UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

VALPARAÍSO – CHILE

"PUESTA EN MARCHA DE UN REACTOR ANAEROBIO DE LECHO FIJO CON FLUJO ASCENDENTE PARA REMOVER AZUFRE, NITRATO Y MATERIA ORGÁNICA A TRAVÉS DE LA DESNITRIFICACIÓN SIMULTÁNEA."

SILVINA JOSÉ MORAGA SILVA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE

INGENIERO CIVIL AMBIENTAL

PROFESOR GUÍA: DRA. LORNA GUERRERO S.

PROFESOR CORREFERENTE: M.Cs. ANDREA BARAHONA Ll.

NOVIEMBRE 2016

Soñar es el primer paso para lograr el "Futuro que queremos".

***United Nations Environment Programme* (*UNEP*)**.

AGRADECIMIENTOS

A mis tres pilares en la vida, mi madre, hermana y abuelita, por estar siempre apoyándome. Especialmente a mi madre, Silvina, por ser mi ejemplo de vitalidad, constancia y esfuerzo.

Agradecer a la Universidad Federico Santa María por haberme acogido como alumna y haberme formado profesionalmente, junto al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental con su cuerpo docente y sus funcionarios, que a diario nos hacen sentir parte de la gran familia del LOU.

Especialmente quiero agradecer a la profesora Lorna Guerrero por darme la oportunidad de realizar este trabajo en el proyecto Fondecyt 1130108-2013, como también agradezco a Andrea, Paloma y a todo el equipo del laboratorio de RILEs por su apoyo, compañía y amistad en esta etapa.

A Francisco por su apoyo durante los momentos difíciles, por el amor y hacer mis días más felices con la hermosa relación que hemos formado.

Agradezco también a Toti, María Paz, Clau, Gabriel, Karincita, Seba Marín, Silvi, Javier, Nicol, Javi, Vania, Ro, Pipe, Natis, por todos los bellos momentos y la amistad que me regalaron.

A mis ambientalisimos, porque con ustedes aprendí que el mundo tiene mil y un puntos de vista, que nuestra voz vale y que podemos cambiar el mundo con nuestras acciones.

RESUMEN

El presente estudio nace a raíz de una problemática ambiental actual, donde las industrias de pulpa y papel, plantas petroquímicas, curtiembres, residuos agrícolas, entre otras, están generando residuos líquidos ricos en nitrógeno, materia orgánica y azufre. La descarga de estos contaminantes a cuerpos de aguas superficiales provocan serios problemas medioambientales atribuidos a la toxicidad para organismos acuáticos, como también la eutrofización de lagos, ríos y problemas a la salud de las personas.

Una alternativa de tratamiento previo a la descarga es el tratamiento biológico, debido a su bajo impacto al medio ambiente y costos de operación reducidos. La remoción de nitrógeno se logra mediante la nitrificación-desnitrificación, donde en el caso de la desnitrificación los microorganismos heterótrofos o autótrofos son los encargados de realizar la reducción de compuestos nitrogenados. Los heterótrofos oxidan la materia orgánica a CO_2 gaseoso, reduciendo el nitrato a N_2 gaseoso. Por su parte los microorganismos autótrofos oxidan los compuestos reducidos de azufre, reduciendo el nitrato. El realizar ambos procesos en simultáneo se convierte en una alternativa atractiva para remover nitrógeno, azufre y materia orgánica a la vez.

El objetivo del presente estudio, es lograr la puesta en marcha de un reactor de lecho fijo ascendente (UAF), mediante la desnitrificación simultánea autótrofa –heterótrofa para la remoción simultánea de nitrato, azufre y materia orgánica, utilizando zeolita chilena como medio de soporte microbiano en condiciones anóxicas, enmarcándose en el Proyecto Fondecyt N°1130108, "*Simultaneous bio-elimination of nitrogen and sulphur in the presence and absence of complex organic matter*".

Se realizó la puesta en marcha durante 61 días, de los cuales 35 días se opera en *fed batch* y los 26 días restantes se mantiene al reactor UAF operando en forma continua, el cual tiene un volumen total de 0,8 L, es mantenido a 35°C ± 2°C y alimentado por un agua residual sintética, a una relación S/N de 4,6 y una relación C/N de 3. En la operación continua se alcanzan remociones de nitrógeno de 99,91%, de azufre de 96,51% y de materia orgánica de 98,21% a VCN 0,02 $N\text{-}NO_3^-/m^3/d$. El pH se mantuvo dentro de los rangos adecuados para la desnitrificación simultánea autótrofa-heterótrofa de 8 ± 0,3.

La puesta en marcha del reactor se concluye cuando se alcanza la VCN 0,1 $N\text{-}NO_3^-/m^3/d$ con un 99,18% de remoción de nitrato, 12% de remoción de tiosulfato y 89,74% de remoción de acetato, siendo el parámetro de atención el tiosulfato, ya que, al encontrarse en un 60% de exceso en el agua residual sintética, no se está oxidando completamente a sulfato, posiblemente debido al efecto de la inhibición por sustrato, porque se favorece la producción de intermediarios de reacción en la desnitrificación, como azufre elemental o sulfito, como también se puede atribuir a que los microorganismos fijan a la biomasa compuestos de nitrógeno y azufre que utilizan para su crecimiento.

La principal recomendación para continuar con la operación del reactor, es que se modifique la relación S/N, de manera que sea cercana a la estequiométrica para reducir el porcentaje en exceso del tiosulfato en el agua residual sintética de alimentación al reactor UAF.

INDICE

Agradecimientos iii
RESUMEN iv
Indice v
Índice de Figuras vi
Índice de tablas vii
Capítulo 1: Introducción y Objetivos 1
1.1 Introducción 1
1.2 Objetivos 2
Capítulo 2: Marco Teórico o Antecedentes 3
2.1 La contaminación de las aguas residuales 3
2.2 Procesos de tratamiento de las aguas residuales 9
2.3 Reactores anóxicos 19
2.4 Zeolita 22
Capítulo 3: Metodología 26
3.1 Enriquecimiento heterótrofo 26
3.2 Enriquecimiento autótrofo 27
3.3 Reactor UAF 27
3.4 Puesta en marcha 28
3.5 Parámetros de control y métodos analíticos 32
Capítulo 4: Resultados y Discusión 33
4.1 Enriquecimiento heterótrofo 33
4.2 Puesta en marcha 34
Capítulo 5: Conclusiones y Recomendaciones 44
5.1 Conclusiones 44
5.2 Recomendaciones 44
Capítulo 6: Bibliografía 46
ANEXOS 53
A.1 pH (APHA, 2012). 53
A.2 Método espectofotometrico uv-vis para determinación: nitratos (APHA, 2012). 53
A.3 Método turbidimetrico modificado sulfatos (Severiche y González, 2012) 55
A.4 Determinación de nitritos por método espectrofotométrico (APHA, 2012). 57

A.5 Determinación de DQO por espectrofotometría UV-visible (APHA, 2012)..... 59
A.6 Valoración óxido-redución: tiosulfatos (Harris, 2007) 61

Índice de Figuras

Figura II- 1 Ciclo del Nitrógeno 5
Figura II- 2 Ciclo del Azufre 6
Figura II- 3 Ciclo del Carbono 7
Figura II- 4 Normativa Ambiental de Residuos Industriales Líquidos en Chile 8
Figura II- 5 Tratamiento para efluentes líquidos industriales. 10
Figura II- 6 Interacciones Ciclo carbono, azufre y nitrógeno 17
Figura II- 7 Clasificación de sistemas anaerobio de interés, para: CSTR: reactor continuo agitado, SBR: reactor *batch* secuencial, DAF: filtro anaerobio de flujo descendente, PBR: reactor de lecho empacado, FBR: reactor de lecho fluidizado, UASB: reactor anaerobio de flujo ascendente, EGSB: reactor granular de lecho expandido, Contacto: reactor de contacto. 19
Figura II- 8 Esquema del filtro anaerobio 21

Figura III- 1 Esquema del Reactor de enriquecimiento heterótrofo 26
Figura III- 2 Configuración del reactor UAF 28
Figura III- 3 Diagrama de flujo de proceso (PFD) del sistema de DNA instalado 30
Figura III- 4 Configuración de los materiales en el reactor UAF 30

Figura IV- 1 Proceso de formación de la biopelícula: Enriquecimiento del reactor UAF en operación *fed batch, inóculo (a): día 1-5, acondicionamiento de la superficie (b): día 6-11, adherencia a la superficie (c): día 11-16, maduración de la biopelícula (d): día 17-24, desprendimiento de las bacterias en el relleno (e): día 25-35.* 34
Figura IV- 2 Comportamiento del pH en la etapa de enriquecimiento del reactor UAF. 35
Figura IV- 3 Remoción de nitrato en la etapa de enriquecimiento del reactor UAF. 35
Figura IV- 4 Concentración de nitrato y nitrito en la alimentación y efluente (nitrito solo en el efluente). 36
Figura IV- 5 Remoción tiosulfato en la etapa de enriquecimiento. 37
Figura IV- 6 Remoción de acetato en el enriquecimiento del reactor UAF. 37
Figura IV- 7 Comportamiento del pH con respecto a la VCN, en el reactor UAF 38
Figura IV- 8 Remoción de nitrato con respecto a la VCN 39
Figura IV- 9 Comportamiento del azufre en el efluente del reactor UAF. 40
Figura IV- 10 Remoción de tiosulfato según se varía la VCN 40
Figura IV- 11 Balance de masa de azufre en el reactor UAF 41
Figura IV- 12 Precipitado en el reactor 42
Figura IV- 13 Remoción de acetato en el reactor UAF 43

Índice de tablas

Tabla II- 1 Algunos compuestos e iones de nitrógeno. Modificado de Fortt (2014) 4
Tabla II- 2 Algunos compuestos e iones de azufre. Adaptado de Fortt (2014). 6
Tabla II- 3 Límites Máximo Permitido de Contaminantes según DS 90, DS 609 y DS 46 9
Tabla II- 4 Estudios previos de desnitrificación autótrofa y/o heterótrofa. 20
Tabla II- 5 Clasificación de poros de un soporte microbiano según su diámetro, (Muñoz, 2015). 23
Tabla II- 6 Composición de la zeolita natural chilena, Muñoz (2015). 25

Tabla III- 1 Agua residual sintética alimentación enriquecimiento heterótrofo, Peirano (2016). 26
Tabla III- 2 Micronutrientes enriquecimiento heterótrofo, Peirano (2016). 27
Tabla III- 3 Dimensiones del reactor UAF, Muñoz (2015). 27
Tabla III- 4 Inóculo del reactor UAF 29
Tabla III- 5 Materiales Reactor UAF, modificada de Muñoz (2015). 29
Tabla III- 6 Alimentación y Micronutrientes del reactor UAF, Aguirre (2014). 31
Tabla III- 7 Parámetros de la puesta en marcha 32
Tabla III- 8 Parámetros de control y métodos analíticos, Muñoz (2015). 32

Tabla IV- 1 Enriquecimiento de bacterias heterótrofas 33
Tabla IV- 2 Remoción de nitrato en el enriquecimiento heterótrofo 33
Tabla IV- 3 Parámetro de operación de la puesta en marcha 38

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Las actividades antropogénicas y los patrones de consumo de la sociedad actual, han llevado a que el recurso hídrico a nivel mundial se considere como un recurso escaso, declarándose para el 2025 que dos tercios de la población mundial estará viviendo en países en crisis de este recurso (FAO, 2014).

El agua dulce que se encuentra en fuentes naturales como ríos y lagos, es contaminada por aguas residuales provenientes de actividades industriales, agrícolas, asentamientos humanos, entre otras, con cargas de nitrógeno (N), azufre (S) y materia orgánica. Los compuestos nitrogenados como el amonio, contribuyen a la eutrofización de los lagos y ríos, además son tóxicos para los organismos acuáticos y generan malos olores (Reyes-Avila *et al.,* 2004). El nitrato genera severos problemas a la salud como la methemoglobinemia y la formación de carcinógenos en el estómago e intestino (Liu *et al.,* 2009).

Por otro lado, los compuestos reducidos de azufre como el ácido sulfhídrico, son severamente tóxicos para el hombre y muchos microorganismos, además son altamente corrosivos, dañando las estructuras, y poseen una alta demanda química de oxígeno (Beristain-Cardoso *et al.,* 2011; Reyes-Avila et al., 2004). Por estas razones se hace necesario remover este tipo de contaminantes de las aguas previo a su disposición final.

Hoy en día la investigación científica está centrada en desarrollar mejoras a las tecnologías existentes que dan solución estos problemas, con el fin de reducir los costos de inversión y operación en los procesos que eliminan por separado compuestos nitrogenados y sulfurados, en presencia o ausencia de materia orgánica.

Cuando los efluentes residuales contienen una mezcla de compuestos de nitrógeno y azufre, el proceso que resulta de interés para su eliminación es el proceso de desnitrificación autótrofa, ya que hace reaccionar estos compuestos para producir nitrógeno gaseoso (N_2). Este proceso es utilizado para desnitrificar nitrato y/o nitrito con un bajo o nulo contenido de materia orgánica en el agua residual. Sin embargo, en algunas aguas residuales existe una cantidad importante de materia orgánica (por ejemplo aquellas provenientes de digestores anaeróbicos), en estos casos se recomienda el uso de desnitrificación heterótrofa, pero no habrá eliminación de azufre. Por consiguiente, aparece

interesante ejecutar un proceso de desnitrificación autótrofa y heterótrofa simultánea (An *et al*., 2010; Tang *et al*., 2010; Li *et al*., 2009; Chen *et al*., 2008).

El proceso de la eliminación simultánea de nitrógeno, azufre y materia orgánica se lleva a cabo por bacterias desnitrificantes, del tipo β-proteobacterias, como *Thiobacillus denitrificans* que reducen nitratos o nitritos y oxidan compuestos de azufre inorgánico.

En cuanto a la tecnología usada para la desvitrificación simultanea se sabe que los reactores de biomasa fija o granular permiten concentraciones bacterianas más altas que los de biomasa dispersa suspendida, por ende, los primeros al adherir la biomasa a un soporte microbiano como la zeolita permiten también disminuir los tamaños de los reactores (Campos *et al*., 2009; Fajardo, 2011).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

El objetivo general de la presente memoria es realizar la puesta en marcha de un reactor de lecho fijo ascendente (UAF) para la desnitrificación simultánea, autótrofa y heterótrofa. Utilizando nitrato como fuente de N, tiosulfato como fuente de S y acetato como fuente de materia orgánica.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar el enriquecimiento de las bacterias heterótrofas para su posterior uso como inóculo al reactor UAF.
- Realizar la puesta en marcha del reactor UAF. En una primera etapa se opera con una estrategia *fed batch* para lograr la adherencia microbiana en el reactor UAF.
- La segunda etapa es la operación continua del reactor UAF a partir de una velocidad de carga nitrogenada (VCN) de 0,02 kg N/(m^3·d), hasta VCN 0,1 kg N/(m^3·d), utilizando una relación S/N de 4,6, C/N de 3, y una relación de microorganismos heterótrofos/autótrofos (H/A) de 0,54.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO O ANTECEDENTES

2.1 La contaminación de las aguas residuales

Las aguas residuales hoy en día vienen cargadas de una gran cantidad de contaminantes dependiendo de las diferentes actividades productivas que las generan. En la presente memoria será de interés estudiar la contaminación con nitrógeno, azufre y materia orgánica.

El nitrógeno en las aguas residuales está presente generalmente como amonio, nitrato y nitrito *(*Du *et al.,* 2015). El nitrato es el principal contaminante del agua de muchas áreas en el mundo, como Arabia Saudita, India, Reino Unido, América del Norte, Australia, Marruecos, Changshu en China y Toyserkan en el oeste de Irán (Mohseni-Bandpi *et al.,* 2013), por lo que estudiar la remoción de este contaminante del agua es un tema a nivel mundial.

La contaminación por nitratos es causada por el uso intensivo de fertilizantes nitrogenados, el riego de cultivos con aguas residuales domésticas y el uso de estiércol (Liu *et al.,* 2009), es decir, se trata de contaminación difusa. La descarga de este contaminante al medioambiente genera crecimiento excesivo de algas, crecimiento de microorganismos patógenos que generan malos olores, acumulación de biomasa y agotamiento del oxígeno disuelto (Du *et al.*, 2015). Además, afecta en la salud de las personas, debido a que su ingesta causa methemoglobinemia en infantes, enfermedad conocida como "Síndrome del bebé azul", y agente cancerígeno formando nitrosaminas en el estómago e intestino (Show *et al.,* 2013).

