro (Li, 2015). En conjunto, la disminución frecuente del COT demuestra que existió utilización de materia orgánica durante la fase anóxica, especialmente durante la etapa rediseñada. Este comportamiento es consistente con la participación de microorganismos heterótrofos dentro de la desnitrificación mixotrófica. No obstante, el consumo de COT no puede atribuirse exclusivamente a la reducción de nitrito y nitrato, debido a que parte del carbono también pudo utilizarse para crecimiento celular, mantenimiento metabólico o almacenamiento intracelular. La evolución de TN durante las etapas A y B se presentan en las Figuras 4.12 y 4.13, respectivamente:

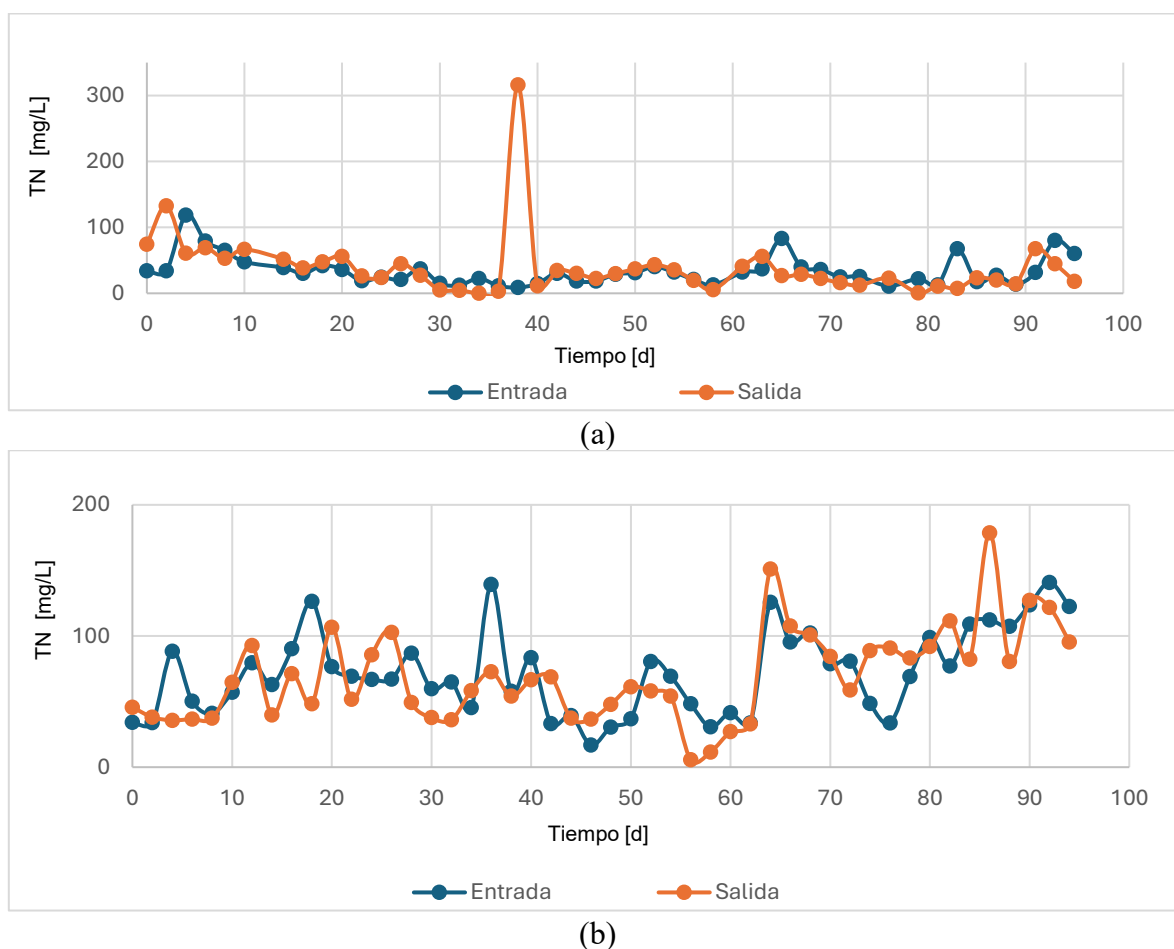
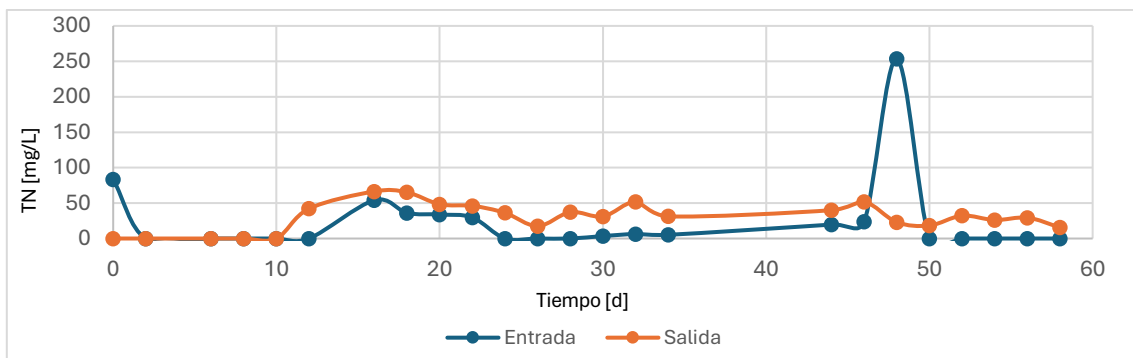
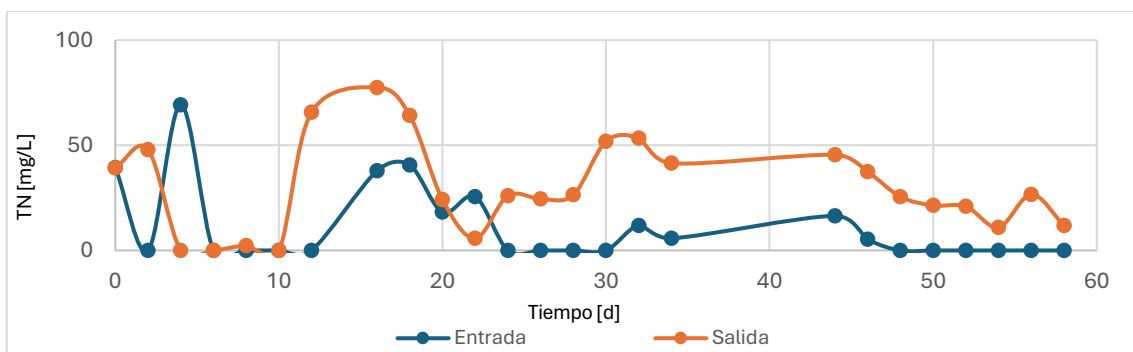


Figura 4.12. Concentraciones de nitrógeno total en entrada y salida de la fase anóxica para RC (a) y RZ (b) durante la etapa A.



(a)



(b)

Figura 4.13. Concentraciones de nitrógeno total en entrada y salida de la fase anóxica para RC (a) y RZ (b) durante la etapa B.

Durante la etapa A, la concentración disminuyó en 23 de los 46 ciclos emparejados de RC. La mayor reducción se registró el día 83, desde 67,40 hasta 7,33 mg N/L, equivalente a 89,1 %. Sin embargo, en los otros 23 ciclos se observaron aumentos. El caso más marcado ocurrió el día 38, cuando el TN pasó desde 8,79 hasta 316,00 mg N/L. La coincidencia de este resultado con el máximo atípico de COT indica que dicho ciclo no debe utilizarse como evidencia del desempeño del proceso.

En RZ, el TN disminuyó en 27 de los 48 ciclos de la etapa A. La mayor reducción ocurrió el día 18, cuando la concentración pasó desde 126,50 hasta 48,43 mg N/L, correspondiente a una disminución de 78,07 mg N/L o 61,7 %. En los 21 ciclos restantes se registraron aumentos, incluido el día 86, cuando el TN aumentó desde 112,20 hasta 178,70 mg N/L. Aunque RZ presentó disminuciones con mayor frecuencia que RC, la variabilidad observada impide establecer una eliminación sostenida de TN o atribuir una ventaja concluyente a la zeolita.

La inconsistencia fue mayor durante la etapa B. En RC, el TN disminuyó solamente en dos de los 24 ciclos, aumentó en 18 y permaneció sin variación en cuatro. Además, 13 ciclos comenzaron con concentraciones iguales a cero. La mayor reducción numérica ocurrió el día 48, desde 253,60 hasta 23,00 mg N/L, equivalente a 90,9 %; no obstante, correspondió a un resultado aislado y a una concentración inicial alta.