Por otro lado, se tiene la contaminación por azufre en las aguas residuales contaminadas por sulfuros de la industria de pulpa y papel, plantas petroquímicas, curtiembres, fábricas de rayón visibles (Jing *et al.,* 2009) y durante la digestión anaerobia de lodos y residuos agrícolas (Tang *et al.,*2009).

Las corrientes contaminadas requieren de un tratamiento debido a la naturaleza tóxica y corrosiva del ácido sulfhídrico (H_2S) sobre los recursos naturales, mientras que el dióxido de azufre contribuye la lluvia ácida afectando plantas, peces y otros seres vivos (Tang *et al.,* 2010). Liberar compuestos de azufre como el sulfuro (S^{-2}) al ecosistema produce un agotamiento del oxígeno debido a su alta demanda causando, malos olores y dañando el ecosistema incluso en bajas cantidades. (Li *et al.,* 2009).

Por su parte la contaminación del agua con materia orgánica se puede generar por vertidos urbanos, actividades ganaderas, así como por escurrimientos agrícolas e industriales. Consiste en componentes como: partículas macroscópicas, coloides o macromoléculas disueltas que pueden causar color, olor, sabor, el desarrollo de microorganismos patógenos o implicar la presencia de materia no biodegradable. La concentración de materia orgánica en el agua se determina directamente con la medida del carbono orgánico total (COT) e, indirectamente, midiendo la capacidad reductora del carbono existente con la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (Fuentes-Rivas *et al.,* 2015).

La remoción biológica de carbono, nitrógeno y azufre representa un área de investigación debido a los efectos tóxicos para la salud de las personas y los impactos que tienen en el medio ambiente.

2.1.1 Ciclo del nitrógeno, azufre y carbono

En la naturaleza el nitrógeno se presenta en diversas formas y estados de oxidación, siendo su principal fuente mineral el nitrato de sodio. En la Tabla II- 1, se muestran los compuestos formados por nitrógeno más importantes relacionados al ciclo natural del nitrógeno y al tratamiento de aguas (como contaminante).

Tabla II- 1 Algunos compuestos e iones de nitrógeno. Modificado de Fortt (2014)

Compuesto/ion	*Formula*	*Estado de oxidación*
Amoniaco	NH_3	-3
Ion Amonio	$NH_4{}^+$	-3
Nitrógeno molecular	N_2	0
Óxido Nitroso	N_2O	$+1$
Óxido Nítrico	NO	$+2$
Ion Nitrito	$NO_2{}^-$	$+3$
Dióxido de Nitrógeno	NO_2	$+4$
Ion Nitrato	$NO_3{}^-$	$+5$

Este ciclo, es un ciclo biogeoquímico muy importante en la incorporación de nutrientes al suelo y su reincorporación en la atmósfera. El nitrógeno es el compuesto con mayor presencia en la atmósfera

terrestre, ocupando el 78% del volumen en el aire y además es uno de los nutrientes fundamentales para las plantas y los microorganismos del suelo (Espinoza, 2012).

La transformación biológica de un estado a otro se lleva a cabo por diferentes microorganismos. En la Figura II- 1, se muestran las principales transformaciones biológicas como la fijación, amonificación, nitrificación y desnitrificación (Campos *et al.* 2009).

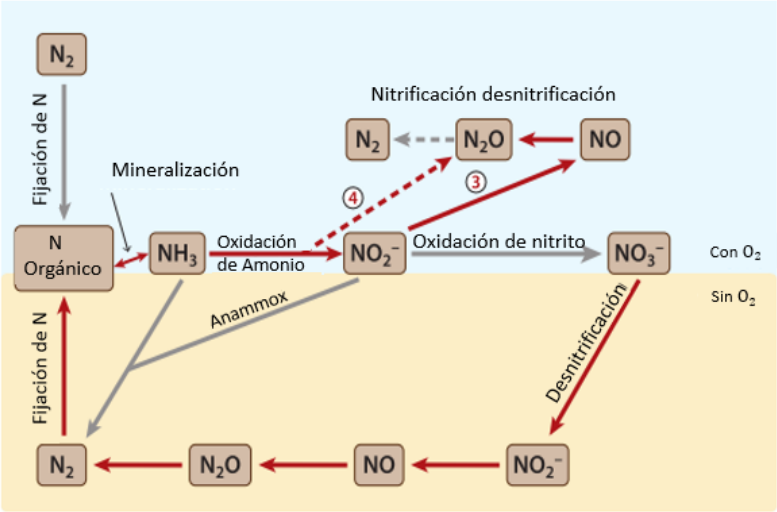

Figura II- 1 Ciclo del Nitrógeno
Fuente: (Offre *et al.,* 2013)

- **Fijación**: conversión de nitrógeno gaseoso en compuestos asimilables por las plantas. Este proceso puede ocurrir de manera biológica o por transformaciones fisicoquímicas mediante las reacciones del tipo electroquímico.
- **Amonificación**: es la degradación bioquímica de nitrógeno orgánico en amoníaco o de iones de amonio mediante bacterias heterótrofas, capaces de transformar el nitrógeno en presencia o ausencia de oxígeno.
- **Nitrificación**: es la oxidación biológica de ion amonio a nitrato mediante las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. El nitrato es utilizado por las plantas como fuente de nitrógeno o reducido a nitrógeno mediante el proceso de desnitrificación.
- **Desnitrificación**: es la transformación del nitrato a nitrógeno gaseoso en condiciones anóxicas. (OEHS, 2005)

En cuanto al azufre, éste se encuentra en la naturaleza almacenado como yeso ($CaSO_4$), sulfuros metálicos, sulfato (SO_4^{-2}), que es la forma de mayor biodisponibilidad, abundante en ambientes

marinos, azufre elemental (S), entre otros, que se formaron en diferentes periodos geológicos. (Lens y Kuenen, 2001). Es un elemento activo que se combina directamente con la mayor parte de los elementos conocidos. En la Tabla II- 2 se pueden ver los estados de oxidación en el que existe el S, tanto, positivos como negativos, formando compuestos iónicos, covalentes y covalentes coordinados.

Tabla II- 2 Algunos compuestos e iones de azufre. Adaptado de Fortt (2014).

Compuesto/ion	*Formula*	*Estado de oxidación*
Azufre Orgánico	$S_{organico}$	-2
Sulfuro	S^{-2}	-2
Disulfuro	$S_2{}^{-2}$	-1
Azufre Elemental	S^0	0
Ion Tiosulfato	$S_2O_3{}^{-2}$	$+2$
Ion Sulfito	$SO_3{}^{-2}$	$+4$
Sulfato	$SO_4{}^{-2}$	$+6$

El ciclo del azufre se muestra en la Figura II- 2. En el proceso biológico de reducción, actúan las bacterias reductoras de sulfato, capaces de utilizar compuestos oxidados de azufre, (SO_4^{-2}, $S_2O_3^{-2}$, SO_3^{-2}) como aceptor de electrones y compuestos orgánicos, tales como el lactato, etanol o propionato como donador de electrones. Este proceso se puede utilizar cuando existen elevadas concentraciones de sulfato o sulfito (Fajardo *et al.,* 2008).

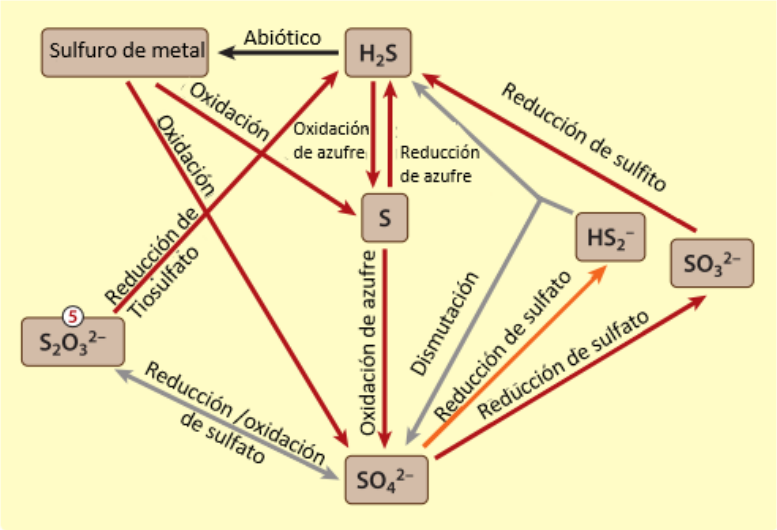

Figura II- 2 Ciclo del Azufre
Fuente: (Offre *et al.,* 2013)

El proceso de oxidación se realiza mediante las bacterias fotótrofas o quimiolitotróficas. Las primeras son capaces de oxidar sulfuro a azufre elemental y sulfato bajo condiciones limitante de sulfuro, para esto requieren condiciones anóxicas, luz, CO_2 y nutrientes inorgánicos. Del mismo modo, la oxidación de azufre elemental puede ser realizada por bacterias oxidadoras del azufre, sobre todo del género *Thiobacillus,* originando iones sulfato e hidrógeno, cerrando así el ciclo y equilibrio entre las especies (Janssen *et al.,* 2001).

En el ciclo del carbono la asimilación de carbono puede ser de manera autótrofa, es decir, asimilan carbono a partir de compuestos inorgánicos oxidados, como, dióxido de carbono (CO_2) o bicarbonato (HCO_3^-), reduciendo los sustratos para formar moléculas orgánicas simples, como se ve en la Figura II-3. Del mismo modo, se puede coasimilar pequeños compuestos orgánicos en condiciones adecuadas o cambiar entre un autótrofo a heterótrofo.

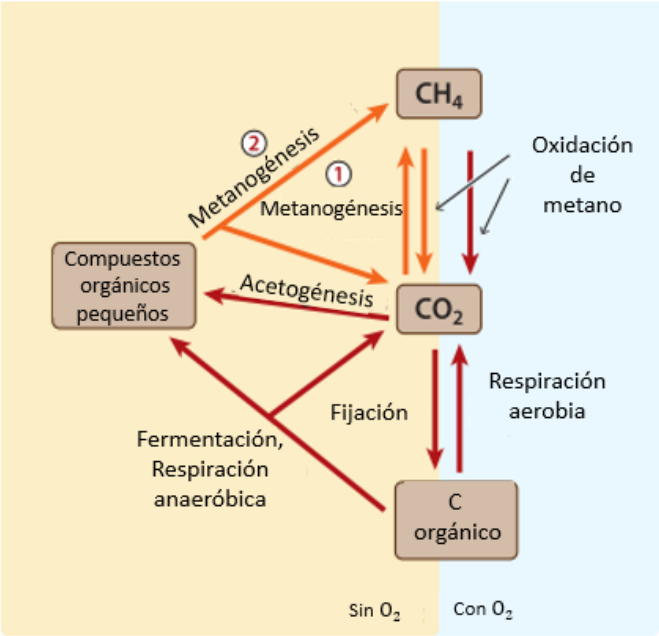

Figura II- 3 Ciclo del Carbono
Fuente: (Offre *et al.*, 2013)

Por otro lado se tiene el proceso de mineralización de carbono orgánico, donde los organismos quimioorganotróficos realizan la degradación catabólica de sustratos orgánicos, produciendo CO_2. (Offre *et al.,* 2013).

Finalmente, la intervención del ser humano en estos ciclos se debe principalmente a actividades antropogénicas que aportan material particulado de nitrógeno a la atmósfera debido a la quema de

combustibles fósiles, la industria de los fertilizantes y agro, aporta con grandes cantidades de nitratos, nitritos y compuestos de azufre a los suelos, y por contaminación difusa a cuerpos acuáticos. Además, la industria produce compuestos de azufre que utiliza como insumo en procesos, generando emisiones de contaminantes con compuestos de azufre, contribuyendo al desbalance de los ciclos naturales del nitrógeno, azufre y carbono.

2.1.2 Normativa ambiental

El agua residual se norma debido a la gran cantidad de contaminantes que lleva y a la peligrosidad asociada a cada uno de ellos según su naturaleza. Para conservar los ecosistemas que reciben estas descargas, se establecen parámetros máximos que regulan las emisiones de contaminantes según su destino, en la Figura II- 4 se muestran las normas de emisión y calidad del medio ambiente asociadas al recurso hídrico.

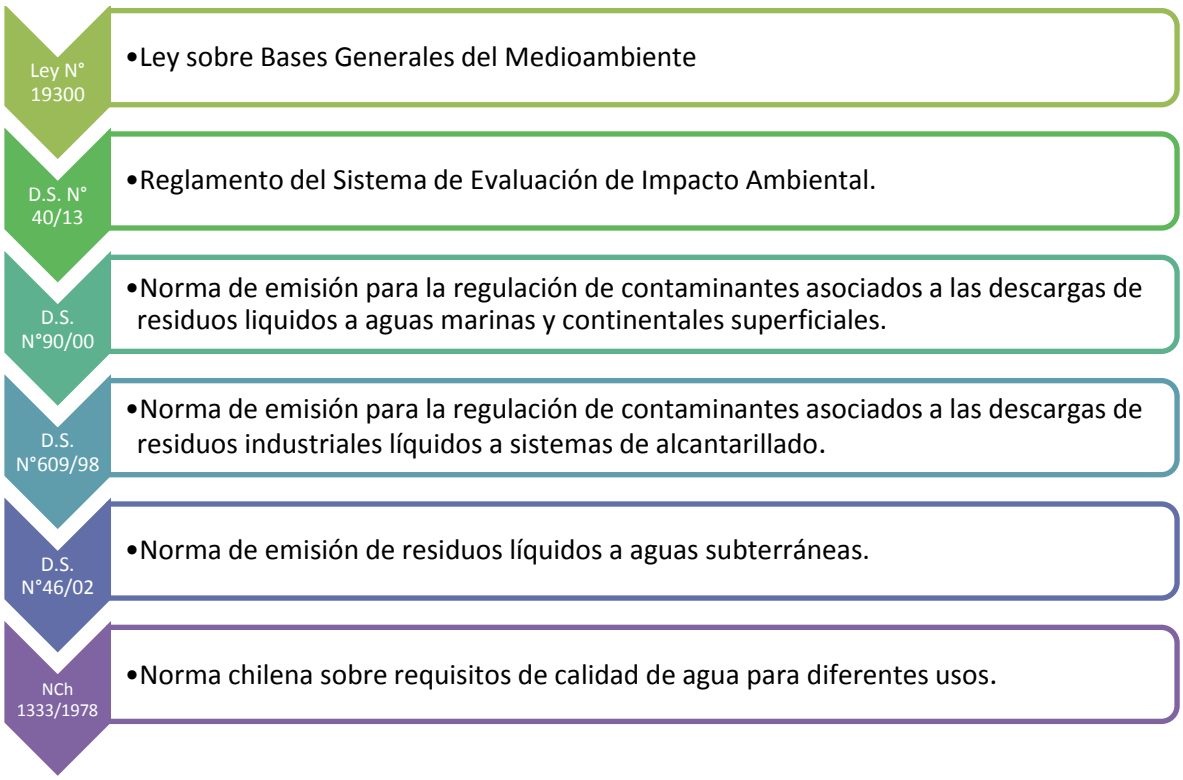

Figura II- 4 Normativa Ambiental de Residuos Industriales Líquidos en Chile

De los parámetros de interés en la presente memoria, los límites máximos permitidos de contaminantes en aguas superficiales (D.S. N°90), subterráneas (D.S. N°46) y alcantarillado (D.S. N°609) se resumen en la Tabla II- 3.

Tabla II- 3 Límites Máximo Permitido de Contaminantes según DS 90, DS 609 y DS 46

Parámetro	***Unidad***	***Aguas Superficiales***			***Aguas subterráneas***		***Alcantarillado***	
		RSD	*RCD*	*Océano*	*VM*	*VB*	*SCPT*	*SSPT*
DBO_5	*mg O_2/L*	*35-25*	*300*	*60*	*-*	*-*	*-*	*-*
NTK	*mg/L*	*50*	*75*	*50*	*10*	*15*	*-*	*-*
$N\text{-}NO_3 + N\text{-}NO_2$	*mg/L*	*-*	*-*	*-*	*10*	*15*	*-*	*-*
NH_4^+	*mg/L*	*-*	*-*	*-*	*-*	*-*	*80*	*-*
SO_4^{-2}	*mg/L*	*1000*	*2000*	*-*	*250*	*500*	*1000**	*1000**
S^{-2}	*mg/L*	*1*	*10*	*1*	*1*	*5*	*5*	*5*
pH	*-*	*6-8,5*	*6-8,5*	*-*	*6-8,5*	*6-8,5*	*5,5-9*	*5,5-9*
SST	*mg/L*	*80*	*300*	*100*	*-*	*-*	*-*	*-*
T	*°C*	*35*	*40*	*30*	*-*	*-*	*35*	*35*

*RSD: ríos sin dilución, RCD: ríos con dilución, VM: vulnerabilidad media, VB: vulnerabilidad baja, SCPT: sistema con planta de tratamiento, SSPT: sistema sin planta de tratamiento, SST: Sólidos suspendidos volátiles. * Se aceptaran concentraciones entre 1.000 y 1.500 mg/L cuando se cumple que: a) pH = 8-9; b) temperatura del RIL (°C) ≤ temperatura de las aguas receptoras.*

Fuente: (Muñoz, 2015)

El D.S. N°46/02 establece un límite máximo de nitrato, expresado como cantidad de nitrógeno en forma de nitrato ($N\text{-}NO_3^-$), de 10 mg/L, equivalente al valor fijado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y recomendado por la Organización Mundial de Salud (OMS) (Arumi *et al.,* 2006).

2.2 Procesos de tratamiento de las aguas residuales

2.2.1 Tratamiento de las aguas residuales

La legislación actual exige la implementación de sistemas de tratamiento de aguas residuales sostenibles que aseguren la calidad del efluente, bajos costos operativos y la potencial recuperación de nutrientes. Los efluentes industriales pueden contener materia orgánica y gran cantidad de nutrientes como nitrógeno o azufre, éstos deben ser eliminados o minimizados, porque generan un significativo impacto sobre el medio ambiente y la salud de las personas (Fajardo, 2011). Por lo mismo, las operaciones y procesos unitarios se agrupan para proporcionar distintos niveles de tratamiento de efluentes líquidos (Figura II- 5), los que incluyen las siguientes categorías (Metcalf y Eddy, 1998):

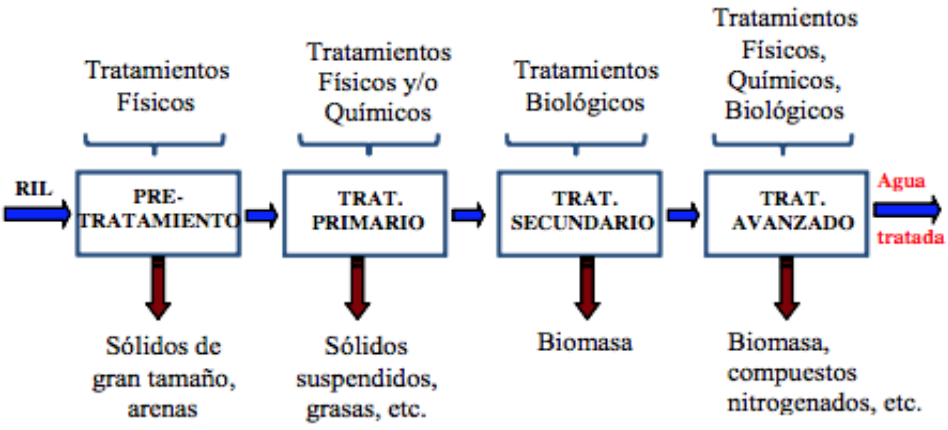

Figura II- 5 Tratamiento para efluentes líquidos industriales.
Fuente: (Muñoz, 2015)

- **Pre – tratamiento**: eliminación de componentes de gran tamaño y/o pesados de las aguas residuales, cuya presencia pueda provocar problemas de mantenimiento y funcionamiento en las operaciones de tratamiento y procesos auxiliares.
- **Tratamiento primario**: eliminación de una fracción de sólidos en suspensión y materia orgánica de las aguas residuales.
- **Tratamiento secundario**: eliminación de la materia orgánica biodegradable (en solución o suspensión) y sólidos suspendidos.
- **Tratamiento terciario o avanzado:** proceso necesario para la eliminación de constituyentes específicos, tales como nutrientes, compuestos tóxicos y excesos de materia orgánica o sólidos en suspensión.

Esta investigación se enfoca en el tratamiento terciario, el cual implica la minimización de contaminantes que potencialmente se puedan verter a cuerpos receptores de aguas, afectando el ecosistema acuático y provocando procesos de eutrofización. Los principales nutrientes contenidos en las aguas residuales son el nitrógeno y el fósforo, y su eliminación se puede realizar mediante procesos físico - químicos, biológicos o una combinación de ambos (Metcalf y Eddy, 1998). La eliminación de estos nutrientes es efectuada a través de un tratamiento biológico, donde la relación C/N del agua residual es fundamental, ya que determinará cuál de los procesos biológicos es el más adecuado para llevar a cabo la eliminación de nitrógeno (Muñoz, 2015):

1. C/N > 20: es suficiente la asimilación de nitrógeno por bacterias heterótrofas para eliminar nitrógeno.
2. 20 > C/N > 5: eliminación de nitrógeno por asimilación y vía nitrificación/desnitrificación.
3. C/N < 5: en este caso el proceso de nitrificación/desnitrificación no es adecuado, porque necesita adicionar una fuente de carbono. Por lo que la desnitrificación autótrofa se presenta como alternativa.

Los recientes descubrimientos de microorganismos anaerobios oxidante de amonio (*Planctomycetes)* y el metabolismo anaerobio de proteobacterias oxidantes de amonio, sumado a microrganismos capaces de reducir nitrato a nitrógeno molecular utilizando compuestos inorgánicos como agentes reductores (ausencia de carbono orgánico), abren nuevas posibilidades para el tratamiento de aguas residuales (Schmidt *et al.,* 2003).

2.2.2 Nitrificación

En el proceso de nitrificación, el amonio (NH_4^+) es oxidado por bacterias autótrofas a nitrato en presencia de oxígeno y carbono inorgánico (generalmente bicarbonato). La etapa de nitrificación está subdividida en dos pasos. El primer paso es realizado por el grupo de las bacterias amonio oxidantes (BAO) y está regido por la reacción (1) de la cual se obtiene el ion nitrito. Luego de la primera oxidación, la reacción es conducida por el grupo de bacterias oxidantes de nitrito BNO obteniendo nitrato a partir de nitrito según reacción (2) (Davis y Masten, 2005):

$$4NH_4{}^+ + 6O_2 \rightarrow 4NO_2{}^- + 8H^+ + 4H_2O \quad (1)$$

$$4NO_2{}^- + 2O_2 \rightarrow 4NO_3{}^- \quad (2)$$

Combinando las reacciones se tiene de manera general (Burgoa, 2015):

$$NH_4{}^+ + O_2 + CO_2 \rightarrow biomasa + NO_3{}^- \quad (3)$$

2.2.3 Desnitrificación Heterótrofa

El proceso de desnitrificación, involucra la reducción del nitrato obtenido de la fase uno, a nitrógeno molecular. Para esta fase son requeridos bacterias heterótrofas y carbono orgánico en ausencia de

oxígeno disuelto, existiendo variados microorganismos capaces de realizar esta tarea, como por ejemplo: *Pseudomonas, Alcaligenas, Paracoccus* y *Thiobacillus* dentro de las Gram negativas y *Bacillus* dentro de las Gram positivas (Wang *et al.,* 2009).

La ecuación de desnitrificación global y la secuencia de reducción de nitrógeno se muestran a continuación:

$$NO_3^- / NO_2^- + \text{materia orgánica} \rightarrow biomasa + N_2 + CO_2 \quad (4)$$

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2 \quad (5)$$

El proceso de reducción de nitrato a nitrito, es catalizado por la nitrato reductasa. El segundo paso es la reducción de nitrito a óxido nítrico (NO) por medio de la nitrito reductasa. La reducción de NO a N_2O está catalizada por la óxido nítrico reductasa, localizada en la membrana citoplasmática, que ha sido aislada de las bacterias *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri*, de las enzimas de la desnitrificación, ésta es la menos caracterizada. La última etapa de la desnitrificación es la reducción de N_2O a N_2 y es llevada a cabo por la enzima óxido nitroso reductasa, localizada en el periplasma. Esta enzima es severamente inhibida por la presencia de oxígeno. Debido a esto, es importante evitar la entrada de oxígeno en el proceso desnitrificante, para no liberar N_2O, gas que contribuye al efecto invernadero del planeta. (Cervantes-Carrillo *et al.,* 2000).

La cinética de la desnitrificación heterótrofa se puede representar por el modelo de Monod, teniendo en cuenta ambos sustratos, como muestra la ecuación (6), donde S y N son, respectivamente, las concentraciones de los sustratos orgánicos y nitrogenados, y K_s y K_n sus respectivas constantes de saturación (Aguirre, 2014).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left[\frac{S}{K_s + S}\right]\left[\frac{N}{K_n + N}\right] \quad (6)$$

Se ha mencionado que el valor de la constante de saturación K_n del nitrato es muy baja (alrededor de 0,1 g $N\text{-}NO_3^-$/L), por lo que la desnitrificación heterótrofa se considera como independiente de la concentración de nitrato. Esto no ha quedado claro, sin embargo, en el caso de aguas residuales con un alto contenido de nitrógeno, dado que se ha encontrado acumulación de intermediarios durante su tratamiento (Bernet *et al.,* 1996). Al respecto, Betlach y Tiedje (1981) propusieron que la acumulación

de intermediarios durante el proceso desnitrificante podría ser explicada por la secuencia de reacciones mostradas en la ecuación (5).

Cada paso tiene una velocidad específica que depende de las características cinéticas de cada enzima. Así, si las enzimas involucradas en los últimos pasos presentan una velocidad de reacción menor que las de la primera etapa, habrá la acumulación de intermediarios. Algunas evidencias encontradas en la literatura muestran concordancia con lo anterior. De hecho, se ha visto que la reducción del óxido nitroso es la etapa más lenta durante la reducción de nitrato a N_2, por lo tanto, hay acumulación de N_2O (Cervantes *et al.,* 2000).

Las evidencias han mostrado que la velocidad desnitrificante heterótrofa está asociada con el crecimiento microbiano y puede quedar descrita por la ecuación (7):

$$\frac{\mathrm{dS}}{\mathrm{dt}} = \left[\frac{\mu_{\max}}{Y_d}\right] \cdot \left[\frac{\mathrm{S}}{\mathrm{K_s} + \mathrm{S}}\right] [X_d] \quad (7)$$

Donde X_d es la biomasa desnitrificante e Y_d el rendimiento g biomasa/g NO_3^-.

En consecuencia, será importante considerar la concentración de sustrato asimilable (y soluble) al ajustar la relación C/N para tener un proceso desnitrificante eficiente. De hecho, hay resultados que indican que la acumulación de N_2O en un proceso desnitrificante heterótrofo está también relacionada con la concentración de carbono orgánico en el sistema de reacción.

Una variable ambiental que también puede influir en la acumulación de intermediarios indeseables en un proceso desnitrificante heterótrofo es el pH. Se ha descrito que en condiciones ácidas (pH 6 o menor) se acumula ácido nitroso (HNO_2), muy tóxico para las bacterias a valores de pH ligeramente alcalinos, el nitrato es convertido en N_2. Cabe decir que estos estudios del efecto del pH sobre la desnitrificación han sido realizados en cultivos *batch*. En cultivos en continuo, por el contrario, no se observó acumulación de intermediarios de la desnitrificación en el intervalo de pH de 6 a 9, aun cuando se utilizó una velocidad de carga alta (1.000 mg N-NO_3^-/L d), pero el proceso si fue totalmente inhibido a un pH de 5 (Pérez, 1998). El proceso de desnitrificación tiende a aumentar la alcalinidad, puesto que necesita los protones de hidrógeno para su ejecución (Sánchez y Sanabria, 2009).

2.2.4 Desnitrificación autótrofa

El proceso de desnitrificación autótrofa (DNA) es llevado a cabo por bacterias quimioautotróficas anaerobias facultativas como *Thiobacillus denitrificans y Thiomicrospira denitrificans* (Chung *et al.*, 2014). Ellas son capaces de reducir compuestos inorgánicos de nitrógeno oxidados, como nitratos y nitritos (NO_3^-, NO_2^-), utilizando compuestos inorgánicos reducidos de azufre como donador de electrones (H_2S, S^0, $S_2O_3^{-2}$), en ausencia de oxígeno y a pH neutro, obteniendo como productos principales nitrógeno molecular y ion sulfato (N_2, SO_4^{-2}), compuestos menos perjudiciales para el medio ambiente. Este proceso es por tanto una reacción redox, la cual provee la energía (ATP) necesaria para fines fotosintéticos (Claus y Kutzner, 1985).

A diferencia de la desnitrificación heterótrofa, la desnitrificación autótrofa requiere carbono inorgánico como CO_2 o HCO_3^-, en reemplazo de materia orgánica como fuente de carbono para la síntesis y formación de biomasa denotada de manera general como $C_5H_7O_2N$, además de una fuente de alcalinidad para neutralizar los protones generados en dichas reacciones. Las ecuaciones 8, 9 y 10, muestran reacciones de síntesis de biomasa (balances estequiométricos en las que se obtiene como producto sulfato), según el compuesto de azufre utilizado como donador de electrones, este compuesto desempeña un importante papel en la DNA, ya que en conjunto con la razón S/N, determina los compuestos intermedios y finales de azufre (Pokorna y Zabranska, 2015), además de determinar la velocidad del proceso de desnitrificación. Según Cardoso et al. (2006) la mayor velocidad de desnitrificación se logra al utilizar tiosulfato como agente reductor.

Las reacciones en la DNA según la fuente de azufre pueden ser, (Campos *et al.*, 2008):

- Reacción con tiosulfato

$$0{,}844\ S_2O_3{}^{2-} + NO_3{}^- + 0{,}347\ CO_2 + 0{,}0865\ HCO_3{}^- + 0{,}0865\ NH_4{}^+ + 0{,}434\ H_20 \\ \rightarrow 1{,}689\ SO_4{}^{2-} + 0{,}5\ N_2 + 0{,}0865\ C_5H_7O_2N + 0{,}697\ H^+ \quad (8)$$

- Reacción con sulfuro

$$0{,}422\ H_2S + 0{,}422\ HS^- + NO_3{}^- + 0{,}347\ CO_2 + 0{,}0865\ HCO_3{}^- + 0{,}0865\ NH_4{}^+ \\ \rightarrow 0{,}844\ SO_4{}^{2-} + 0{,}5\ N_2 + 0{,}0865\ C_5H_7O_2N + 0{,}409\ H^+ \quad (9)$$

- Reacción con azufre elemental

$$1{,}1\ S^0 + NO_3{}^- + 0{,}76\ H_2O + 0{,}4\ CO_2 + 0{,}08\ NH_4{}^+ \rightarrow 1{,}1\ SO_4{}^{2-} + 0{,}5\ N_2 + 0{,}08\ C_5H_7O_2N + 1{,}28\ H^+ \quad (10)$$

En caso de aguas con un alto contenido de nitrógeno, la DNA genera una gran cantidad de sulfato el cual también deberá ser removido si se supera la norma de emisión, además de requerir gran cantidad de una fuente de alcalinidad para mantener un control de pH eficiente y necesario para una buena DNA, por la generación propia de protones, lo que incrementa los costos de operación. Si bien fuentes de alcalinidad como caliza $CaCO_3$ (*Sulfur-Limestone Process*) son económicas y eficientes, el aumento de la dureza del agua y los sólidos disueltos limita su aplicación (Chung *et al.*, 2014).

Los parámetros de control de la DNA, son principalmente:

pH

Al igual que todos los microorganismos, las bacterias autótrofas poseen un intervalo de pH adecuado para su funcionamiento, esto se debe a que la eficiencia de la desnitrificación es muy sensible a las variaciones de pH, la DNA presenta altas eficiencias a un pH entre 7 – 8 (Oh *et al*., 2000). En cultivos puros de *Thiobacillus denitrificans* se demostró que el rango de pH óptimo es de 7,5 – 8 (Claus y Kutzner, 1985).