En RZ, existió gran variabilidad entre aumentos y disminuciones. La mayor disminución ocurrió el día 4, desde 69,28 hasta 0 mg N/L; sin embargo, su carácter puntual impide considerarla representativa. Asimismo, se registraron ciclos que comenzaron con TN igual a cero y finalizaron con concentraciones elevadas, como el día 12, cuando se alcanzaron 65,73 mg N/L. En consecuencia, el TN no permitió confirmar una eliminación estable de nitrógeno en ninguno de los reactores. Debe considerarse que los valores de TN representan el conjunto de las formas nitrogenadas cuantificadas en la muestra y no necesariamente corresponden al nitrógeno disponible para el metabolismo de los microorganismos. La elevada variabilidad observada podría estar asociada a la heterogeneidad de las muestras y a diferencias en la cantidad de biomasa o material particulado incorporado durante el muestreo y filtrado. Asimismo, procesos de lisis celular pudieron liberar nitrógeno previamente contenido en la biomasa hacia la fase líquida, modificando su cuantificación sin representar una generación neta de nitrógeno en el sistema. Las variaciones en el proceso de filtración también pudieron determinar qué fracción del nitrógeno particulado quedó incluida en el análisis, contribuyendo a las diferencias entre las concentraciones iniciales y finales. Por estas razones, no resulta adecuado interpretar las variaciones de TN de manera aislada como una medida directa de la eficiencia de desnitrificación, debiendo contrastarse con el comportamiento de amonio, nitrito y nitrato.

4.1.4 pH y Oxígeno disuelto

En la Figura 4.14 se presenta la evolución del pH en los reactores control (RC) y con zeolita (RZ), durante las etapas A y B, donde la medición se realizó al inicio y fin de cada fase, para simplificar el análisis se juntaron todos los valores de pH en un solo gráfico, promediando los valores obtenidos por ciclo y obteniendo sus desviaciones estándar respectivas.

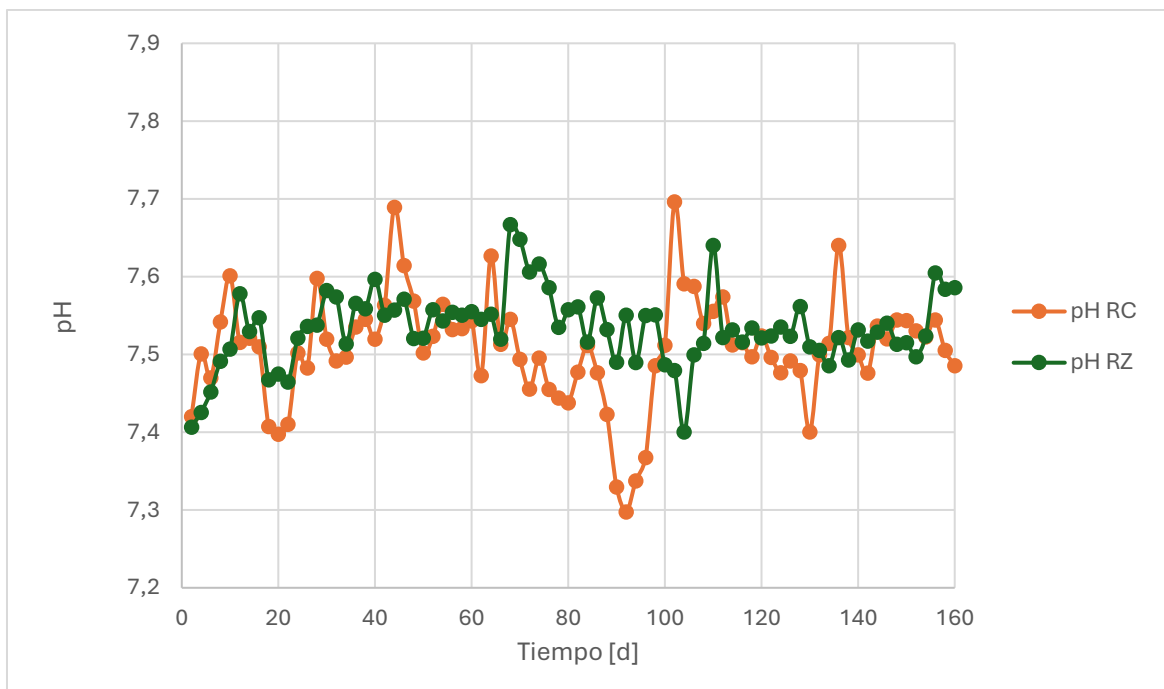


Figura 4.14. pH promedio por ciclo.

Durante ambas etapas, el pH alcanzó valores de $7,51 \pm 0,07$ en RC y $7,53 \pm 0,05$ en RZ. La diferencia de solo 0,03 unidades y las bajas desviaciones estándar muestran que ambos reactores mantuvieron condiciones similares y estables, sin observarse episodios prolongados de acidificación o alcalinización. Los valores se situaron en el intervalo óptimo de 7,5 a 8,0 y permanecieron sobre 6,8, valor bajo el cual disminuye rápidamente la oxidación de amonio (EPA, 2010). Por lo tanto, el pH no habría limitado la nitrificación ni explicaría las diferencias de desempeño entre RC y RZ.

En cuanto al oxígeno disuelto (OD), en la etapa A se realizaron mediciones puntuales mediante un medidor de oxígeno disuelto, el cual fue introducido directamente en el reactor hasta alcanzar una lectura estable. Las mediciones se efectuaron al inicio y al final cada etapa operacional, con el propósito de registrar las condiciones aeróbicas y anóxicas del sistema. La evolución del OD en la etapa A durante la fase aerobia para RC y RZ se disponen en la Figura 4.15, cabe destacar que no se indican las concentraciones de OD ya que se mantienen entre 0 y 1 mg O₂/L constantemente.

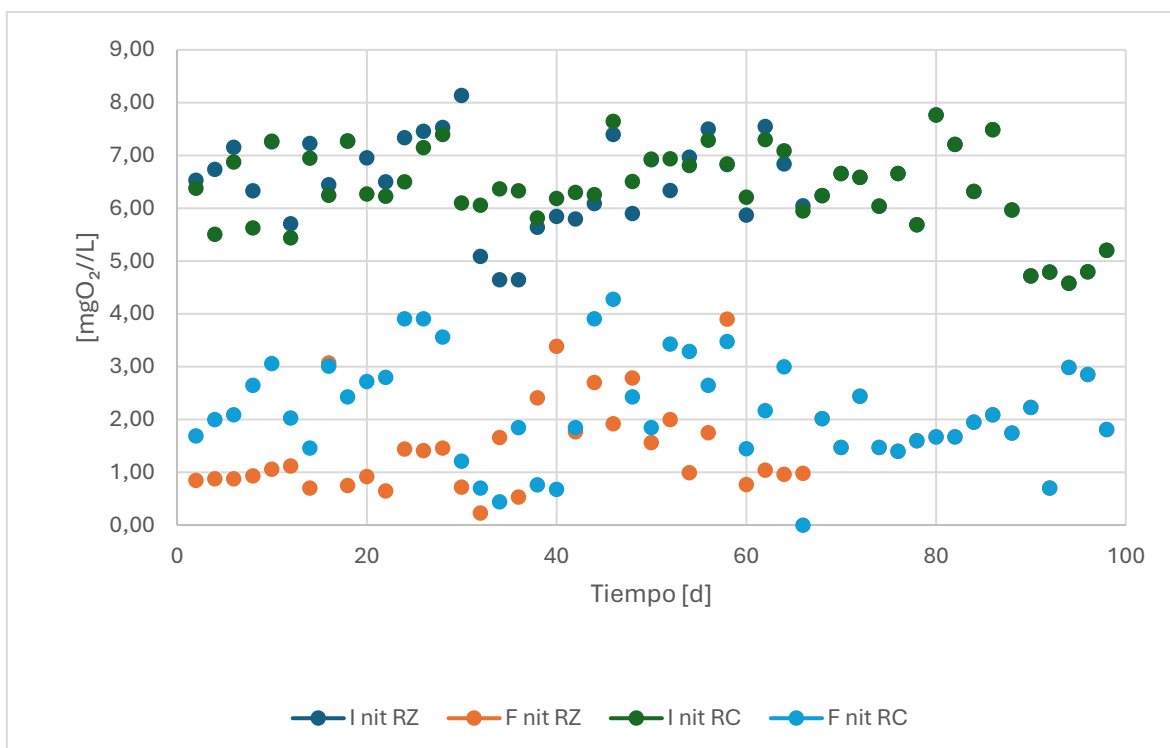


Figura 4.15. Concentración de oxígeno disuelto en la fase aerobia durante etapa A.

Al inicio de la etapa nitrificante, ambos reactores mostraron concentraciones prácticamente iguales: $6,39 \pm 0,78$ mg O₂/L en el RC y $6,39 \pm 0,93$ mg O₂/L, los altos niveles de OD en esta etapa se atribuyen a que se toma solo una medición al inicio de la etapa, cuando los aireadores se encuentran funcionando, entonces es normal que los valores sean altos, también este valor puede haber disminuido durante la etapa aeróbica. En el RZ, al final de esta etapa, el OD disminuyó hasta $2,18 \pm 0,98$ mg O₂/L en el RC y $1,60 \pm 0,82$ mg O₂/L en el RZ, lo que indica un consumo de oxígeno por parte de los microorganismos aceptores de electrones.

Como se menciona en la metodología, para la etapa B, en el rediseño del reactor se agrega una abertura para ubicar un sensor de oxígeno disuelto continuo, el cual tomaba datos cada diez minutos, cabe destacar que la medición se realizó específicamente en la etapa aerobia para ver el comportamiento del OD en esta, ya que para la etapa anóxica los valores siempre se mantuvieron entre 0 y 1 mg/L. Para visualizar de mejor manera lo anterior, se realizaron dos gráficos a partir del conjunto de datos obtenidos, la Figura 4.16.

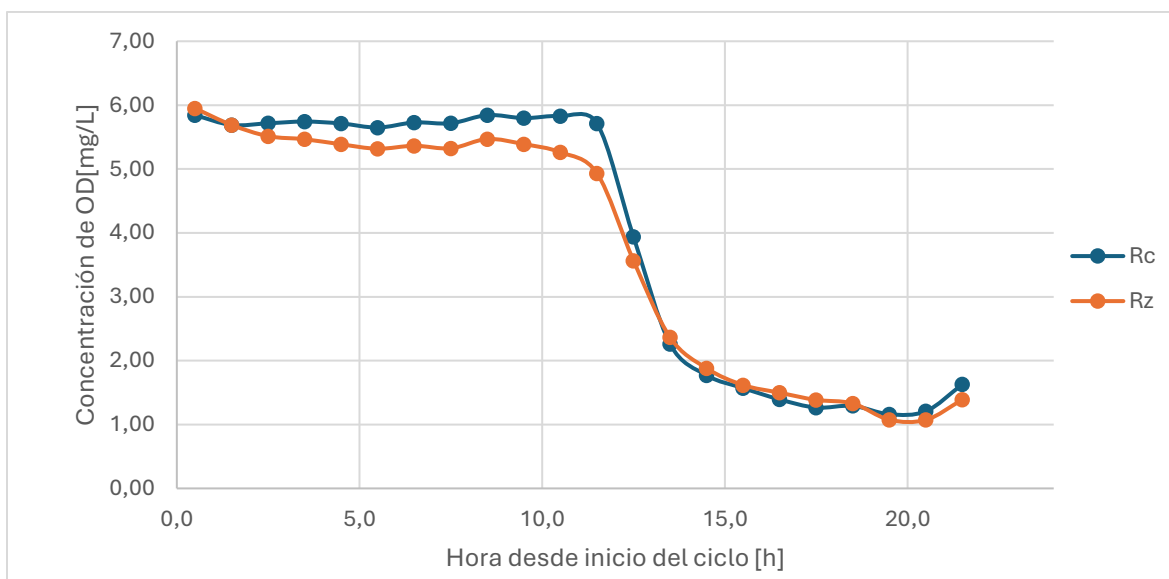


Figura 4.16. OD promedio en etapa B por hora de ciclo.

Durante las primeras 12 horas, el OD alcanzó valores promedio de $5,75 \pm 2,58$ mg O₂/L en el RC y $5,42 \pm 1,55$ mg O₂/L en el RZ. Estos resultados muestran que existió una elevada disponibilidad de oxígeno en el líquido durante el periodo efectivamente aireado. Después de detener la aireación, el OD disminuyó hasta promedios de $1,78 \pm 1,50$ mg O₂/L en el RC y $1,83 \pm 1,64$ mg O₂/L en el RZ. Las elevadas concentraciones de OD registradas durante el periodo aireado respondieron principalmente a una limitación operacional del sistema. Al intentar trabajar con concentraciones de entre 1-3 mg O₂/L intervalo descrito para favorecer procesos de nitrificación parcial o total (Campos *et al.*, 2009), el caudal de aire suministrado por la bomba y los difusores de piedra porosa no permitía mantener una mezcla homogénea del licor. Esto provocaba la sedimentación de la biomasa y la separación de fases dentro de los reactores, por esta razón, fue necesario aumentar la aireación durante las primeras 12 horas, aun cuando ello generara concentraciones de OD superiores al intervalo inicialmente previsto. En consecuencia, los niveles elevados de OD deben interpretarse como una condición necesaria para mantener la mezcla del sistema y no como el valor seleccionado específicamente para optimizar la nitrificación. La disminución posterior a las 12 horas es coherente con el consumo del oxígeno remanente mediante la respiración de la biomasa, la oxidación residual de sustratos y otras reacciones químicas, mientras el sistema permanecía sin aireación, esto indica que el periodo de caída de OD permitió disminuir el arrastre de oxígeno hacia la etapa desnitrificante, esto resulta operacionalmente favorable, ya que el

oxígeno residual puede retrasar la utilización de nitrito y nitrato como aceptores de electrones y consumir parte del COT o sulfuro mediante rutas aerobias (Oh y Silverstein, 1999).

4.2 Evolución de la biomasa suspendida mediante SSV

Las Figuras 4.17 y 4.18 presentan la evolución de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) en los reactores control (RC) y con zeolita (RZ) durante las etapas vía nitrito y rediseñada vía nitrato, respectivamente. Cada punto representa el promedio de las determinaciones realizadas, mientras que las barras de error corresponden a una desviación estándar.

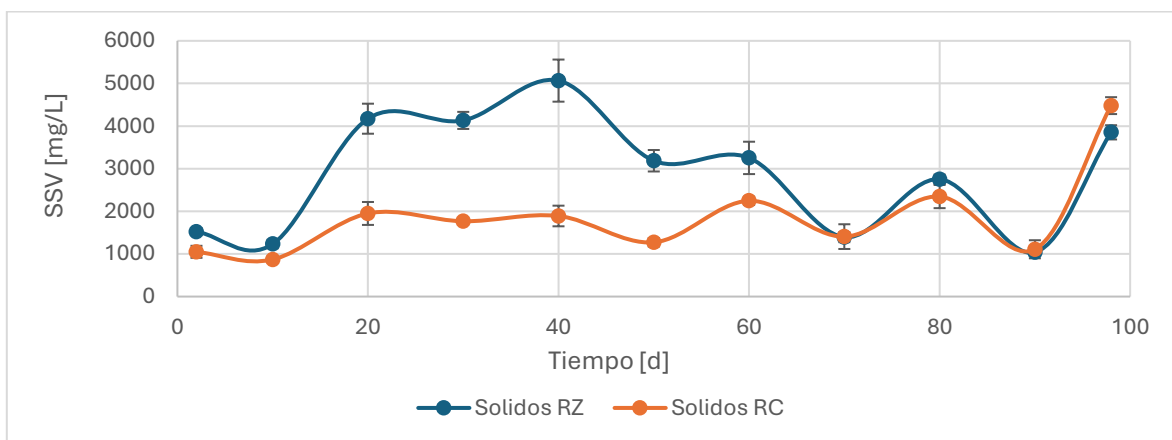


Figura 4.17. Evolución de solidos suspendidos volátiles durante etapa A.

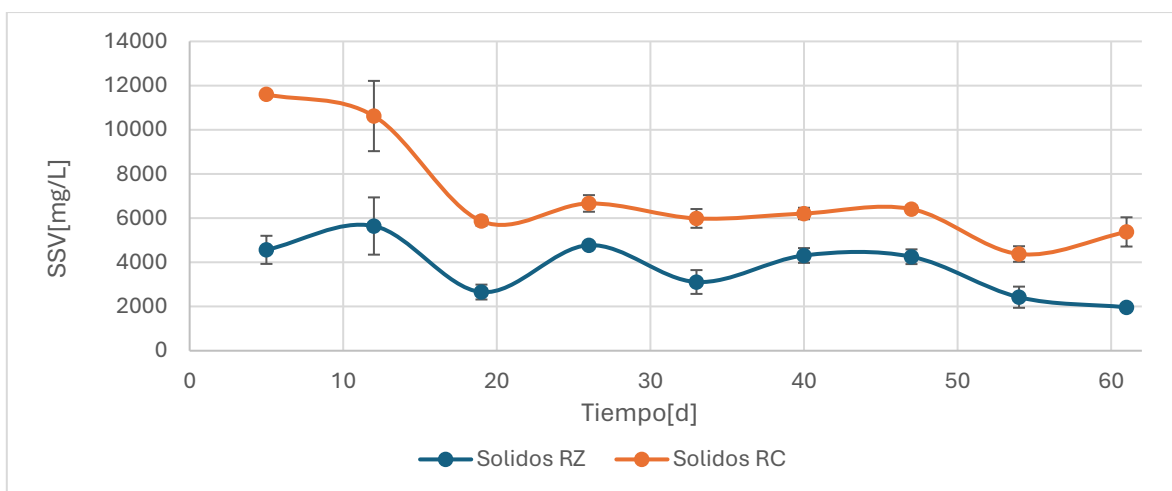


Figura 4.18. Evolución de solidos suspendidos volátiles durante etapa B.

En la etapa vía nitrito, el reactor con zeolita (RZ) presentó una mayor concentración de SSV en comparación con el reactor control (RC), especialmente entre los días 20 y 60, lo que es consistente con el rol de la zeolita como soporte microbiano (Mery, 2011). Este aumento

transitorio de biomasa suspendida coincidió con un mejor desempeño en la oxidación de amonio en RZ, lo que sugiere que una mayor disponibilidad de sólidos biológicos pudo contribuir a la eficiencia del proceso en esta etapa. Sin embargo, esta diferencia no se mantuvo en el tiempo, lo que indica que el efecto de la zeolita no fue constante.