Temperatura

El proceso de desnitrificación se encuentra fuertemente influenciado por la temperatura. Las bacterias desnitrificantes son principalmente mesófilos (25 - 35°C), por lo que temperaturas inferiores a los 25°C y superiores a los 35°C afectan negativamente a la actividad desnitrificante (Fajardo *et al*., 2008). La temperatura de operación óptima se encuentra en el rango de 33 – 35°C. El proceso se inhibe por completo a los 40°C (Oh *et al*., 2000) o si la temperatura del reactor alcanza los 15°C (Fajardo, 2011) incluso llegando a ser insignificante.

Tiempo de residencia hidráulico

Se define el tiempo de retención hidráulica o TRH, como el tiempo medio que permanece un cierto volumen del caudal alimentado dentro del reactor:

$$TRH[d] = \frac{volumen\ reactor[m^3]}{caudal\ alimentado\ medio\left[\frac{m^3}{d}\right]} \quad (11)$$

Este parámetro influye directamente en la eficiencia de la DNA, ya que define el tiempo de contacto entre el sustrato y los microorganismos. En los casos que se tiene un bajo tiempo de contacto los sistemas arrojan eficiencias pobres en el proceso de desnitrifación. En la investigación realizada por Claus y Kutzner (1985), reportaron que se requiere de un TRH mínimo de 1,7 horas para alcanzar una desnitrificación del 80% en un sistema autótrofo de sulfuro/caliza.

Relación S/N

El control de la relación de S/N es clave para realizar la oxidación de los productos de interés. La termodinámica de las reacciones determina que la oxidación completa de los compuestos de azufre se encuentran favorecidos, por lo mismo, los productos de estas transformaciones generaran nitrógeno atmosférico y sulfato (Moraes *et al*., 2012) siempre y cuando la cantidad del aceptor de electrones sea igual o mayor a la estequiométrica.

En las diversas investigaciones que se han realizado se plantea la importancia de la relación de S/N en la desnitrificación autótrofa. En el trabajo de Oh *et al*. (2000), se determinó que si se utiliza tiosulfato y nitrato, como donador y aceptor de electrones respectivamente, a razones menores a 6,51 g S/g N ocurre limitación por azufre, por lo que la desnitrificación sólo llegaría hasta nitrito, en cambio sobre este valor (nitrógeno limitante) se producía abundante gas, principalmente N_2.

Otros estudios de Campos *et al*. (2008) y Manconi *et al*. (2007), indican que bajo condiciones limitantes de NO_3^- con una relación de S/N 6,67, se realiza de manera óptima la desnitrificación. Sin embargo, con S/N 1,16 con $S_2O_3^{-2}$ como reactivo limitante, la desnitrificación es incompleta y se detecta la presencia de NO_2-.

Chung *et al*. (2014) plantearon que la desnitrificación autotrofa, utilizando tiosulfato como donador de electrones, lograra eliminar completamente nitrato y nitrito con una relación de S/N de 5,1 y 2,5 respectivamente. Si la relación de S/N es más alta que la estequimétrica, los compuestos de azufre se oxidan a azufre elemental (Fajardo 2011).

Inhibiciones

Altas concentraciones de sulfuro y tiosulfato generan inhibición en el proceso de desnitrifiación para valores 200 mg/L (Fajardo *et al*., 2014), mientras que, el sulfato presenta una inhibición parcial a concentraciones mayores de 500 mg SO_4^{-2}/L y el agotamiento completo de la actividad se produce a 2000 mg SO_4^{-2}/L (Oh *et al*., 2002; Campos *et al*., 2008).

Del mismo modo, los compuestos nitrogenados también presentan inhibición por sustratos o productos. El nitrito es un fuerte inhibidor a partir de 48 mg NO_2^-/L, pero sus mayores efectos inhibidores aparecen recién sobre los 100 mg N-NO_2^-/L (Oh *et al*., 2000). En cambio, con el nitrato se reportan inhibiciones a concentraciones mayores 660 mg NO_3^-/L (Oh *et al*., 2002), incluso a diferentes concentraciones de S/N muestran que el nitrato tiene un efecto inhibitorio sobre la desnitrificación a concentraciones superiores a 200 mg N - NO_3^-/L (Fajardo *et al*., 2011).

2.2.5 Remoción Simultánea de S, N y C

En el proceso de desnitrificación autótrofa y heterótrofa simultánea, es una estrategia para remover del agua residual nitrógeno, azufre y materia orgánica, a la vez. Se tienen las interacciones descritas en la Figura II- 6 donde la interacción biológica entre los ciclos del nitrógeno y el azufre viene dada por la desnitrificación autótrofa que consiste en la reducción de óxidos de nitrógeno a nitrógeno gaseoso, utilizando compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones y el producto final obtenido es sulfato (Montalvo *et al.,* 2016).

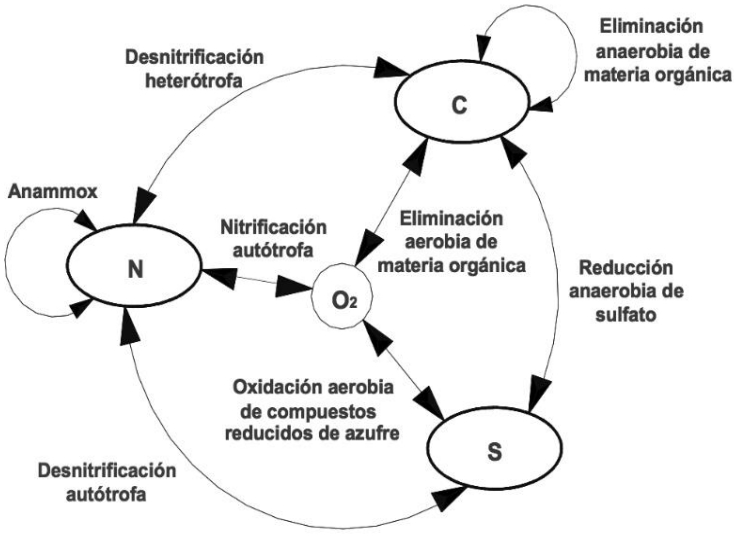

Figura II- 6 Interacciones Ciclo carbono, azufre y nitrógeno
Fuente (Campos *et al.,* 2009)

Para minimizar las limitaciones de la DNA, es decir, evitar el aumento en el pH y la generación de sulfato, diversos trabajos (Chen et al., 2008; Kim et al., 2004; Liu et al., 2014; Reyes-Avila et al., 2004; Guerrero et al., 2016) han estudiado la desnitrificación simultánea, es decir autotrófica-heterotrófica, considerada una ventaja frente a otros procesos de remoción de nitrógeno.

Existen diferentes estrategias al momento de integrar los ciclos del nitrógeno, azufre y carbono, buscando la remoción de contaminantes de manera simultánea.

Recientemente Xu *et al.* (2014) describen el comportamiento cinético del azufre, el nitrógeno y el carbono, además de las interacciones entre desnitrificantes autótrofas-heterótrofas, en un reactor de flujo continuo. Los parámetros cinéticos del modelo se estimaron considerando los efectos de la concentración inicial S^{-2}, y aquí se introduce un concepto sobre los parámetros de control de los sistemas de desnitrificación autótrofa y heterótrofa simultánea, que son las razones S/N y C/N, que permiten controlar la eficiencia de la desnitrificación, midiendo si se trabaja en razón estequiométrica, en exceso o déficit de carbono, azufre o nitrógeno. En el estudio se tiene consideró la razón S^{-2}/NO_3^--N y la razón CH_3COO^--C/NO_3^--N para determinar los parámetros cinéticos. El estudio mostró que existe inhibición por ácido sulfhídrico en el paso de reducción de nitrato a nitrito mediante los desnitrificantes heterótrofos comparado con la etapa de reducción del NO_2^- a N_2 gaseoso. La reducción del nitrato por los desnitrificantes autótrofos se produce entre 3 a 10 veces más lento en comparación con la vía conducida por el ácido sulfhídrico. Adicionalmente, este modelo sugirió que realizar el ajuste del tiempo de retención hidráulica (TRH) es una forma eficiente de hacer el reactor tolerable a altas cargas sulfuradas.

De forma similar Beristain-Cardoso *et al.* (2008) mantuvieron constante la razón molar de S^{-2}/NO_3 en 0,13 variando las razones CH_3COO^-/NO_3^- en 0,85, 0,72 y 0,62 en un **r**eactor de lecho fluidizado inverso. En una primera instancia se fija la razón C/N en 0,62. Se encuentran porcentajes de remoción de acetato y de nitrato de un 100% y de ácido sulfhídrico de un 90%, obteniendo como principal producto del proceso, sulfato, debido a que en este caso el nitrato pasa a estar en exceso. Por otro lado, cuando la razón CH_3COO^-/NO_3^- se fija en 0,85, se observa una eficiencia de remoción de acetato, nitrato y ácido sulfhídrico cercana al 100%, obteniéndose como principal producto de la reacción azufre elemental, debido a que el nitrato actúa como el reactivo limitante.

2.3 Reactores anóxicos

2.3.1 Tecnologías actuales

Dentro de los reactores anaerobios, como subcategoría, se puede clasificar al tipo de reactor como de primera o segunda generación, siendo de primera generación aquellos reactores en los cuales el tiempo de retención hidráulico es igual al tiempo de retención de sólidos, y de segunda generación a aquellos en donde el tiempo de retención de los sólidos es mayor al primero, haciéndolos más eficientes (Montalvo y Guerrero, 2003). Mientras que, los reactores de segunda generación se clasifican según si su biomasa está fija o suspendida, y de estos últimos, según si es dispersa o granular. De igual manera según el tipo de operación a la cual está sujeta, es decir reactores de operación continua o de operación *batch* (discontinua).

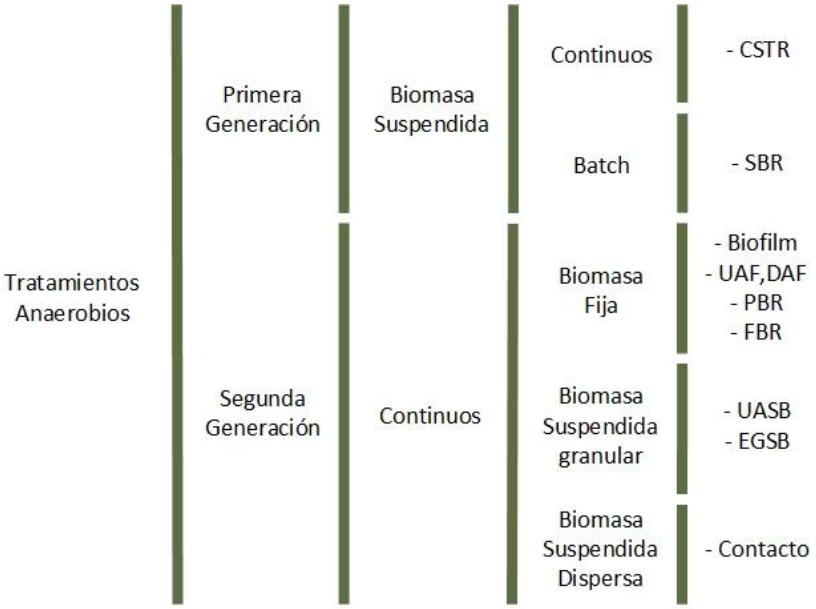

Figura II- 7 Clasificación de sistemas anaerobio de interés, para: CSTR: reactor continuo agitado, SBR: reactor *batch* secuencial, DAF: filtro anaerobio de flujo descendente, PBR: reactor de lecho empacado, FBR: reactor de lecho fluidizado, UASB: reactor anaerobio de flujo ascendente, EGSB: reactor granular de lecho expandido, Contacto: reactor de contacto.
Fuente: (Soto, 2016)

Diferentes estudios se han enfocado en el estudio de la desnitrificación utilizando principalmente reactores batch con tiosulfato como compuesto reductor, y en menor medida reactores continuos, utilizando sulfuro o azufre elemental (Fajardo, 2011). En la Tabla II- 4 se muestran algunos estudios donde la estrategia puede ser desnitrificación autótrofa, heterótrofa o simultánea y los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

Tabla II- 4 Estudios previos de desnitrificación autótrofa y/o heterótrofa.

Reactor	*Inóculo*	*Donador/Aceptor Electrones*	*Remoción Máxima*	*Referencia*
Reactor empacado de azufre (SPBR)	-	*$S°$/ NO_3^-/Lixiviado*	*99% N*	Kim y Bae, 2000
SPBR	-	*$S°$/ NO_3^-/MeOH*	*97% N, 90% C*	Oh *et al.,* 2001
Reactor continuo de mezcla perfecta (CSTR)	*T. Denitrificans bioaumentado*	*$S_2O_3^{-2}$/ NO_3^-*	*95% S, 100% N*	Manconi *et.al,* 2007
CSTR	*Lodo activado*	*S^{-2} / NO_2^-*	*80%S, 100% N*	Dogan *et al.,* 2012
Fed Batch	*Lodo enriquecido*	*S^{-2}, $S°$, $S_2O_3^{-2}$ / NO_3^-*	*100%S, 100% N*	Beristain *et al.,* 2006
Filtro anóxico de flujo ascendente (UAF)	*Lodo metanogénico*	*S^{-2} / NO_3^-*	*99% S, 94% N*	Mahmood, *et al.,* 2009
UAF	---	*$S_2O_3^{-2}$/ NO_2^-*	*90% N*	Yamamoto-Ikemoto *et al.,* 2000
UAF	*Lodo Enriquecido*	*S^{-2} / NO_3^-*	*100%S, 100% N*	Kleerebezem y Méndez, 2002
UAF	*Lodo anaerobio*	*$S°$ / NO_3^-, NO_2^-*	*90% N*	Zhou *et al.,* 2011
UAF	*Cultivos enriquecidos*	*S^{-2}/ NO_3^-/Acetato*	*99.7% S*	Tang *et al.,* 2010
Lecho Fijo Flujo Vertical	*Lodo enriquecido*	*S^{-2} / NO_3^-, NO_2^-*	*87% S, 95% N*	Moraes *et al.,* 2012
Lecho Empacado Flujo Ascendente	*Lodo enriquecido*	*S^{-2}, $S°$ / NO_3^-, NO_2^-*	*99% N*	Sun y Nemati, 2012
Lecho expandido (EGSB)	*Lodo enriquecido*	*S^{-2}/ NO_3^-/Acetato*	*99% S 99% N 94% C*	Chen *et al.,* 2012
Lecho Empacado Flujo Ascendente	*Desnitrificación por proceso Bardenpho*	*$S°$ / NO_3^-, NO_2^-*	*100% N*	Uyanik *et al.,* 2013
Lecho de lodo granular	*Lodo anaerobio*	*S^{-2}/ NO_3^-/COD*	*100% S*	Chen *et al.,* 2004

Fuente: Modificada de Fortt (2014)

2.3.2 Reactor de lecho fijo con flujo ascendente (UAF)

Este tipo de reactor ha sido desarrollado desde hace al menos cuatro décadas, lo que le da bastante madurez como tecnología. En los filtros anaerobios la biomasa se encuentra fija a un soporte inerte,

entre los intersticios de dicho soporte pasa el agua residual. La Figura II- 8, presenta un esquema típico de filtro anaerobio (Hernández, 2014).

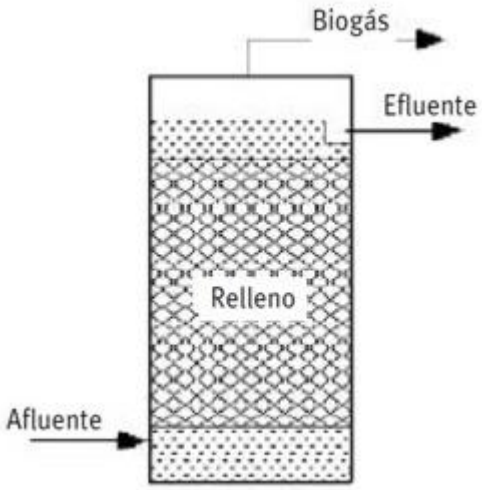

Figura II- 8 Esquema del filtro anaerobio
Fuente: (Hernández, 2014)

Dentro del filtro existe una alta concentración de microorganismos, teniendo en cuenta que los tiempos de retención varían entre 3 horas a 6 días, dando como resultado un alto rendimiento en cuanto a la producción de biogás. En los filtros anaerobios que degradan materia orgánica, la zona de entrada del efluente se constituyen los microorganismos de fase acidogénica, que hidrolizan y degradan la materia orgánica compleja, en la capa intermedia los microoganismos anaerobios y productores de oxígeno, y en la capa interior los metanogénicos (Montalvo y Guerrero, 2003).