En la etapa rediseñada vía nitrato, las diferencias observadas en los SSV estuvieron fuertemente influenciadas por la desigual concentración inicial de biomasa entre los reactores, lo que impide atribuir los resultados exclusivamente a la presencia de zeolita. Ambos sistemas presentaron pérdidas relativas similares de sólidos a lo largo del tiempo y una baja correspondencia entre SSV y actividad nitrificante. En este contexto, es posible plantear que la zeolita no logró establecer un efecto claro ni sostenido, lo que podría explicarse por el corto periodo de operación en esta etapa, insuficiente para una adecuada adaptación y estabilización de la biomasa asociada al soporte.

4.3 Ensayos de actividad desnitrificante autótrofa y heterótrofa.

Las Figuras 4.19 y 4.20 muestran las variaciones de presión registradas durante los ensayos de actividad desnitrificante autótrofa (ADA) y heterótrofa (ADH) en ambos reactores y etapas estudiadas. Las actividades específicas se determinaron a partir de la mayor pendiente ascendente de cada perfil, mediante la ley de los gases ideales y su normalización respecto de los SSV presentes en el vial (Dapena-Mora *et al.*, 2007).

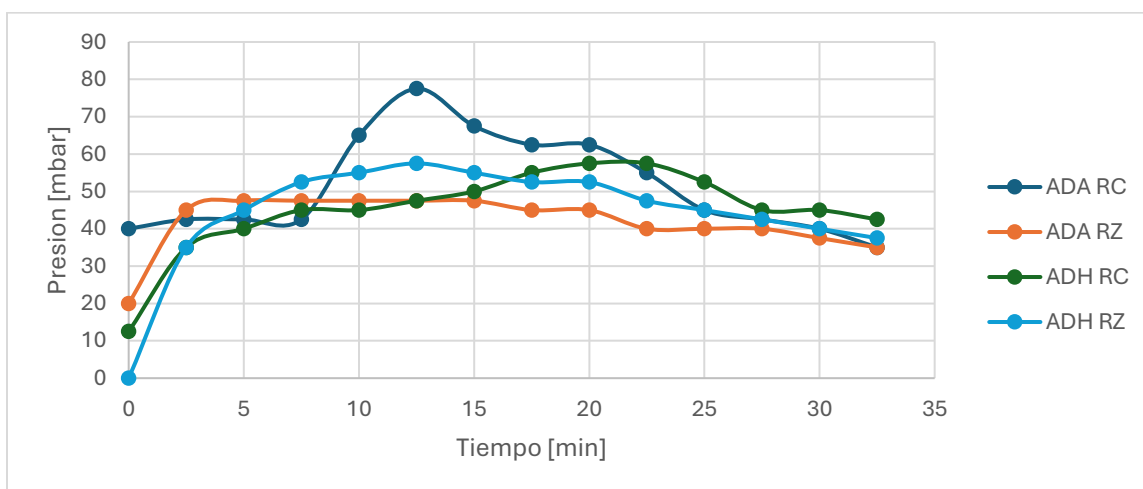


Figura 4.19. Actividad desnitrificante autótrofa y heterótrofa en etapa A

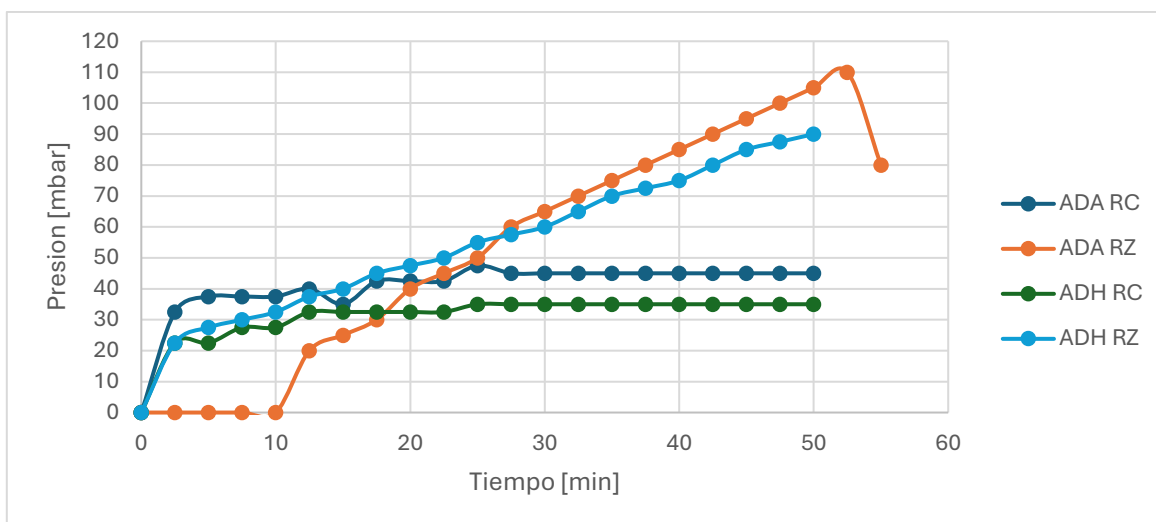


Figura 4.20. Actividad desnitrificante autótrofa y heterótrofa en etapa B.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.4.

Tabla 4.2. Resultados ensayo de actividad microbiana

Actividad	Etapa A: RZ	Etapa A: RC	Etapa: RZ	Etapa B: RC
ADA [g N ₂ -N/(g SSV·d)]	5,30	4,77	4,24	6,89
ADH [g N ₂ -N/(g SSV·d)]	7,42	5,30	4,77	4,77

En términos generales, ambos reactores conservaron capacidad para desarrollar las rutas desnitrificantes autótrofa y heterótrofa en las dos etapas. Sin embargo, no se observó una superioridad constante de RZ, debido a que su mayor actividad durante la Etapa A no se mantuvo después del rediseño. Además, la resolución del transductor y la ausencia de estimaciones de variabilidad impiden establecer diferencias estadísticamente significativas entre los reactores. Por consiguiente, los resultados deben considerarse indicativos de la presencia y actividad de ambos grupos metabólicos. Analizados junto con el consumo de especies nitrogenadas, sulfuro y carbono orgánico registrado durante la operación, estos ensayos respaldan el desarrollo potencial de desnitrificación mixotrófica en RC y RZ.

Capítulo 5: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

La evaluación comparativa de los reactores RC y RZ permitió caracterizar su comportamiento durante las etapas A y B e identificar los principales factores que condicionaron los procesos de nitrificación y desnitrificación mixotrófica. Sin embargo, ninguno de los sistemas alcanzó una estabilización sostenida durante toda la operación. Por esta razón, el desempeño se interpretó a partir de las tendencias temporales y de los ciclos representativos de mayor actividad, sin considerar los máximos puntuales como eficiencias permanentes. La caracterización de las condiciones operacionales mostró que el pH se mantuvo estable y similar en ambos reactores, con valores de $7,51 \pm 0,07$ en RC y $7,53 \pm 0,05$ en RZ, por lo que no constituyó una condición limitante. Durante la etapa A, la disminución del oxígeno disuelto al término de la fase aerobia evidenció su consumo dentro de los sistemas. En la etapa B, las concentraciones elevadas de OD durante las primeras 12 horas respondieron principalmente a la necesidad de mantener una mezcla homogénea y no a una condición seleccionada para optimizar la nitrificación. En consecuencia, el control simultáneo de la aireación y la mezcla se identificó como una de las principales limitaciones operacionales del rediseño.

Durante la etapa A se registró la mayor actividad nitrificante, alcanzándose oxidaciones máximas de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ de 81,8 % en RC y 98,5 % en RZ. Aunque se observó formación neta de NO_2^- en la mayoría de los ciclos, también se produjo NO_3^- y existió una elevada variabilidad temporal. Por lo tanto, se confirmó la presencia de actividad nitrificante, pero no el establecimiento de una nitrificación parcial controlada. En la etapa B, las oxidaciones máximas de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ fueron de 35,8 % en RC y 43,0 % en RZ y se concentraron hacia el final de la operación. La formación de NO_3^- no fue sostenida y se observó una acumulación final de NO_2^- , por lo que tampoco se logró establecer una nitrificación total estable. Esta etapa correspondió principalmente a un periodo de reactivación y adaptación de la comunidad nitrificante después del rediseño. Ambos reactores mostraron capacidad para reducir NO_2^- y NO_3^- durante la fase anóxica, alcanzándose remociones superiores al 90 % en ciclos específicos de mayor actividad. Durante la etapa A, RZ presentó el comportamiento más regular: el NO_3^- disminuyó en 47 de los 48 ciclos, frente a 36 de los 48 ciclos de RC, mientras

que el NO_2^- disminuyó en 47 de los 48 ciclos de RZ y en 41 de los 48 ciclos de RC. Además, las concentraciones finales de NO_2^- en RZ permanecieron inferiores a 1 mg NO_2^- -N/L durante esta etapa. En la etapa B, la reducción de ambas especies perdió regularidad hacia el final, especialmente en RZ. Por consiguiente, las altas remociones observadas en determinados ciclos no representaron un desempeño sostenido y estuvieron condicionadas por la disponibilidad variable de NO_2^- y NO_3^- generada durante la fase nitrificante.

La disminución frecuente del COT respaldó la participación de la vía heterótrofa, particularmente en la etapa B, donde se registraron reducciones en 23 de los 24 ciclos de RC y en 24 de los 25 ciclos de RZ. A su vez, la desaparición del sulfuro, su recuperación parcial como sulfato y la reducción simultánea de NO_x respaldaron la participación de la vía autótrofa en ciclos específicos. Estos resultados, junto con las actividades desnitrificantes autótrofa y heterótrofa detectadas en ambos reactores, sustentan el desarrollo de una desnitrificación mixotrófica. No obstante, la formación variable de sulfato y la posible generación de especies azufradas no cuantificadas impidieron cerrar el balance de azufre y determinar la contribución específica de cada ruta metabólica. Asimismo, la ausencia de estimaciones de variabilidad en los ensayos de actividad no permitió determinar si las diferencias entre RC y RZ fueron estadísticamente significativas.

El efecto favorable observado de la zeolita se manifestó principalmente durante la etapa A. Entre los días 20 y 60, RZ presentó temporalmente una mayor concentración de SSV, comportamiento consistente con la función de la zeolita como soporte microbiano, y esta tendencia coincidió con una mayor oxidación máxima de amonio y una reducción más regular de las especies nitrogenadas y del COT. Sin embargo, estas diferencias no se mantuvieron durante toda la operación. En la etapa B no se observó una ventaja clara y sostenida de RZ respecto de RC, debido a la desigual concentración inicial de biomasa, al menor tiempo de operación y a la falta de estabilización de la biomasa asociada al soporte. En términos generales, no fue posible establecer una superioridad global de RZ respecto de RC ni separar completamente el efecto de la zeolita del efecto del rediseño, debido a que entre las etapas se modificaron simultáneamente la configuración, el inóculo y las condiciones operacionales. No obstante, la acumulación de NO_2^- observada al finalizar la etapa B evidencia que el sistema rediseñado presenta potencial para ser evaluado mediante una estrategia de nitrificación parcial, una vez alcanzada una biomasa estable.

5.2 Recomendaciones

- Realizar un periodo previo de enriquecimiento y adaptación de los microorganismos nitrificantes y desnitrificantes antes de iniciar la operación experimental, con el fin de favorecer el establecimiento de una biomasa activa y reducir el tiempo requerido para estabilizar las etapas aerobia y anóxica.
- Incorporar una malla de contención sobre los difusores del reactor con zeolita (Rz), con el fin de mantener el material de soporte en la zona de aireación y evitar su acumulación en el fondo del reactor.
- Implementar un periodo previo de adaptación y estabilización de la zeolita en el sistema antes de iniciar la operación experimental, favoreciendo la colonización microbiana del soporte y una evaluación más representativa de su efecto sobre el desempeño del reactor.

Referencias:

- Alisawi, H. A. O. (2020). Performance of wastewater treatment during variable temperature. *Applied Water Science*, 10(4), 89. <https://doi.org/10.1007/s13201-020-1171-x>
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., & Srinath, E. G. (1976). Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 48(5), 835-852.
- Bazaul, G. A. C. (2007). *Facultad de Ingeniería Ciencias y Administración Instituto de Agroindustria*.
- Bucci, P. L. (2021). *Remoción simultánea de nitrógeno y carbono orgánico en SBR usando la tecnología de granulación aeróbica* [Doctor en Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.35537/10915/126297>
- Buschmann, A. H., Cabello, F., Young, K., Carvajal, J., Varela, D. A., & Henríquez, L. (2009). Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean & Coastal Management*, 52(5), 243-249. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2009.03.002>
- Campos, J. L., Vázquez-Padín, J. R., Fernández, I., Fajardo, C., Seca, I., Mosquera-Corral, A., & Pampín, R. (2009). *Procesos avanzados de eliminación de nitrógeno: Nitrificación parcial, Anammox, desnitrificación autótrofa*.
- Cao, Y., van Loosdrecht, M. C. M., & Daigger, G. T. (2017). Mainstream partial nitritation–anammox in municipal wastewater treatment: Status, bottlenecks, and further studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4), 1365-1383. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8058-7>
- Cardoso, R. B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Flores, E. R., Gómez, J., & Field, J. A. (2006). Sulfide oxidation under chemolithoautotrophic denitrifying conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(6), 1148-1157. <https://doi.org/10.1002/bit.21084>
- Chen, Y., Li, J., Zhang, Y., Li, Y., Wang, Q., & Wang, X. (2026). Revealing in-situ ammonium adsorption and elimination response mechanisms in zeolite-driven nitritation for actual low-strength municipal wastewater treatment. *Environmental Research*, 289, 123380. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.123380>
- Chernicharo, C. A. D. L., & Bressani Ribeiro, T. (2023). *Tratamiento de aguas residuales municipales*. Inter-American Development Bank. <https://doi.org/10.18235/0004735>
- Cui, Y.-X., Biswal, B. K., Guo, G., Deng, Y.-F., Huang, H., Chen, G.-H., & Wu, D. (2019). Biological nitrogen removal from wastewater using sulphur-driven autotrophic denitrification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(15), 6023-6039. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09935-4>
- Curi, A., Granda, W. J. V., Lima, H. M., & Sousa, W. T. (2006). Las Zeolitas y su Aplicación en la Descontaminación de Efluentes Mineros. *Información tecnológica*, 17(6), 111-118. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642006000600017>
- Dapena-Mora, A., Fernández, I., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., & Jetten, M. S. M. (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 859-865. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.06.018>
- Deb, S., Lewicka-Szczebak, D., & Rohe, L. (2024). Microbial nitrogen transformations tracked by natural abundance isotope studies and microbiological methods: A review. *Science of The Total Environment*, 926, 172073. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172073>
- Di Capua, F., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2019). Electron donors for autotrophic denitrification. *Chemical Engineering Journal*, 362, 922-937. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.069>
- Du, S., Ya, T., Zhang, M., Zhu, M., Li, N., Liu, S., & Wang, X. (2020). Distinct microbial communities and their networks in an anammox coupled with sulfur autotrophic/mixotrophic denitrification system. *Environmental Pollution*, 262, 114190. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114190>
- Duan, H., Gao, S., Li, X., Ab Hamid, N. H., Jiang, G., Zheng, M., Bai, X., Bond, P. L., Lu, X., Chislett, M. M., Hu, S., Ye, L., & Yuan, Z. (2020). Improving wastewater management using free nitrous acid (FNA). *Water Research*, 171, 115382. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115382>

- Dutta, A., & Sarkar, S. (2015). Sequencing Batch Reactor for Wastewater Treatment: Recent Advances. *Current Pollution Reports*, 1(3), 177-190. <https://doi.org/10.1007/s40726-015-0016-y>
- Espinosa-Ortiz, E. J., Gerlach, R., Peyton, B. M., Roberson, L., & Yeh, D. H. (2023). Biofilm reactors for the treatment of used water in space: potential, challenges, and future perspectives. *Biofilm*, 6, 100140. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100140>
- Flemming, H.-C., van Hullebusch, E. D., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., Wingender, J., & Wurtz, S. (2023). The biofilm matrix: Multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, 21(2), 70-86. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00791-0>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science*, 320(5878), 889-892. <https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., & Peng, Y. (2015). Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere, Wastewater-Energy Nexus: Towards Sustainable Wastewater Reclamation*, 140, 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.004>
- González-Blanco, G., Casas-Reyes, A., Velasco-Garduño, O., Ruiz-Gómez, M. L., Aguirre-Garrido, J. F., & Beristain-Cardoso, R. (2021). Simultaneous nitrification/denitrification and desulfurization of wastewater polluted with ammonium, COD and sulfide: Effectiveness of a new up-flow vertical hybrid reactor. *3 Biotech*, 11(3), 123. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02671-5>
- Guerrero, L., Montalvo, S., Huiliñir, C., Barahona, A., Borja, R., & Cortés, A. (2016). Simultaneous nitrification–denitrification of wastewater: Effect of zeolite as a support in sequential batch reactor with step-feed strategy. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(10), 2325-2338. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1065-5>
- Guo, J. H., Peng, Y. Z., Wang, S. Y., Zheng, Y. N., Huang, H. J., & Ge, S. J. (2009). Effective and robust partial nitrification to nitrite by real-time aeration duration control in an SBR treating domestic wastewater. *Process Biochemistry*, 44(9), 979-985. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.022>
- Huiliñir, C., Aspé, E., & Roeckel, M. (2011). Modeling of the denitrification/anaerobic digestion process of salmon fishery wastewater in a biofilm tubular reactor. *Journal of Environmental Management*, 92(6), 1591-1608. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.01.015>
- Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263-276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Malone, T. C., & Newton, A. (2020). The Globalization of Cultural Eutrophication in the Coastal Ocean: Causes and Consequences. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00670>
- Massara, T. M., Malamis, S., Guisasola, A., Baeza, J. A., Noutsopoulos, C., & Katsou, E. (2017). A review on nitrous oxide (N₂O) emissions during biological nutrient removal from municipal wastewater and sludge reject water. *Science of The Total Environment*, 596-597, 106-123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.191>
- Mery, C. (2011). *Evaluation of natural zeolite as microorganism support medium in nitrifying batch reactors: Influence of zeolite particle size*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Vol 47, No 3*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934529.2012.646129>
- Montalvo, S., Huiliñir, C., Gálvez, D., Roca, N., & Guerrero, L. (2016). Autotrophic denitrification with sulfide as electron donor: Effect of zeolite, organic matter and temperature in batch and continuous UASB reactors. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.022>
- Moya, J., Huiliñir, C., Peredo, K., Aspé, E., & Roeckel, M. (2012). Modeling of simultaneous denitrification – Anaerobic digestion – Organic matter aerobic oxidation and nitrification in an

anoxic–anaerobic–aerobic compact filter reactor. *Journal of Biotechnology*, 160(3-4), 176-188. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.020>