El reactor de lecho fijo con flujo ascendente (UAF), es sencillo de mantener, porque la biomasa permanece como una biopelícula adherida al material de soporte. No obstante, pueden presentar problemas de obstrucción y altas caídas de presión, debido al exceso de biomasa que provoca el atrapamiento del gas, limitando así la transferencia de masa desde el líquido al biofilms (Fajardo, 2011). Ahora bien si el flujo es ascendente el riesgo de obstrucción disminuye considerablemente (Navarro, 2008).

El elemento más importante de los reactores UAF es el material de soporte y es el responsable de la eficiencia del proceso anaerobio. Este medio debe cumplir los siguientes objetivos:

- Separar los sólidos de los gases.
- Promover la homogeneización del líquido en el reactor.

- Mejorar el contacto entre el sustrato y los microorganismos dentro del reactor.
- Acumular grandes cantidades de biomasa con el consecuente aumento del tiempo de retención de sólidos.
- Actuar como barrera física (filtración) para evitar que los sólidos salgan en el efluente del reactor.

Existen dos tipos de arreglo del relleno: 1) al azar permite que el contacto entre el sustrato y la biopelícula sea mayor, sin embargo existe una gran acumulación de sólidos y los microorganismos están suspendidos y 2) orientado que posibilita un mayor drenaje y una menor acumulación de sólidos, por lo mismo disminuye la posibilidad de atascamiento. La mayor parte de los microorganismos crecen unidos al soporte.

Este tipo de reactores se caracteriza por soportar altas cargas, con recirculación es capaz de aceptar repentinos cambios de carga, fácil construcción y aplicación a pequeña y mediana escala, operación simple, rápida aclimatación a diferentes aguas residuales, bajo tiempo de retención hidráulico, rápido re- arranque después de fallos. Entre sus principales inconvenientes, está la dificultad en la puesta en marcha, el riesgo de atascamiento, limitado a aguas residuales con bajo contenido de sólidos suspendidos, presencia de sólidos suspendidos en el efluente (Montalvo *et al.,* 2012).

2.4 Zeolita

2.4.1 Aspectos generales

Las zeolitas son aluminosilicatos hidratados de metales alcalinos o alcalinos térreos, su microestructura es de redes cristalinas tridimensionales, compuestas de tetraedros del tipo AlO_4 o SiO_4, en el centro se encuentra un átomo de silicio o de aluminio, unidos en los vértices por un átomo de oxígeno (Curi et al., 2006), formándose huecos y canales que permiten la movilidad de las moléculas de agua y cationes alcalinos y/o alcalinos terreos. La sustitución de Si^{+4} por Al^{+3}, define la carga negativa de la estructura, siendo estos cationes los que le otorgan a la zeolita su principal propiedad: la de facilitar el intercambio iónico (Englert y Rubio, 2005).

El intercambio iónico, es un fenómeno de sustitución de los átomos de silicio en la estructura cristalina por otros átomos. Esta sustitución ocurre por átomos de aluminio lo cual genera una carga neta negativa, que es compensada con la incorporación de otros cationes fuera de la estructura. Mientras

menor sea la relación SiO_2/ AlO_3, mayor será el grado de sustitución y mayor la capacidad de intercambio iónico. Sin embargo, esta propiedad está sujeta a factores que afectan su comportamiento, factores como temperatura, naturaleza y concentración de los cationes en solución, los aniones asociados a estos cationes, el solvente de trabajo, así como la estructura y densidad de carga (Garrido, 2014).

Entre las propiedades de las zeolitas es que poseen capacidad de adsorción, esto es que poseen la capacidad de retener moléculas, átomos o iones en la superficie, formando así una película líquida o sólida sobre su superficie. Es así posible formar biopelícula en donde los microorganismos son capaces de adaptarse y sobrevivir (Garrido, 2014)

Sin embargo, para efectos de la presente investigación importa saber qué tan buen soporte para poblaciones bacterianas es este material ya que, efectivamente ayuda a la retención de biomasa formando una biopelícula en su superficie. Esto ayuda a los microorganismos a adherirse y soportar de mejor maneras los cambios en el medio ambiente. Esta propiedad está dada gracias a que la zeolita está formada por microporos, estos son, poros de diámetro menor que 2 [nm], y por esto presenta una superficie interna extremadamente grande en relación son su superficie externa. Esta porosidad es la que juega un papel clave en el mecanismo de transferencia de materia puesto que el compuesto absorbido se difunde a través de los microporos hasta alcanzar la superficie de la partícula. Así ocurre un mejor confinamiento de la molécula cuando menor es el tamaño del poro, puesto que hay una mayor interacción con las paredes del poro (Curi *et al*., 2006).

En la Tabla II- 5, se detalla la clasificación de los tipos de poros usados como soporte microbiano, según su tamaño y lo establecido por la International *Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), las zeolitas se encuentran en el grupo de microporos.

Tabla II- 5 Clasificación de poros de un soporte microbiano según su diámetro, (Muñoz, 2015).

Tipo de poro	*Diámetro nm*
Macroporos	> 50
Mesoporos	2 – 50
Microporos	< 2

La naturaleza de estos poros y la interconexión de sus canales, le brindan propiedades físicas y químicas interesantes a las zeolitas, como la capacidad de adsorción e intercambio iónico (Montalvo *et al*., 2012). Así como también asegurar la alta adherencia de biomasa.

2.4.2 Aplicaciones

Existen múltiples evidencias de que la aplicación de zeolitas naturales a los procesos biológicos de aguas residuales incrementa la eficiencia de estos. Sobre todo en la adsorción de amoniaco de los efluentes de los residuos de los purines de cerdo y/o vacuno, en los que se ha reportado una baja concentración de amoniaco, en la relación de C/N y en la regulación de la acidez (Kotsopoulos *et al,* 2008). Otra alternativa es la utilización de zeolitas naturales en polvo, la que ha demostrado ser eficaz tanto para los procesos de remoción de materia orgánica, aerobios y anaerobios, como para los procesos de nitrificación y desnitrificación (Montalvo *et al.,* 2012; Wang y Peng, 2010).

Otro uso común de la zeolita natural es la remoción de metales pesados en efluentes minero metalúrgicos, en el tratamiento de drenaje ácido de mina y de roca, para la adsorción de vapores de mercurio en hornos de copela quemadores de amalgamas y también en el tratamiento de suelos contaminados por radiación y de licores radiactivos provenientes de centrales nucleares (Curi *et al.,* 2006).

Por otra parte, las zeolitas son muy útiles como soporte microbiano, ya que presentan una alta capacidad para la adhesión de los microorganismos, tanto en los procesos aeróbicos como en los anaeróbicos, con distintas aguas residuales (Montalvo *et al.,* 2005; Fernandez *et al.,* 2007). El uso de zeolita como soporte en los reactores anaerobios permite retener altas concentraciones de biomasa, reduciendo de forma significativa los TRH (Montalvo *et al.,* 2012).

2.4.3 Zeolita chilena

Con los estudios realizados por Montalvo (2012) y Englert y Rubio (2005), se caracterizó a la zeolita chilena como “Ch-zeolite”, donde se obtuvo la composición química y mineralógica. La zeolita chilena está compuesta principalmente de clinoptilolita y mordenita, además se encontró que la muestra presento un área superficial específica bastante alta, este es un parámetro fundamental para que se produzca la adsorción. En la Tabla II- 6, se presenta la composición.

Tabla II- 6 Composición de la zeolita natural chilena, Muñoz (2015).

	Composición Química		*Composición Mineralógica*		
Componente	**%**		**Tipo**	**%**	
	(1)	***(2)***		***(1)***	***(2)***
SiO_2	67,00	67,74	Clinoptilolita	48	53
Fe_2O_3	2,00	3,60	Mordenita	30	40
CaO	3,20	3,46	Albita	5	--
Al_2O_3	13,00	13,01	Cuarzo	15	--
MgO	0,69	0,78	Otros	2	7
K_2O	0,45	0,53			
TiO_2	0,20	---			
Na_2O	2,60	---			
MnO	0,04	---			
Pérdida de ignición	---	10,50			

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Enriquecimiento heterótrofo

En una primera instancia se montó un reactor de enriquecimiento de bacterias heterótrofas desnitrificantes, que consiste en un recipiente de vidrio ambar con un volumen total de 3 L y volumen útil de 1,5 L. Se ingresaron 600 mL de lodo de la planta de tratamiento de *British American Tobacco* Chile de un reactor anaerobio UASB, una vez sellado se purgó con un gas inerte (Ar) a modo de asegurar la condición anaerobia. En la Figura III- 1 se muestra el reactor utilizado.

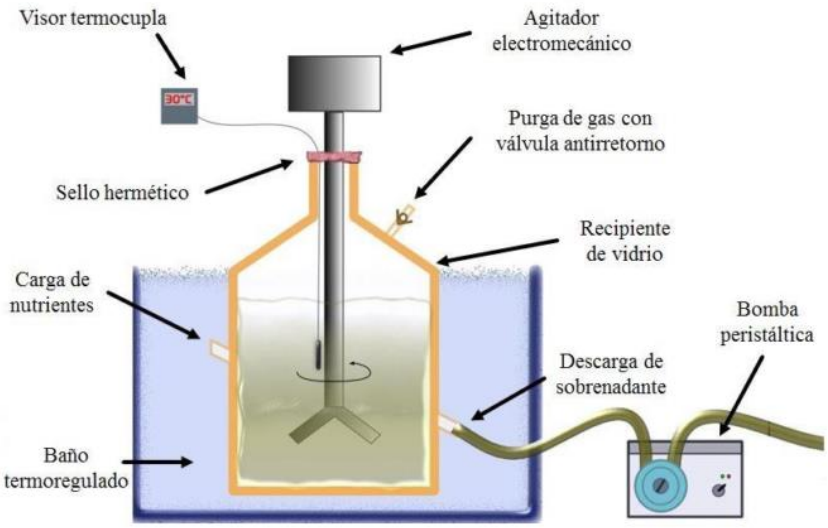

Figura III- 1 Esquema del Reactor de enriquecimiento heterótrofo
Fuente: (Garrido, 2014)

El proceso de carga y descarga se realiza cada 3 días y se emplea un agua residual sintética preparada con las concentraciones que aparecen en la Tabla III- 1 y Tabla III- 2, el reactor era mantenido a una temperatura de 35°C mediante un calefactor con termocupla y controlador.

Tabla III- 1 Agua residual sintética alimentación enriquecimiento heterótrofo, Peirano (2016).

Medio enriquecimiento	***g/L***
CH_3COOK	1,52
NH_4Cl	0,1
KH_2PO_4	0,3
K_2HPO_4	1,84
KNO_3	1,43
Micronutrientes	1 mL

Tabla III- 2 Micronutrientes enriquecimiento heterótrofo, Peirano (2016).

Componente	***g/L***
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	*1*
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	*30*
$ZnCl_2$	*1*
$CaCO_3$	*2*
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	*1,5*
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	*0,25*
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	*0,25*
HCl (37%)	*50*
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	*0,25*
H_3BO_3	*0,5*

Se monitorea la remoción de nitrato, los sólidos suspendidos totales y volátiles, para medir el rendimiento del reactor y la biomasa presente en él. Por otro lado, se mida la DQO del enriquecimiento al final del proceso, para caracterizar el inóculo.

3.2 Enriquecimiento autótrofo

El enriquecimiento de bacterias autótrofas se realizó en otra investigación a partir de un lodo proveniente de una laguna anaerobia de la empresa Agrícola AASA, el cual presentaba 24.460 mg SSV/L de sólidos suspendidos volátiles y una remoción de nitrato del 96,94%. Adicionalmente, se realizó la medición de la actividad desnitrificante autótrofa (ADA), para conocer la capacidad de la biomasa de reducir nitrato a nitrógeno gas (N_2), obteniendo 339,95 g-N_2/g-SSV/d.

3.3 Reactor UAF

Las dimensiones del reactor se muestran en la Tabla III- 3, donde se tiene dos partes del reactor una el cuerpo cilíndrico y el relleno es un lecho empacado de zeolita que actúa medio de soporte. La zeolita natural chilena fue molida y tamizada para alcanzar una granulometría promedio de 5 mm. El reactor fue sellado herméticamente y se realizó un barrido con gas inerte (Ar) a fin de asegurar las condiciones anóxicas.

Tabla III- 3 Dimensiones del reactor UAF, Muñoz (2015).

Característica	*Valor*	*Característica*	*Valor*	*Unidad*
H cilindro	*16*	***H relleno***	*10*	*cm*
A cilindro	74	**A flujo**	30	*cm^2*
V total	*1,5*	***V útil***	*0,8*	*L*

El equipo posee un total de cinco aberturas, en la parte inferior del medio de soporte se encuentra la abertura para el ingreso de la corriente de alimentación y la recirculación, mientras que en la parte superior están las aberturas para la salida del efluente y de la corriente de recirculación. Del mismo modo, centrada en la parte superior hay una salida para el gas controlada con una válvula anti retorno. La configuración del reactor se muestra en detalle en la Figura III- 2.

El empaque de zeolita tiene una altura de 10 cm, el cual queda confinado por 2 mallas circulares arriba y abajo para evitar pérdida de material.

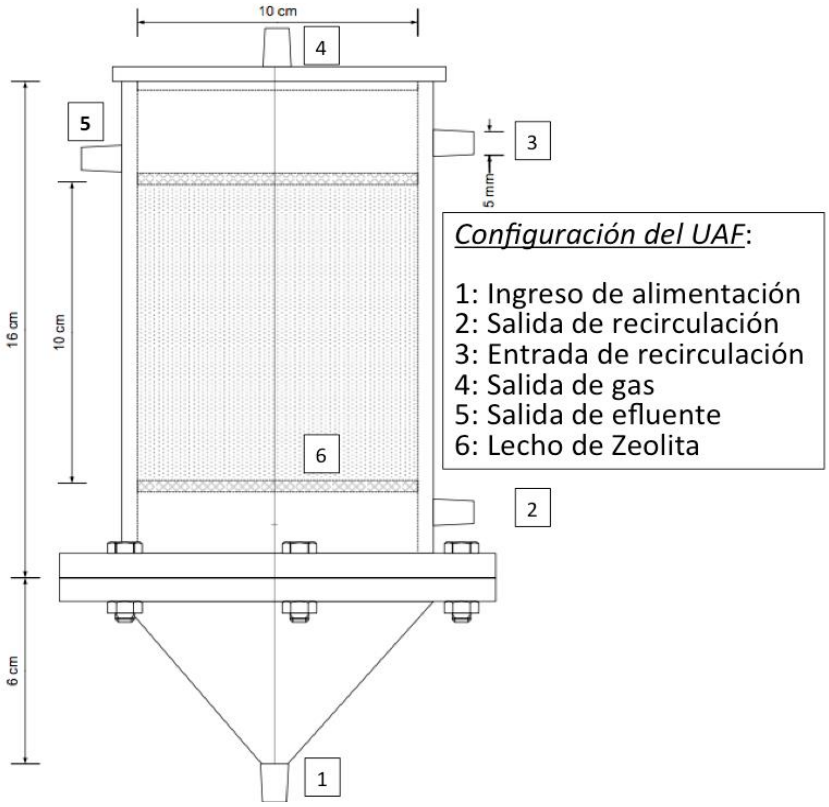

Figura III- 2 Configuración del reactor UAF
Fuente: (Muñoz 2015)

3.4 Puesta en marcha

3.4.1 Inóculo

Para comenzar el proceso de puesta en marcha del reactor, es necesario primero inocularlo para lograr la adherencia de los microorganismos a la zeolita (llamada también como etapa de enriquecimiento del reactor UAF).