Oh, J., & Silverstein, J. (1999). Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Water Research*, 33(8), 1925-1937. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00365-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00365-0)

Palominos, N., Pagés-Díaz, J., Tello, M., Guerrero, L., & Huiliñir, C. (2025). Sequential nitrification/mixotrophic denitrification process in single bioreactor: Performance and microbiology of two types of sequencing batch bioreactors. *Bioresource Technology*, 438, 133200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.133200>

Pang, Y., & Wang, J. (2021). Various electron donors for biological nitrate removal: A review. *Science of The Total Environment*, 794, 148699. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148699>

Peirano, C., Guerrero, L., Barahona, A., Montalvo, S., Huiliñir, C., 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 & Biotechnology*, 95(3), 631-638. <https://doi.org/10.1002/jctb.6244>

Puriel Hernandez, A. D. J. (2019). *NIRIFICACIÓN DESNITRIFICACIÓN SIMULTANEA EN UN BIOFILTRO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL MARINA*. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/9633>

Ramírez, M. (2007). *Viabilidad de un proceso para la eliminación conjunta de H₂S y NH₃ contenido en efluentes gaseosos*.

Rodríguez, M. Á. E., Bolaños, O. B., Aguirre, M. O., & Millán, A. H. (2014). *Evaluación de la nitrificación a través de perfiles operacionales en un reactor aerobio*.

Rojas, N. (2017). *UNIVERSIDAD DE CHILE*.

Sam, K. (2021, junio 20). *Aprovechar el poder de los microorganismos en el tratamiento de aguas residuales mediante biopelículas*. <https://organicabiotech.com/es/harnessing-the-power-of-microorganisms-in-wastewater-treatment-using-biofilms/>

Senila, L., Hoaghia, A., Moldovan, A., Török, I. A., Kovacs, D., Simeanu, D., Tomoiag, C. H., & Senila, M. (2022). The Potential Application of Natural Clinoptilolite-Rich Zeolite as Support for Bacterial Community Formation for Wastewater Treatment. *Materials*, 15(10), 3685. <https://doi.org/10.3390/ma15103685>

Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S. E., Fetzer, I., Bennett, E. M., Biggs, R., Carpenter, S. R., de Vries, W., de Wit, C. A., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G. M., Persson, L. M., Ramanathan, V., Reyers, B., & Sörlin, S. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science*, 347(6223), 1259855. <https://doi.org/10.1126/science.1259855>

Sun, Y., Qaisar, M., Wang, K., Lou, J., Li, Q., & Cai, J. (2021). Production and characteristics of elemental sulfur during simultaneous nitrate and sulfide removal. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(27), 36226-36233. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13269-y>

Ward, M. H., Jones, R. R., Brender, J. D., De Kok, T. M., Weyer, P. J., Nolan, B. T., Villanueva, C. M., & Van Breda, S. G. (2018). Drinking Water Nitrate and Human Health: An Updated Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7), 1557. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071557>

Xie, W.-M., Ni, B.-J., Zeng, R. J., Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Song, J., Le, D.-Z., Bi, X.-J., Liu, C.-Q., & Yang, M. (2010). Formation of soluble microbial products by activated sludge under anoxic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 373-382. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2563-x>

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(15), 6527-6536. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6532-2>

Yan, L., Zhang, M., Liu, Y., Liu, C., Zhang, Y., Liu, S., Yu, L., Hao, G., Chen, Z., & Zhang, Y. (2019). Enhanced nitrogen removal in an aerobic granular sequencing batch reactor under low DO

concentration: Role of extracellular polymeric substances and microbial community structure. *Bioresource Technology*, 289, 121651. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121651>

Zhang, N., He, Y., Yi, X., Yan, Y., & Xu, W. (2022). Rapid start-up of autotrophic shortcut nitrification system in SBR and microbial community analysis. *Environmental Technology*, 43(27), 4363-4375. <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1950213>

Anexos:

A. Procedimientos Analíticos

Las muestras se extrajeron desde los reactores al inicio y al término de las etapas nitrificante y desnitrificante, según correspondiera. Previo a cada análisis, las muestras fueron homogenizadas y, cuando fue necesario, diluidas o filtradas para evitar interferencias asociadas a sólidos suspendidos. Las concentraciones obtenidas mediante métodos espectrofotométricos se calcularon a partir de curvas de calibración preparadas con soluciones patrón y se corrigieron según el factor de dilución aplicado.

A.1 Determinación de nitrógeno amoniacal

La concentración de nitrógeno amoniacal se determinó mediante el método del fenato, de acuerdo con el método 4500-NH₃ F de *Standard Methods* (APHA, 2017). El método se basa en la reacción del amonio con fenol e hipoclorito en presencia de nitroprusiato de sodio como catalizador, generando indofenol, compuesto de color azul cuya intensidad es proporcional a la concentración de amonio presente en la muestra.

Las muestras acondicionadas se hicieron reaccionar con los reactivos correspondientes y se mantuvieron en reposo a luz tenue hasta el desarrollo de color. Posteriormente, se midió su absorbancia a una longitud de onda de 635 [nm] mediante espectrofotometría UV-Visible.

La concentración de nitrógeno amoniacal se obtuvo a partir de la curva de calibración, mediante la siguiente expresión:

$$\text{Concentración de N-NH}_4^+ [\text{mg N/L}] = FD \times (\text{Absorbancia} - b) / m$$

donde *FD* corresponde al factor de dilución, *m* a la pendiente de la curva de calibración y *b* al intercepto.

A.2 Determinación de nitrito

El nitrito se determinó mediante el método colorimétrico 4500-NO₂⁻ B de *Standard Methods* (APHA et al., 2017). En medio ácido, el nitrito reacciona con sulfanilamida y posteriormente con N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato, formando un colorante azo de tonalidad rojiza-púrpura.

Luego del tiempo de reacción, la absorbancia de las muestras se midió a 543 [nm]. La concentración se calculó mediante la curva de calibración y el factor de dilución aplicado:

$$\text{Concentración de N-NO}_2^- [\text{mg N/L}] = FD \times (\text{Absorbancia} - b) / m$$

A.3 Determinación de nitrato

La concentración de nitrato se determinó mediante el método de detección espectrofotométrica ultravioleta, correspondiente al método 4500-NO₃⁻ B de *Standard Methods* (APHA et al., 2017). Este método se basa en la absorción del nitrato a 220 [nm]. Debido a que algunos compuestos orgánicos también pueden absorber a esta longitud de onda, se realizó una medición adicional a 275 [nm] para corregir dicha interferencia. Las muestras fueron acidificadas y posteriormente analizadas mediante espectrofotometría UV-Visible. La absorbancia corregida se calculó de acuerdo con:

$$\text{Absorbancia corregida} = \text{Abs}_{220} - 2 \times \text{Abs}_{275}$$

La concentración de nitrato se obtuvo utilizando la curva de calibración correspondiente:

$$\text{Concentración de N-NO}_3^- \text{ [mg N/L]} = \text{FD} \times (\text{Absorbancia corregida} - b) / m$$

A.4 Determinación de sulfuro

La concentración de sulfuro se determinó mediante un electrodo selectivo de sulfuro. Las muestras se acondicionaron con solución antioxidante para sulfuro (SAOB), la cual permite mantener el sulfuro en una forma adecuada para su medición y disminuye la interferencia de especies metálicas presentes en la muestra.

La muestra acondicionada se mantuvo bajo agitación y la concentración se registró una vez estabilizada la lectura del electrodo. La cuantificación se realizó a partir de la curva de calibración elaborada con soluciones estándar de sulfuro.

Los resultados se expresaron en la misma base utilizada en el desarrollo de la memoria, como concentración de sulfuro [mg S/L] o [mg/L], según correspondiera.

A.5 Determinación de sulfato

El sulfato se determinó mediante el método turbidimétrico 4500-SO₄²⁻ E de *Standard Methods* (APHA et al., 2017). El principio del método consiste en la reacción entre los iones sulfato y el cloruro de bario en medio ácido, formando una suspensión de sulfato de bario.

La turbidez generada es proporcional a la concentración de sulfato presente en la muestra.

A cada muestra acondicionada se adicionó solución acondicionadora y cloruro de bario. Posteriormente, la absorbancia se midió a 420 [nm] dentro del tiempo de reacción establecido. La concentración se determinó a partir de una curva de calibración:

$$\text{Concentración de S-SO}_4^{2-} \text{ [mg S/L]} = \text{FD} \times (\text{Absorbancia} - b) / m$$

A.6 Determinación de carbono orgánico total, carbono inorgánico y nitrógeno total

El carbono orgánico total (COT), el carbono inorgánico (IC) y el nitrógeno total (TN) se determinaron mediante un analizador multi N/C 3100 de Analytik Jena. Las mediciones se realizaron en muestras de afluente y efluente de la etapa desnitrificante, con el propósito de evaluar el consumo de materia orgánica y el comportamiento global del nitrógeno durante la operación.