En esta investigación la eliminación biológica de contaminantes se realiza mediante la desnitrificación simultánea, es por esto que se debe introducir al reactor una mezcla de microorganismos autótrofos y heterótrofos, la cantidad de cada especie que se debe agregar viene dada por la relación encontrada en la investigación de Peirano (2016), de 0,54 masa de bacterias heterótrofas sobre masa de autótrofas (H/A), medida en sólidos suspendidos volátiles, con esta relación se optimiza la remoción de nitrato.

En la Tabla III- 4, se muestra el procedimiento realizado para alcanzar la relación teórica, donde a partir de la cantidad de mg SSV/L disponible para cada tipo de bacteria, se determina el volumen necesario para cumplir con la relación establecida, obteniendo 208 mL de mezcla, de los cuales 82 mL son de microorganismos heterótrofos y 126 mL de autótrofos.

Tabla III- 4 Inóculo del reactor UAF

	mg SSV/L	***Volumen mL***	***Volumen L***	***mg SSV***	***Razón***
Heterótrofo	20220	82	0,082	1658,04	0,54
Autótrofo	24460	126	0,126	3081,96	

3.4.2 Materiales para la puesta en marcha del reactor UAF

Los equipos para el reactor UAF, se instalaron al interior de una cámara térmica, excepto el tanque de alimentación y el tanque de descarga. La temperatura se controló mediante una termocupla que se encuentra conectada al equipo controlador de temperatura, el cual se encarga de accionar el funcionamiento del termoventilador para mantener el *set point* fijado en 33°C. En la Tabla III- 5, se describen los equipos utilizados en el proceso de desnitrificación autótrofa y en la Figura III- 3, se muestra el diagrama de flujo del sistema instalado.

Tabla III- 5 Materiales Reactor UAF, modificada de Muñoz (2015).

Equipo	***Descripción***
Bomba peristáltica	*Lead Fluid BT200L*
Manguera	*MasterFlex, silicona, #15 y #18*
Bomba peristáltica	*Lead Fluid YZ15*
Controlador de temperatura	*Barnant Company*
Temporizador	-
Estanque	*De plástico, capacidad 20 L*
Cámara adiabática	*De polietileno expandido*

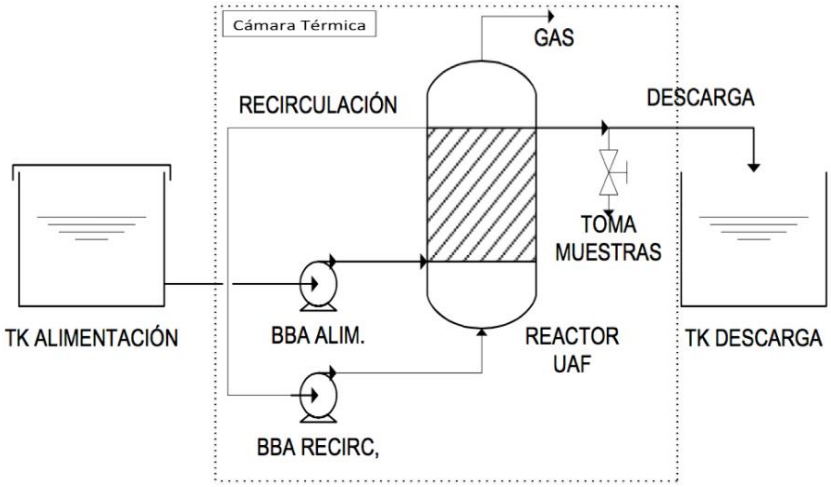

Figura III- 3 Diagrama de flujo de proceso (PFD) del sistema de DNA instalado

Fuente: (Muñoz, 2015)

La disposición de los materiales y equipos en el laboratorio de Riles de la Universidad Técnica Federico Santa María se realizó como se muestra en la Figura III- 4.

Figura III- 4 Configuración de los materiales en el reactor UAF

3.4.3 Sustrato

La composición de la alimentación se basó en el resultado del estudio previo de Aguirre (2014), donde se indican las concentraciones óptimas para los requerimientos particulares en la desnitrificación simultánea autótrofa y heterótrofa. En la Tabla III- 6, se muestra el agua residual sintética que se usó en esta investigación. La relación teórica de C/N utilizada es de 3 (Aguirre, 2014), considerando sólo el

carbono orgánico y la concentración de nitrato en la alimentación. Por otro lado, la relación teórica de S/N utilizada es de 4,6 (Muñoz, 2015), considerando la concentración de tiosulfato y nitrato en el agua residual sintética alimentada.

Tabla III- 6 Alimentación y Micronutrientes del reactor UAF, Aguirre (2014).

Alimentación			***Micronutrientes***	
Componente	**Valor**	**Unidad**	***Componente***	**g/L**
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	2,6	g/L	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1
KNO_3	1,06	g/L	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	30
CH_3COOK	1,81	g/L	$ZnCl_2$	1
$NaHCO_3$	1,5	g/L	$CaCO_3$	2
NH_4Cl	0,056	g/L	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,5
KH_2PO_4	0	g/L	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,25
K_2HPO_4	0,07	g/L	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,25
Micronutrientes	1	ml/L	HCl (37%)	50
			$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0,25
			H_3BO_3	0,5

3.4.4 Estrategia de puesta en marcha

La estrategia de puesta en marcha se divide en dos etapas, en una primera instancia se realiza el enriquecimiento del reactor UAF donde se espera la adherencia de los microorganismos a la zeolita, hasta que se forme la biopelícula. La etapa de enriquecimiento se extendió 35 días, operando por lotes alimentados (*fed batch)*, cambiando la alimentación cada 2 días. Luego se procedió a la etapa de operación en continuo donde se comienza a VCN de 0,02 kg N/m^3/d, hasta llegar a 0,1 kg N/m^3/d, donde el parámetro que varía en la ecuación (12) es el caudal de alimentación, a una misma concentración de nitrato. Dicha modificación se realizó cada vez que se alcanzará la máxima remoción y se estabilizará por al menos 3 TRH (Muñoz, 2015).

$$VCN\left(\frac{kg\ N}{m^3 \cdot día}\right) = \frac{Q\left(\frac{m^3}{día}\right) \cdot C\left(\frac{kg\ N}{m^3}\right)}{V_r\ (m^3)} \qquad (12)$$

Donde C es la concentración de nitrato, Q el caudal de la bomba de alimentación y V_r es el volumen del reactor UAF.

La concentración de nitrato se mantuvo constante a 0,147 g N/L, pero en las mediciones experimentales con el espectrofotómetro se tiene un promedio de nitrato de 0,1038 [g N/L] la que tiene un error del 29,38%. En la Tabla III- 7, se muestra el resumen de los parámetros de la puesta en marcha.

Tabla III- 7 Parámetros de la puesta en marcha

Parámetro	*Valor*	*Unidad*
Volumen reactor	0,8	L
Temperatura	*33 – 35*	*°C*
pH	8 ± 0,3	-
[N]	*0,1038*	*g/L*
S/N	4,6	p/p
C/N	*3*	*p/p*

3.5 Parámetros de control y métodos analíticos

Durante la puesta en marcha se controlan los parámetros relevantes para la desnitrificación simultánea autótrofa y heterótrofa que se muestran en la Tabla III-8.

Tabla III- 8 Parámetros de control y métodos analíticos, Muñoz (2015).

Parámetro de control	*Frecuencia de medición*	*Método analítico*	*Referencia*
Nitrato (NO_3^-)	*3 veces por semana*	*Espectrofotometría UV*	*APHA, 2012*
Tiosulfato ($S_2O_3^{-2}$)	*3 veces por semana*	*Yodometría*	*Harris, 2007*
Sulfato (SO_4^{-2})	*3 veces por semana*	*Espectrofotometría*	*Severiche y González, 2012*
pH	*3 veces por semana*	*Potenciometría*	*APHA, 2012*
DQO	*3 veces por semana*	*Espectrofotometría UV*	*APHA, 2012*

Los análisis se realizan al influente y efluente para lograr la determinación de la eficiencia de remoción de los compuestos de nitrógeno, azufre y materia orgánica durante toda la experiencia. En general, las muestras se tomaban en el mismo horario y se extraía un volumen aproximado de 35 a 40 mL, las que se almacenan a 4°C hasta su posterior análisis, en un tiempo menor a 3 semanas (Severiche y González, 2012), excepto el nitrato que se midió inmediatamente, ya que la máxima duración de éste es de 48 horas. En Anexos del A.1 al A.6, se encuentran los procedimientos realizados en el laboratorio.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Enriquecimiento heterótrofo

La etapa de enriquecimiento se realizó por un periodo de 3 semanas, los parámetros medidos a lo largo del enriquecimiento son los sólidos suspendidos totales, volátiles y la tasa de remoción de nitrato. El crecimiento bacteriano se muestra en la Tabla IV- 1, el inóculo al reactor UAF se realiza con 20220 mg SSV/L y una DQO de 14.640 mg/L.

Tabla IV- 1 Enriquecimiento de bacterias heterótrofas

DÍA	*SST mg/L*	*SSV mg/L*
1	9340	13180
7	9530	10100
14	29280	24600
21	24670	21610
Inóculo	23620	20220

Por otro lado se mide la remoción de nitrato como se muestra en la Tabla IV- 2, donde el porcentaje de remoción se calcula con la diferencia entre la concentración de nitrato en el influente y el efluente. La tasa de remoción de nitrato para el inóculo es de 98,37%.

Tabla IV- 2 Remoción de nitrato en el enriquecimiento heterótrofo

Día	*NO3 influente mg/L*	*NO3 efluente mg/L*	*% de remoción*
1	1612	-	-
2	2352	46	97,2
6	923	12	99,5
8	1104	7,7	99,2
12	1354	11,1	99,0
14	1693	60,6	100
18	571	4	100
21	932	9,3	98,4

4.2 Puesta en marcha

4.2.1 Operación *fed batch*

Desde el día 1 al 35 de la puesta en marcha se realiza el enriquecimiento del reactor UAF, donde se opera *fed batch*, es decir, se alimenta cada dos días y se descarga, para luego ingresar alimentación nueva.

En la Figura IV- 1, se distiguen las etapas del proceso de enriquecimiento en operación *fed batch*, donde ocurre la adherencia de los microorganismos al soporte microbiano (zeolita chilena). Primero cuando se realiza el inóculo (a) y comienza el acondicionamiento de la superficie (b), luego la adherencia a la superficie (c), maduración de la biopelícula (d) y finalmente el desprendimiendo de las bacterias donde se ve el relleno cubierto por ellas (e).

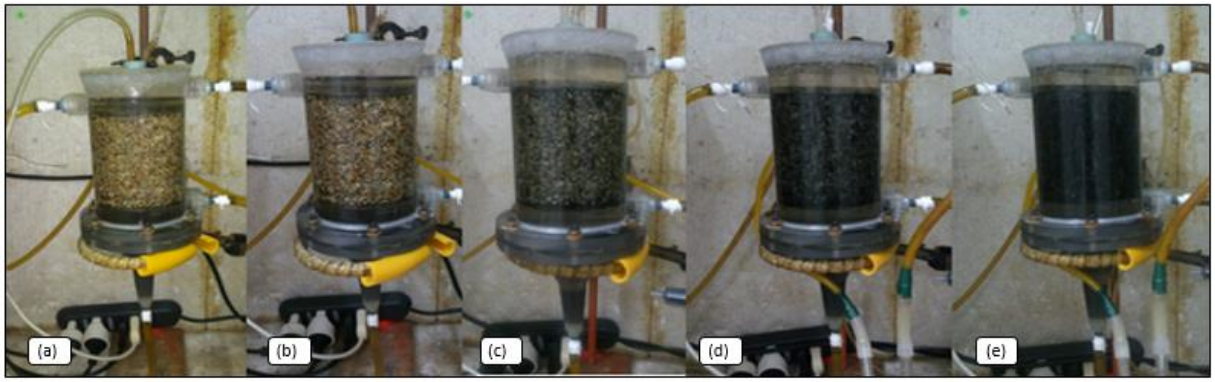

Figura IV- 1 Proceso de formación de la biopelícula: Enriquecimiento del reactor UAF en operación *fed batch, inóculo (a): día 1-5, acondicionamiento de la superficie (b): día 6-11, adherencia a la superficie (c): día 11-16, maduración de la biopelícula (d): día 17-24, desprendimiento de las bacterias en el relleno (e): día 25-35.*

En cuanto al seguimiento de los parámetros de control de la Tabla III- 8, el potencial de hidrógeno, se midió como indicador de la concentración de protones en el medio acuoso, ya que cualquier variación del nivel óptimo de pH dará como resultado la disminución de la actividad enzimática de los microorganismos presentes, incluso hasta que ésta desaparezca. Se controló 3 veces por semana, de modo de asegurar las condiciones del medio apropiadas para el crecimiento de bacterias desnitrificantes heterótrofas y autótrofas. En la Figura IV- 2, se muestra el comportamiento de la variable a lo largo del enriquecimiento donde se observa que en el día 25 se alcanza el rango de pH óptimo para la desnitrificación simultánea, lo que coincide con la última etapa de formación de la biopelícula letra (e) de la Figura IV- 1.

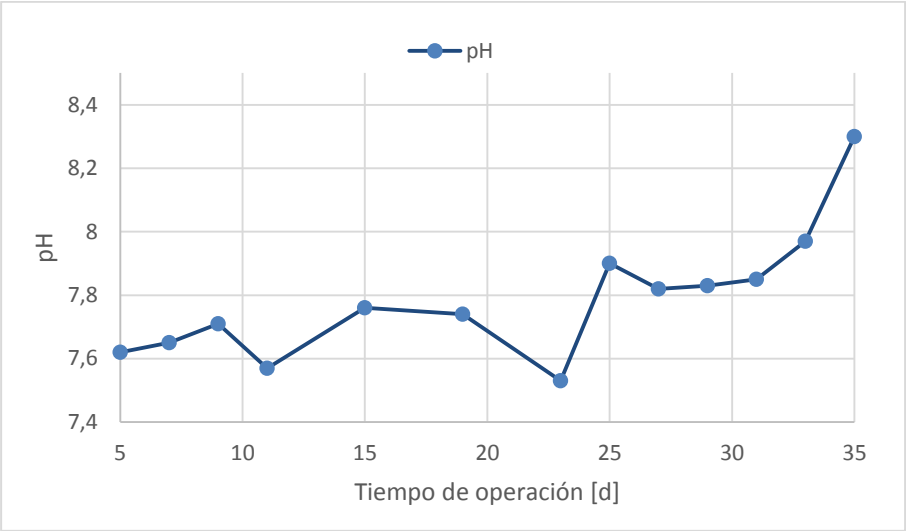

Figura IV- 2 Comportamiento del pH en la etapa de enriquecimiento del reactor UAF.

Los días del 25 en adelante el pH se mantiene dentro de los 8 ± 0,3, comportándose según lo esperado, ya que, el proceso de desnitrificación tiende a aumentar la alcalinidad, puesto que necesita los protones de hidrógeno para su ejecución, ecuación (8). Se considera también, el efecto del componente amortiguador de la alimentación el HCO_3^-, con lo que el medio pudo absorber parte de las variaciones de este parámetro.

En cuanto a la remoción de nitrato durante la etapa de enriquecimiento, en la Figura IV- 3 , se muestra como estas fueron aumentando a partir del día 5 donde se comienza a ver el acondicionamiento de la superficie en el relleno del reactor. Cuando llega a 99,84% de remoción se da término al enriquecimiento.

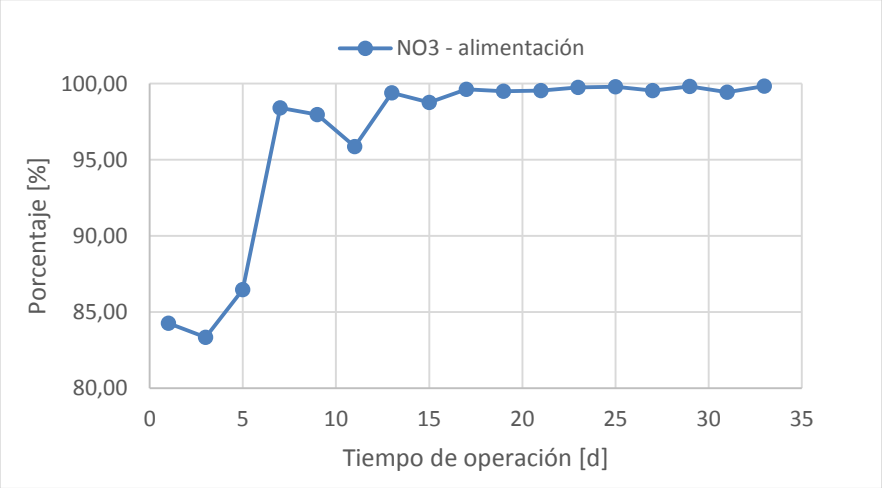

Figura IV- 3 Remoción de nitrato en la etapa de enriquecimiento del reactor UAF.

Adicionalmente se realizó la medición de nitrito (Figura IV- 4) durante el proceso de enriquecimiento, ya que, la existencia de este en pequeñas cantidades ya presenta efectos inhibitorios, en efecto se tiene una desnitrificación incompleta a valores de nitrito desde 48 mg NO_2^-/L, pero sus mayores efectos inhibidores aparecen recién sobre los 100 mg N–NO_2^-/L (Oh *et al*., 2000), por lo tanto en la etapa de enriquecimiento no hubo inhibición por nitrito. Los valores máximos de nitrato y nitrito recomendados en el agua potable según la Organización Mundial de la Salud (OMS): 0,9 mg N-NO_2/L, 11 mg N-NO_3/L, valor que fue superado una vez por el nitrito, que no tiene efectos en la eficiencia de remoción de nitrato.

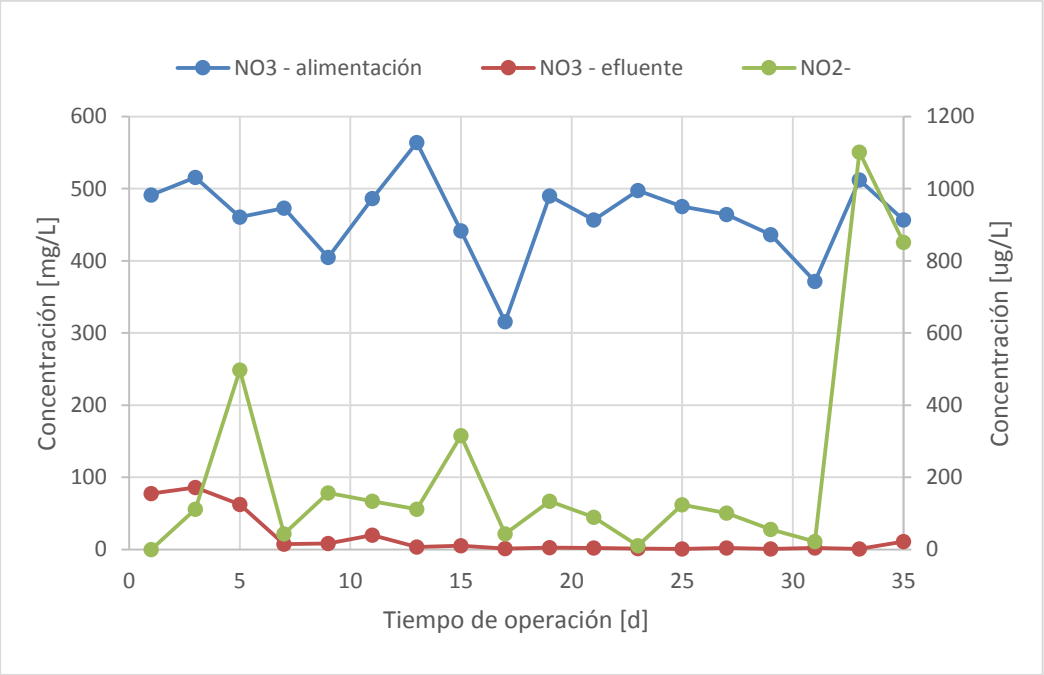

Figura IV- 4 Concentración de nitrato y nitrito en la alimentación y efluente (nitrito solo en el efluente).

La remoción de tiosulfato se muestra en la Figura IV- 5, donde se nota que a partir del día 17, los errores experimentales aumentan considerablemente, llegando al 40% de error para el día 35. Cabe destacar que la remoción teórica se mide con respecto a la concentración de tiosulfato en el agua residual sintética alimentada, que es de 1174 mg $S_2O_3^-$ /L.

En el sistema se utilizó al tiosulfato como donador de electrones, donde el sulfato es uno de los productos esperados de la reacción, considerando que en la relación de S/N de 4,6 el tiosulfato esta en exceso en un 60%.

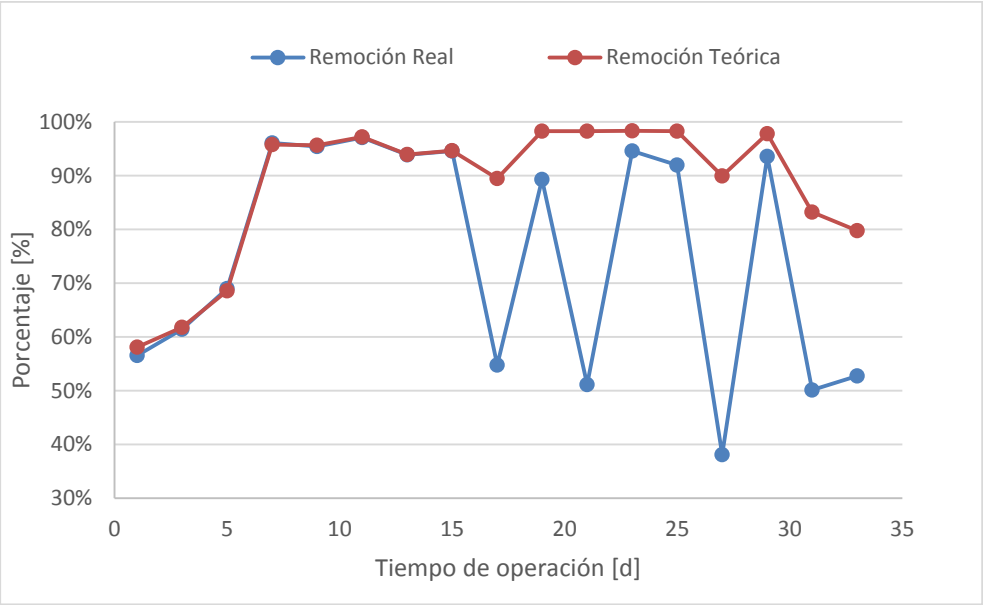

Figura IV- 5 Remoción tiosulfato en la etapa de enriquecimiento.

Por último se realizó un seguimiento al comportamiento de la fuente de carbono orgánico en el agua residual sintética de alimentación, es decir, al acetato CH_3COO^-, en la Figura IV- 6 se muestra la remoción de acetato, la que se mide con la demanda química de oxígeno, cuantificando la capacidad reductora del carbono existente (Valle *et al.,* 2015).

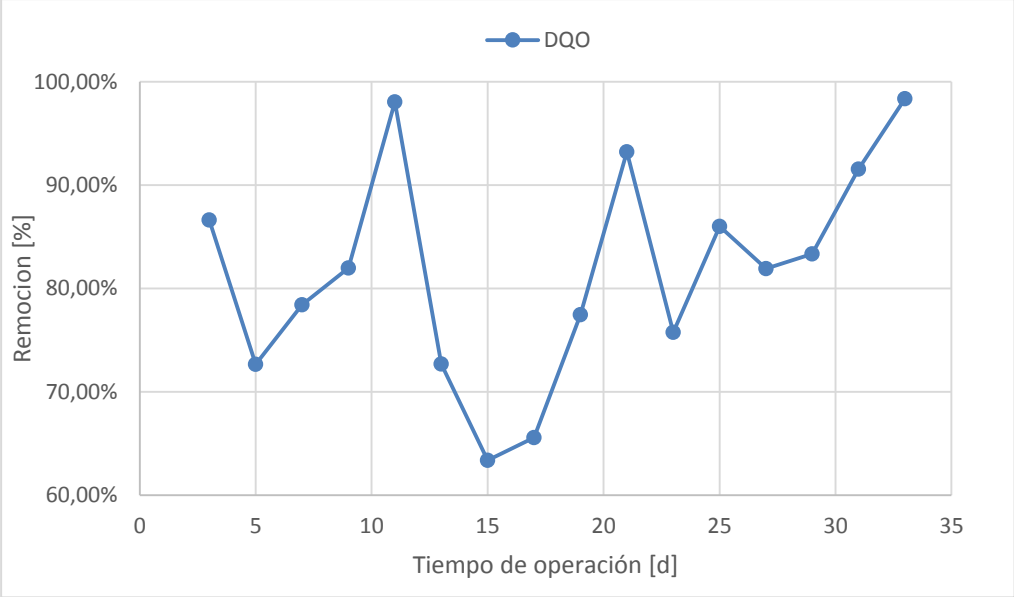

Figura IV- 6 Remoción de acetato en el enriquecimiento del reactor UAF.

4.2.2 Operación continua

La operación continua durante la puesta en marcha, comienza con una VCN de 0,02 kg N/m^3/d, se varia el caudal de alimentación gradualmente hasta llegar a VCN 0,1 kg N/ m^3/día. En la Tabla IV- 3, se muestra el detalle de los valores de los parámetros de operación en el reactor durante la puesta en marcha.

Tabla IV- 3 Parámetro de operación de la puesta en marcha

Día de operación	36-46	47-54	55-61
VCN, kg N/ m^3/d	0,02	0,05	0,1
Q, mL/d	142,76	385,48	770,96
TRH, d	5,60	2,08	1,04

Se midió el pH a lo largo de la operación, observando su variación a medida que se realizaban los cambios en la VCN. En la Figura IV- 7, se muestra que el pH fluctuó entre 7,8- 8,3, los que están dentro de los márgenes óptimos de la desnitrificación simultánea.

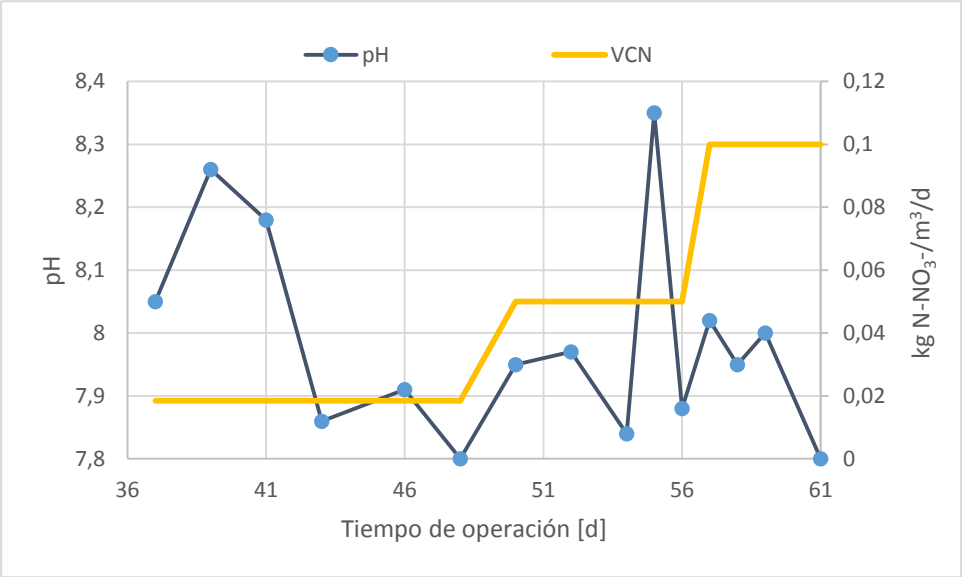

Figura IV- 7 Comportamiento del pH con respecto a la VCN, en el reactor UAF

Comparando con la etapa de enriquecimiento el pH comienza a ascender como efecto de ir aumentando la VCN, lo cual puede deberse a que la reacción redox entre el tiosulfato y el nitrato

consume protones, en la medida en que la DNA se desarrolla el medio tenderá a basificarse, aumentando el pH.

Por otro lado, se realiza el seguimiento de la remoción de nitrato. En la Figura IV 8, se muestra que la concentración de nitrato en la alimentación se fue en promedio 407 [mg/L], actuando como reactivo limitante. Además, se puede observar que la remoción de nitrato se ve afectada con el aumento de la VCN, lo que provoca que incremente su concentración en el efluente, este efecto se atribuye a la capacidad de la biomasa de adaptarse a la carga nitrogenada, pero la recuperación en las remociones se aprecia inmediatamente en la siguiente medición posterior al cambio.

La eficiencia de remoción de nitrato en promedio fue de 99,18%, durante la operación continua dela puesta en marcha, alcanzando una remoción máxima a VCN de 0,02 [N-NO_3^-/m^3/d] de 99,91%.

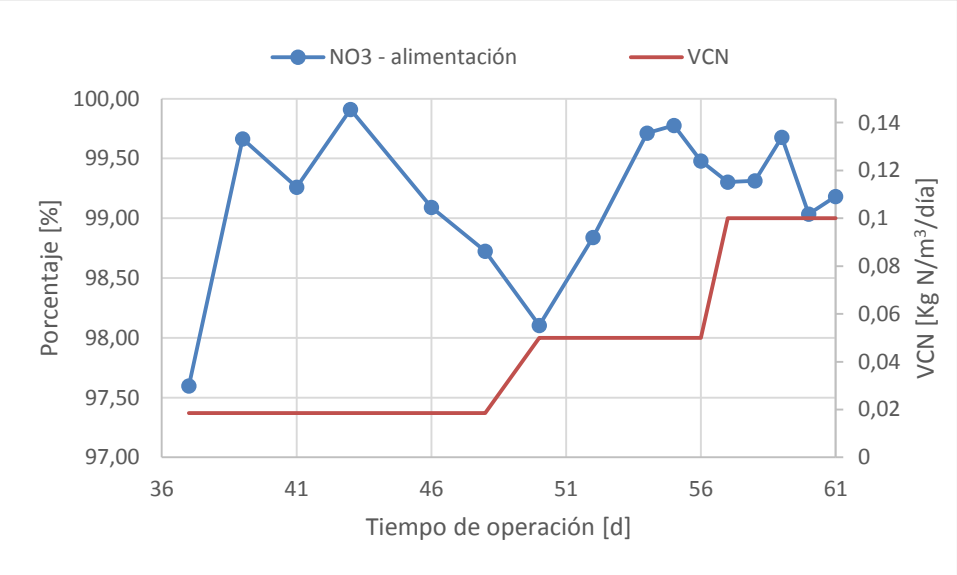

Figura IV- 8 Remoción de nitrato con respecto a la VCN

Durante la operación continua de la puesta en marcha se tienen un promedio de tiosulfato en la alimentación de 800,40 [mg/L] y en la descarga de 289,12 [mg/L], lo que lleva a una remoción promedio de 67%, considerando la relación S/N de 4,6, estando el tiosulfato en exceso un 60%.

El comportamiento de los compuestos de azufre se muestra en la Figura IV- 9, donde se muestra un aumento en la concentración de tiosulfato en la descarga, y una menor producción de sulfato, lo que

se asocia a una inhibición de las bacterias autótrofas, ya que se ha reportado una inhibición parcial a concentraciones de 500 mg de SO_4^{-2} - S/L (Campos *et al.,* 2009).