El equipo opera mediante oxidación a alta temperatura. Para la determinación de carbono total, los compuestos carbonados presentes en la muestra son transformados a dióxido de carbono, el cual es cuantificado por el sistema de detección del equipo. El IC se determina mediante acidificación de la muestra y liberación de dióxido de carbono proveniente de las especies inorgánicas de carbono. El COT se calculó por diferencia entre el carbono total y el carbono inorgánico:

$$\text{COT [mg C/L]} = \text{CT [mg C/L]} - \text{IC [mg C/L]}$$

El TN se determinó a partir de la señal de nitrógeno obtenida luego de la oxidación de la muestra, utilizando la metodología de calibración configurada en el equipo. Los resultados se expresaron como COT e IC [mg C/L] y TN [mg N/L].

A.7 Determinación de sólidos suspendidos volátiles

La concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinó gravimétricamente, según el método 2540 E de *Standard Methods* (APHA et al., 2017). Una muestra homogenizada se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio previamente acondicionado. El filtro con el residuo retenido se secó a una temperatura entre 103 y 105 [°C] hasta obtener masa constante. Posteriormente, se calcinó a 550 [°C] y se volvió a pesar.

La pérdida de masa producida durante la calcinación se asoció a la fracción volátil de los sólidos suspendidos. La concentración de SSV se calculó de acuerdo con:

$$\text{SSV [mg/L]} = (M_{105} - M_{550}) \times 1.000 / V$$

donde M_{105} corresponde a la masa del filtro con residuo seco a 103–105 [°C], M_{550} a la masa posterior a la calcinación y V al volumen de muestra filtrado [mL].

A.8 Medición de pH y oxígeno disuelto

El pH y el oxígeno disuelto (OD) se midieron directamente en los reactores mediante electrodos específicos previamente calibrados. Las mediciones se realizaron introduciendo

el sensor en el licor de mezcla y esperando la estabilización de la señal antes de registrar el valor.

El pH se utilizó como parámetro de control de las condiciones químicas del sistema. Por su parte, el OD se monitoreó al inicio y al término de las etapas de operación, con el propósito de verificar las condiciones aerobias durante la nitrificación y la disminución del oxígeno residual antes de la etapa desnitrificante. Los resultados se expresaron en unidades de pH y [mg O₂/L], respectivamente.

B. Test ADA y ADH

Los ensayos de actividad desnitrificante autótrofa (ADA) y heterótrofa (ADH) se realizaron para evaluar la capacidad de la biomasa de reducir nitrito en condiciones anóxicas, utilizando diferentes donadores de electrones.

Previamente al ensayo, el inóculo extraído desde cada reactor se lavó con solución tampón para reducir la presencia de compuestos residuales. Posteriormente, la biomasa se incorporó en viales cerrados, manteniendo una fase líquida y un espacio de cabeza para permitir la acumulación del nitrógeno gaseoso generado durante la desnitrificación. Antes de iniciar cada ensayo, el oxígeno presente en el sistema fue desplazado mediante el uso de un gas inerte.

En el ensayo ADA se utilizó nitrito como aceptor de electrones y sulfuro de sodio como donador de electrones, con el propósito de evaluar la actividad de microorganismos desnitrificantes autótrofos. En el ensayo ADH se utilizó nitrito como aceptor de electrones y acetato como donador de electrones, permitiendo evaluar la actividad de microorganismos desnitrificantes heterótrofos.

La generación de nitrógeno gaseoso se determinó mediante el aumento de presión en el espacio de cabeza del vial, registrado en función del tiempo. La mayor pendiente de la curva presión-tiempo se utilizó para calcular la tasa máxima de generación de nitrógeno, aplicando la ley de los gases ideales:

$$dnN_2/dt = (Vg / R \cdot T) \times dP/dt$$

donde Vg corresponde al volumen de gas en el vial [L], R a la constante de los gases ideales, T a la temperatura absoluta [K] y dP/dt a la pendiente de presión obtenida experimentalmente. Finalmente, la actividad desnitrificante se expresó en función de la biomasa presente en el vial:

$$AD [g N/(g SSV \cdot d)] = (dnN_z/dt \times 28 \times 1.440) / (X \times VI)$$

donde X corresponde a la concentración de biomasa [g SSV/L] y VI al volumen de fase líquida en el vial [L].

C. Propiedades de la zeolita

Las principales propiedades de la zeolita utilizada se presentan en la Tabla 6.1

Tabla 6.1 Caracterización de zeolita natural "Zeomaule". Fuente: (Zeomaule, 2023)

Identificación del producto	
Nombre	Zeolita natural
Marca registrada	Fertosa
Descripción	Zeolita natural clinoptilolita-mordenita granulada
Nombre químico	Aluminosilicatos cálcico potásico magnésico hidratado
Características mineralógicas	
Componente principal de la zeolita	Clinoptilolita-mordenita
Otros componentes	Plagioclasa, esmectita y cuarzo
Color	Marfil
Características fisicoquímicas	
Composición química	SiO ₂ : 64,19 TiO ₂ : 0,51 Al ₂ O ₃ : 11,65 Fe ₂ O ₃ : 2,53 MnO: 0,03 MgO: 0,66 CaO: 3,42 Na ₂ O: 0,75 K ₂ O: 1,60 P ₂ O ₅ : 0,03 P×C: 14,64
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	86,82 a 112,88 cmol/kg
Superficie específica, método BET	446 a 480 m ² /g
Estabilidad térmica	< 450 °C
Estabilidad química, pH	8,9

D. Balance de nitrógeno

Tabla 6.2. Balance de Nitrógeno RC etapa A

RC Etapa A			
Ciclo	Afluente [mg N/L]	Efluente [mg N/L]	Balance
1	60,77	53,04	-7,73
2	62,51	60,95	-1,55
3	66,64	58,16	-8,48

4	64,67	55,90	-8,77
5	72,58	63,57	-9,01
6	52,77	41,14	-11,63
7	37,27	5,18	-32,10
8	36,71	32,34	-4,37
9	34,26	30,77	-3,48
10	37,64	37,24	-0,39
11	36,43	37,16	0,73
12	30,13	28,06	-2,07
13	27,28	28,46	1,18
14	30,75	22,49	-8,26
15	24,76	15,21	-9,56
16	18,08	5,74	-12,34
17	13,13	6,15	-6,98
18	12,60	4,87	-7,73
19	17,64	4,48	-13,16
20	18,49	7,24	-11,25
21	17,99	10,39	-7,60
22	25,14	24,13	-1,01
23	16,55	20,77	4,22
24	21,08	19,75	-1,33
25	26,00	21,96	-4,04
26	27,68	23,50	-4,18
27	28,27	21,16	-7,12
28	21,82	15,80	-6,02
29	18,88	8,56	-10,32
30	20,26	10,58	-9,68
31	19,83	17,35	-2,48
32	20,13	19,56	-0,56
33	31,55	34,44	2,89
34	25,08	12,93	-12,15
35	15,96	11,65	-4,31
36	16,44	13,13	-3,31
37	21,00	18,35	-2,65
38	23,72	17,76	-5,96
39	22,63	19,19	-3,44
40	22,32	19,69	-2,62
41	26,23	12,68	-13,55
42	22,76	6,09	-16,66
43	19,75	12,86	-6,89
44	23,73	11,96	-11,78

45	23,25	9,18	-14,08
46	22,93	8,79	-14,14
47	21,32	12,90	-8,42
48	22,04	39,79	17,74

Tabla 6.3 Balance de Nitrógeno RC etapa B

RC Etapa B			
Ciclo	Afluente [mg N/L]	Efluente [mg N/L]	Balance
1	186,56	21,90	-164,67
2	76,67	25,91	-50,76
3	71,67	34,27	-37,40
4	61,67	35,61	-26,06
5	70,91	35,01	-35,89
6	46,10	29,10	-17,00
7	72,13	42,23	-29,90
8	80,79	39,49	-41,30
9	74,11	42,97	-31,13
10	71,56	37,94	-33,62
11	66,59	44,55	-22,05
12	68,68	42,04	-26,64
13	62,97	30,89	-32,08
14	64,22	35,03	-29,20
15	38,28	25,41	-12,87
16	26,37	29,37	3,00
17	60,56	42,30	-18,27
18	49,90	47,72	-2,18
19	53,22	52,46	-0,75
20	52,87	59,84	6,97
21	67,35	53,45	-13,90
22	56,10	46,06	-10,04
23	49,52	41,87	-7,65
24	48,73	47,93	-0,80
25	48,83	43,92	-4,92
26	77,54	40,21	-37,32
27	55,84	42,49	-13,35
28	55,80	39,21	-16,59
29	47,67	33,81	-13,85
30	55,93	32,61	-23,32
31	48,20	33,38	-14,82

Tabla 6.4 Balance de Nitrógeno RZ etapa A

RZ Etapa A			
Ciclo	Afluente [mg N/L]	Efluente [mg N/L]	Balance
1	43,93	7,05	-36,88
2	60,65	17,90	-42,76
3	140,61	26,62	-113,99
4	52,90	26,25	-26,66
5	53,18	23,27	-29,91
6	67,33	36,26	-31,07
7	80,10	43,14	-36,96
8	76,92	34,75	-42,17
9	64,15	46,40	-17,74
10	72,72	47,58	-25,15
11	65,07	50,39	-14,68
12	66,93	27,73	-39,20
13	66,44	43,21	-23,23
14	78,70	47,04	-31,65
15	75,72	16,03	-59,69
16	64,45	2,43	-62,03
17	63,21	18,94	-44,27
18	6,45	24,58	18,13
19	53,07	24,29	-28,78
20	64,16	23,01	-41,14
21	60,84	21,48	-39,36
22	60,99	18,08	-42,91
23	70,18	17,28	-52,91
24	84,69	25,20	-59,49
25	61,28	20,60	-40,67
26	89,29	4,23	-85,06
27	59,43	16,18	-43,24
28	52,18	16,39	-35,79
29	55,97	4,82	-51,15
30	44,28	6,82	-37,46
31	70,02	14,86	-55,16
32	89,33	21,65	-67,68
33	168,50	82,87	-85,64
34	87,95	55,16	-32,79
35	76,63	51,87	-24,76
36	65,17	36,26	-28,91
37	65,27	30,08	-35,19
38	74,75	43,38	-31,37

39	80,60	45,25	-35,35
40	85,97	39,11	-46,86
41	60,61	43,25	-17,36
42	84,67	47,91	-36,76
43	76,17	45,66	-30,50
44	73,22	50,80	-22,42
45	68,84	54,29	-14,55
46	68,39	52,83	-15,56
47	169,52	45,73	-123,79
48	74,47	50,56	-23,91
49	57,92	0,70	-57,22

Tabla 6.5 Balance de Nitrógeno RZ etapa A

RZ Etapa B			
Ciclo	Afluente [mg N/L]	Efluente [mg N/L]	Balance
1	114,37	55,74	-58,63
2	84,19	74,42	-9,77
3	100,85	77,91	-22,94
4	102,98	94,70	-8,28
5	114,10	85,88	-28,22
6	91,32	76,40	-14,92
7	99,88	76,85	-23,03
8	96,89	41,66	-55,23
9	74,00	46,62	-27,38
10	79,43	47,27	-32,16
11	76,75	44,94	-31,81
12	72,49	39,98	-32,51
13	71,76	40,95	-30,80
14	75,86	44,78	-31,08
15	60,38	44,61	-15,77
16	50,87	56,85	5,98
17	57,02	50,61	-6,41
18	60,20	56,66	-3,54
19	52,69	56,06	3,37
20	52,45	69,21	16,76
21	65,32	54,98	-10,33
22	59,13	68,44	9,31
23	52,20	46,28	-5,92
24	56,98	55,98	-1,00
25	56,61	31,93	-24,68
26	46,30	25,43	-20,87

27	49,73	28,73	-21,00
28	44,38	25,08	-19,29
29	44,20	29,64	-14,57
30	47,21	25,54	-21,68
31	43,29	25,22	-18,07

E. Balance de azufre

Tabla 6.6 Balance de azufre RC etapa A

RC Etapa A			
Ciclo	Afluente [mg S/L]	Efluente [mg S/L]	Balance
1	16,76	2,19	-14,57
2	5,30	1,11	-4,19
3	15,30	1,01	-14,29
4	1,12	1,10	-0,02
5	3,64	0,81	-2,83
6	10,57	0,82	-9,75
7	11,72	0,73	-11,00
8	16,82	0,75	-16,06
9	55,76	0,74	-55,02
10	17,74	0,74	-16,99
11	2,49	0,75	-1,74
12	3,14	0,76	-2,38
13	1,92	2,19	0,28
14	9,92	0,74	-9,19
15	38,28	0,76	-37,53
16	173,40	0,77	-172,63
17	78,37	0,74	-77,63
18	261,22	0,96	-260,26
19	123,42	1,21	-122,21
20	59,43	0,77	-58,66
21	106,61	0,74	-105,87
22	17,62	0,72	-16,90
23	18,26	0,73	-17,53
24	29,30	1,10	-28,19
25	6,05	1,51	-4,54
26	1,36	1,38	0,02
27	7,48	1,40	-6,07
28	7,35	0,87	-6,47
29	139,45	0,74	-138,71
30	1,59	1,27	-0,32
31	1,40	0,75	-0,65

32	0,80	0,64	-0,15
33	65,25	0,85	-64,39
34	7,95	0,74	-7,20
35	27,75	0,59	-27,15
36	0,62	0,61	-0,01
37	20,56	0,68	-19,88
38	7,67	0,59	-7,08
39	21,12	0,57	-20,55
40	41,50	0,60	-40,89
41	0,61	0,57	-0,04
42	16,83	0,62	-16,21
43	69,73	0,65	-69,08
44	38,91	0,64	-38,27
45	69,26	0,66	-68,61
46	5,28	0,66	-4,62
47	104,57	0,67	-103,89
48	107,00	0,65	-106,36

Tabla 6.7 Balance de azufre RC etapa B

RC Etapa B			
Ciclo	Afluente [mg S/L]	Efluente [mg S/L]	Balance
1	19,17	2,01	-17,16
2	8,46	1,62	-6,83
3	13,61	1,81	-11,80
4	15,62	1,62	-14,01
5	42,51	1,76	-40,75
6	36,69	1,27	-35,42
7	34,41	1,15	-33,26
8	63,69	1,15	-62,55
9	59,72	1,17	-58,54
10	88,71	1,46	-87,25
11	33,71	1,23	-32,48
12	102,48	1,17	-101,31
13	44,72	1,17	-43,55
14	38,99	1,44	-37,55
15	31,07	0,56	-30,51
16	3,32	0,61	-2,71
17	4,74	0,57	-4,17
18	1,34	0,56	-0,78
19	0,56	0,56	-0,01
20	2,77	1,11	-1,66

21	2,79	1,21	-1,58
22	0,59	1,13	0,55
23	0,61	0,56	-0,05
24	0,85	0,55	-0,30
25	11,21	0,56	-10,65
26	4,46	0,55	-3,91
27	22,43	0,55	-21,88
28	26,80	0,55	-26,25
29	21,95	0,55	-21,40
30	26,90	0,55	-26,35
31	30,55	0,55	-30,00

Tabla 6.8 Balance de azufre RZ etapa A

RZ Etapa A			
Ciclo	Afluente [mg S/L]	Efluente [mg S/L]	Balance
1	139,49	11,93	-127,55
2	89,07	13,25	-75,82
3	39,66	23,00	-16,66
4	53,59	24,99	-28,61
5	68,11	2,58	-65,53
6	93,18	2,66	-90,52
7	94,37	2,74	-91,63
8	68,68	33,58	-35,10
9	94,80	35,07	-59,74
10	95,30	17,55	-77,75
11	28,57	17,05	-11,52
12	45,42	4,36	-41,06
13	56,21	3,37	-52,84
14	59,07	4,09	-54,98
15	135,18	21,88	-113,31
16	752,72	51,95	-700,76
17	698,81	14,44	-684,37
18	576,49	72,48	-504,02
19	434,58	10,59	-424,00
20	328,78	13,73	-315,04
21	483,64	27,28	-456,36
22	320,59	9,15	-311,43
23	622,91	11,96	-610,95
24	423,13	9,32	-413,81
25	374,91	11,69	-363,22
26	275,44	23,42	-252,02

27	505,03	53,72	-451,31
28	235,74	36,81	-198,93
29	209,52	8,27	-201,25
30	183,04	15,71	-167,33
31	48,87	2,93	-45,94
32	191,48	4,58	-186,90
33	209,23	3,32	-205,92
34	4,21	2,16	-2,05
35	191,10	3,32	-187,78
36	128,73	3,92	-124,81
37	170,12	2,65	-167,47
38	81,08	0,73	-80,36
39	59,71	0,73	-58,99
40	74,34	1,61	-72,73
41	4,58	1,44	-3,14
42	101,81	1,83	-99,98
43	54,69	1,99	-52,69
44	57,31	2,16	-55,15
45	164,80	6,35	-158,45
46	206,07	110,60	-95,47
47	58,29	3,50	-54,78
48	127,98	0,73	-127,25

Tabla 6.9 Balance de azufre RZ etapa B

RZ Etapa A			
Ciclo	Afluente [mg S/L]	Efluente [mg S/L]	Balance
1	8,93	1,62	-7,31
2	3,22	1,53	-1,69
3	17,58	1,54	-16,04
4	36,75	1,46	-35,29
5	42,54	1,39	-41,14
6	33,64	1,25	-32,38
7	11,38	0,57	-10,81
8	39,38	1,21	-38,18
9	36,24	0,57	-35,67
10	62,83	0,73	-62,11
11	35,08	0,59	-34,49
12	85,58	0,56	-85,01
13	47,95	0,59	-47,37
14	52,81	0,60	-52,21
15	37,48	1,14	-36,33

16	29,16	1,45	-27,71
17	2,02	1,19	-0,83
18	1,16	1,13	-0,03
19	1,15	1,17	0,02
20	1,25	1,34	0,09
21	1,14	1,13	-0,01
22	1,12	1,17	0,05
23	6,27	1,11	-5,16
24	6,20	1,21	-4,99
25	18,49	1,15	-17,34
26	5,34	0,56	-4,78
27	26,19	0,58	-25,61
28	29,07	0,70	-28,38
29	26,56	0,60	-25,96
30	41,37	0,59	-40,78
31	42,64	0,83	-41,82