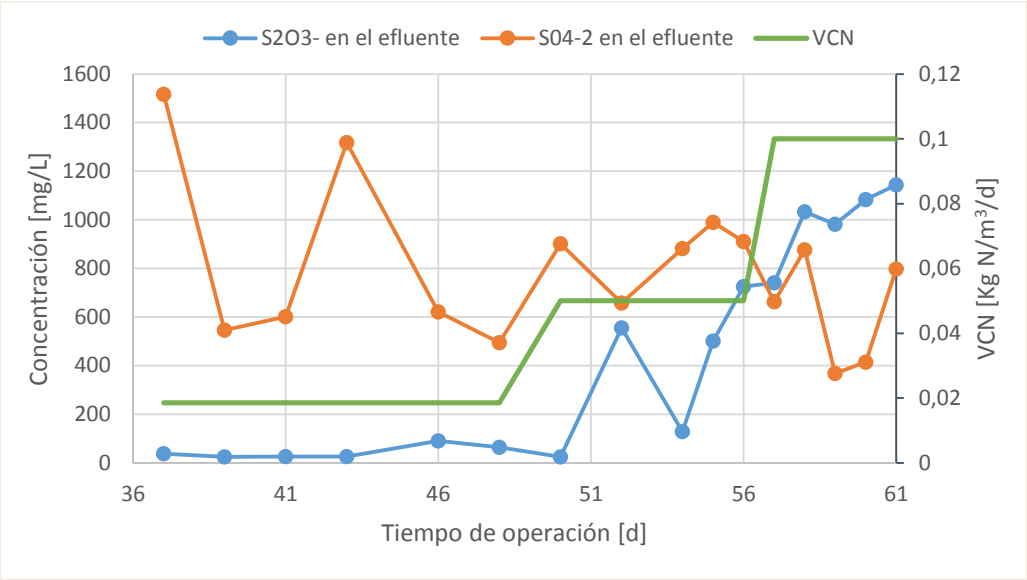

Figura IV- 9 Comportamiento del azufre en el efluente del reactor UAF.

A medida que aumenta la VCN la remoción de tiosulfato se va a pique alcanzando valores del orden del 10%, como se muestra en la Figura IV- 10, el aumento en la carga de nitrógeno y por consiguiente en la carga de azufre, provoca que los microorganismos se desestabilicen y no sean capaces de mantener la remoción de tiosulfato.

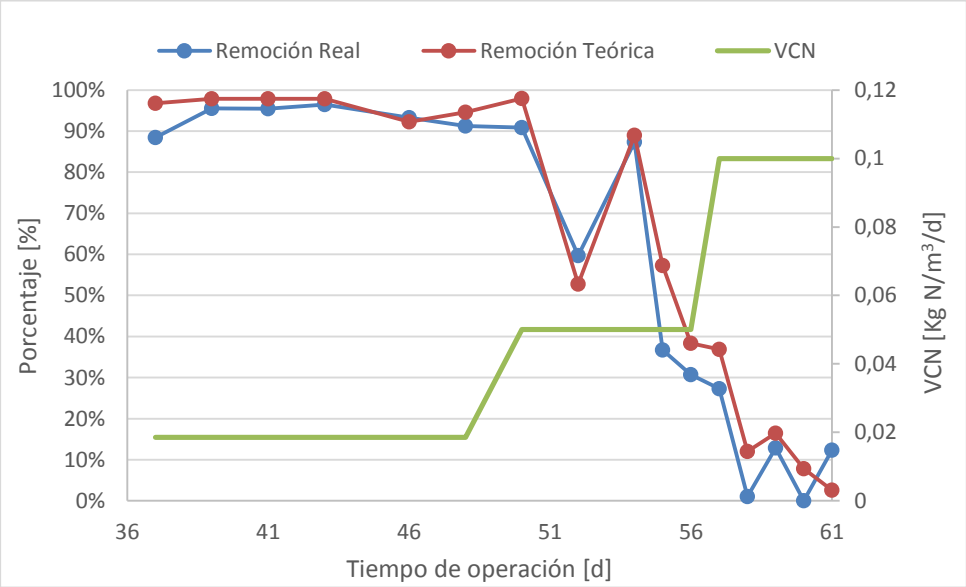

Figura IV- 10 Remoción de tiosulfato según se varía la VCN

La otra opción es la formación de productos intermediarios en la reacción de desnitrificación lo que explicaría la disminución del sulfato. Los resultados de la investigación de Moraes y Foresti (2012), realizada en un reactor de lecho fijo vertical, mostraron que los compuestos intermedios de azufre se producen principalmente cuando el donador de electrones se encuentra en exceso.

Lo anterior indica que se hace necesario analizar que la cantidad de azufre en la descarga sea coherente con la cantidad de azufre alimentado como tiosulfato. Como se muestra en la Figura IV- 11, el balance de masa que se tiene en el reactor no se comporta como lo esperado, es decir, que el tiosulfato que se alimenta no se está convirtiendo en su totalidad a sulfato, es por eso que se observa que el azufre en la descarga es menor a lo que se alimenta.

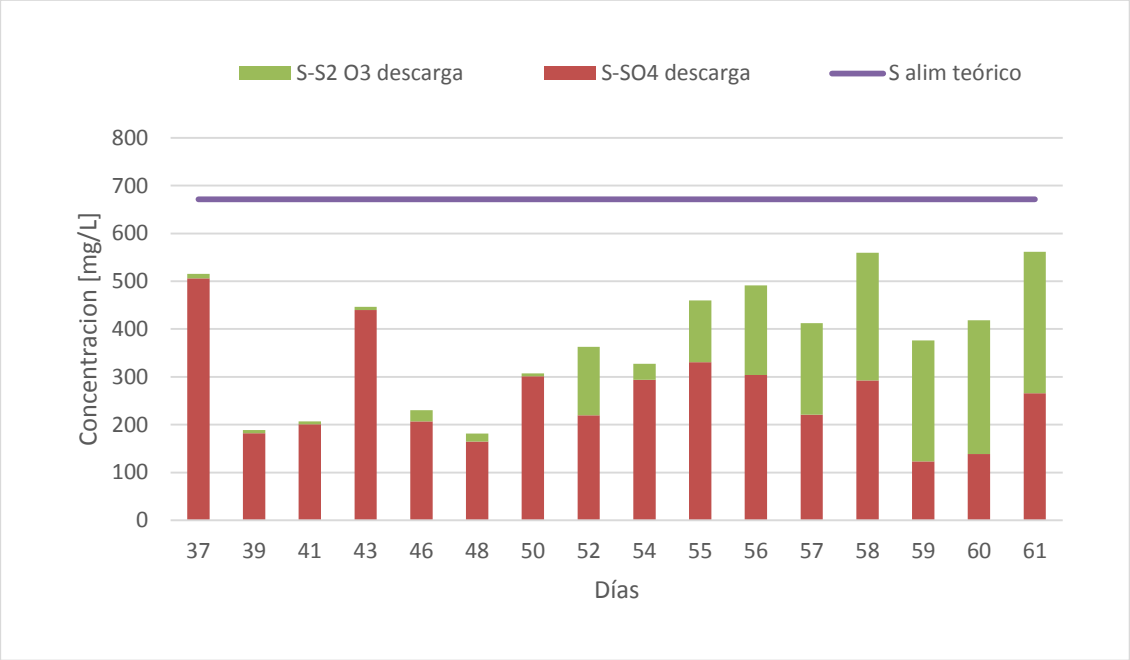

Figura IV- 11 Balance de masa de azufre en el reactor UAF

Un motivo que explica la falta de azufre en la descarga, como se evidencia en el balance de masa, es que existe la posibilidad de que se estén formando compuestos intermedios debido al exceso de tiosulfato en la alimentación. Este caso no es aislado ya que existen estudios previos en donde se muestran que cuanto la relación S/N es sobre la estequiométrico, la conversión a sulfato decae constantemente debido a la formación de compuestos de azufre menos oxidados como el azufre elemental o el sulfito. (An *et al.,* 2010).

Se puede contrastar esta información a la evidencia que se dejó ver durante algunos cambios en los parámetros del reactor, que se podrían atribuir a este efecto, como se observa en la Figura IV- 12, en ocasiones en el reactor se ve una capa blanca delgada, que podría ser azufre elemental precipitado, (Moraes y Foresti, 2012).

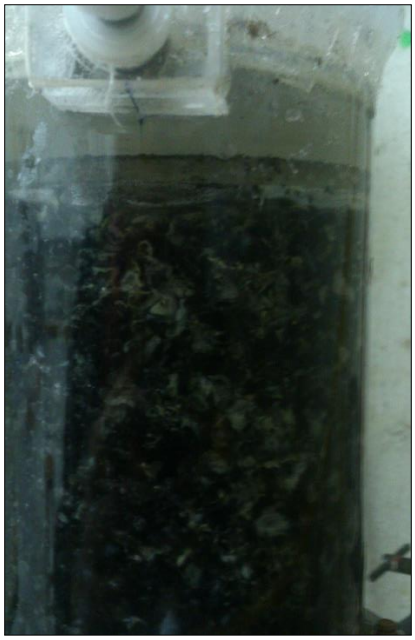

Figura IV- 12 Precipitado en el reactor

En base a las remociones obtenidas de tiosulfato se puede concluir que es necesario optimizar la relación S/N de manera que el tiosulfato disminuya su 60% de exceso. Estos valores concuerdan con la investigación de Cardoso *et al.,* (2006), donde se indican que la relación óptima para llevar a cabo la desnitrificación autótrofa a partir de nitrato es cercana a la estequiométrica para conseguir la degradación completa de nitrato e incluso el nitrito formado de manera transitoria se reduce totalmente a nitrógeno gaseoso.

Finalmente el seguimiento de la remoción de acetato durante los 25 días de la operación continua se muestran en la Figura IV- 13, donde la remoción de materia orgánica total (DQO total) varía según se hacían cambios en la VCN, pero la remoción se recupera mientras se dan más días para la estabilización del sistema, se tiene un promedio de remoción de 72,78%, lo que muestra que el acetato del medio es degradado por las bacterias desnitrificas heterótrofas presentes en el reactor.

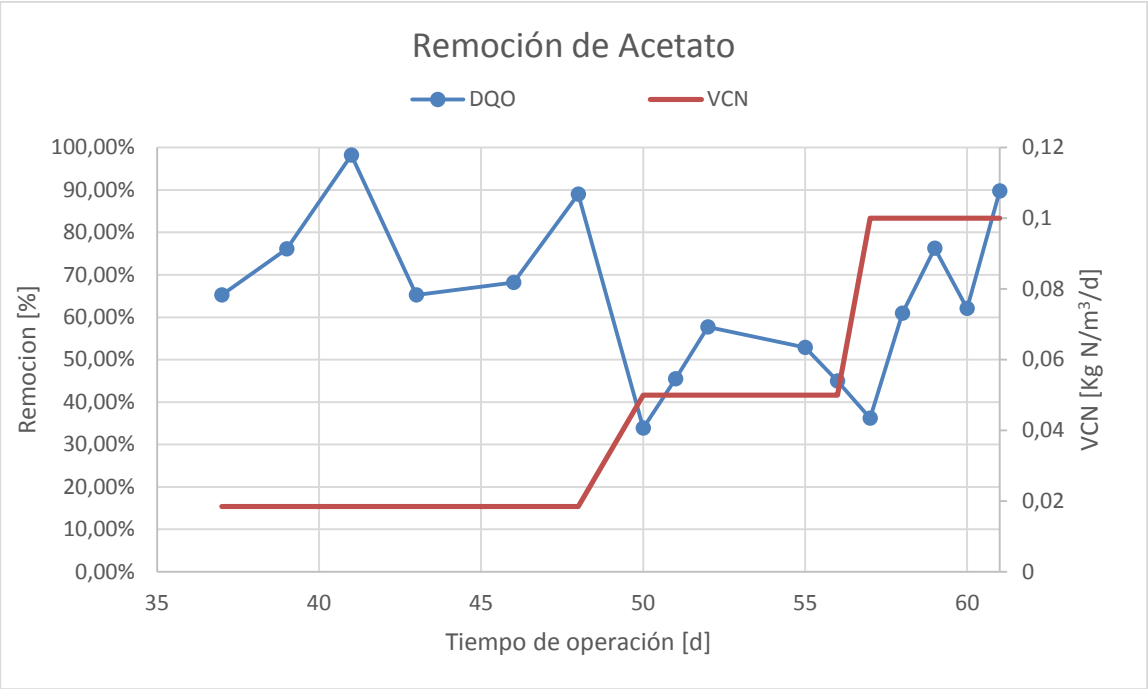

Figura IV- 13 Remoción de acetato en el reactor UAF

El mayor porcentaje de remoción para la operación en continuo se alcanzó a VCN 0,02 [Kg N/m^3/d] de 98,21% y luego a VCN 0,1[Kg N/m^{3}d] se tiene un *peak* de 89,74%. Las fluctuaciones en la remoción de acetato cuando se cambia la VCN se puede atribuir a que al ir aumentando el caudal hay más sustrato disponible y la penetración de este en la biopelícula también disminuye y como resultado la biomasa se encuentra en lo más profundo de la biopelícula y se ve desprovista de la materia orgánica (Montalvo y Guerrero, 2003).

Por otro lado, se tiene el factor de error en el procedimiento analítico para medir la DQO ya que se ha registrado en estudios previos que puede existir una posible interferencia de material inorgánico oxidable sobre las medidas de DQO (Valle *et al.,* 2015). Lo que se soluciona aumentando las réplicas o la dilución de la muestra a analizar o cambiar el método a por la valoración del FAS.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En la etapa de enriquecimiento de las bacterias heterótrofas, se logró hacerlas crecer hasta 20220 mg/L de SSV, valor adecuado para utilizarlas como inóculo en el reactor UAF.

Durante la puesta en marcha del UAF, el reactor se operó a una temperatura de 35°C ± 2°C, se generó un ambiente anóxico y en su operación *fed batch*, se logró hasta 99,84% de reducción de nitratos, un 96,1% de remoción de tiosulfato y 98,36% de reducción de acetato, a razones de S/N de 4,6 y C/N de 3. Estos resultados son indicadores de la presencia de microorganismos autótrofos y heterótrofos, los que formaban parte de la biopelícula adherida a la zeolita.

Finalmente se operó durante 25 días en continuo, con las mismas razones S/N y C/N antes mencionadas, alcanzando una máxima remoción de nitrato de 99,91%, de tiosulfato de 96,51% y de acetato de 98,21% a VCN 0,02 $N\text{-}NO_3^-/m^3/d$.

El pH se mantuvo dentro de los rangos adecuados para la desnitrificación simultánea autótrofa-heterótrofa de 8 ± 0,3.

Los incrementos de la VCN se realizaron de manera gradual hasta alcanzar la VCN base para la operación del reactor UAF, llegando a VCN 0,1 $N\text{-}NO_3^-$/m3/d con un 99,18% de remoción de nitrato, 12% de remoción de tiosulfato y 89,74% de remoción de acetato.

El parámetro que es de atención es el tiosulfato, ya que al encontrarse en exceso en el agua residual sintética no se está oxidando completamente a sulfato, posiblemente debido al efecto de la inhibición por sustrato, porque se favorece la producción de intermediarios de reacción en la desnitrificación, como S elemental o sulfito.

5.2 Recomendaciones

Considerando lo que se espera de la operación del reactor UAF y lo que se modificaría de lo realizado para futuros estudios en el área, se realizan las siguientes recomendaciones:

- Se propone modificar la relación S/N, a una cercana a la estequiométrica para reducir el porcentaje en exceso del tiosulfato en el agua residual sintética de alimentación al reactor UAF.

- Cambiar el método analítico de la medición de DQO, por uno que no tenga interferencia de material inorgánico oxidable.
- Medir más parámetros en la descarga del reactor, de manera de poder distinguir los intermediarios de azufre, como el sulfito o azufre elemental, permite determinar si la oxidación de tiosulfato es incompleta.
- Modificar el diseño del reactor para que la toma de muestra gaseosa sea efectiva, ya que, cuando se intentó sacar muestra con bolsas tedlar, por temas de diferencias de presión estas se inundaban.
- Mejorar la medición de DQO y tiosulfato debido a que el procedimiento acarrea muchos errores en la medición y los valores que se obtienen son muy variables y poco representativos.
- Identificar los organismos del inoculo al reactor, para así determinar con mayor precisión las condiciones de operación optimas de cada tecnología

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, Juan. (2014). "Diseño Y Puesta En Marcha de Un Reactor UASB Híbrido Para La Desnitrificación Simultánea Autótrofa Y Heterótrofa." Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias de la Ingeniería Química, UTFSM, Valparaíso Chile.

Ahn Y., (2006). "Sustainable Nitrogen Elimination Biotechnologies: A Review." *Process Biochemistry* 41(8): 1709–21.

An S., Tang K., y Nemati M. (2010). "Simultaneous Biodesulphurization and Denitrification Using an Oil Reservoir Microbial Culture: Effects of Sulphide Loading Rate and Sulphide to Nitrate Loading Ratio." *Water Research* 44(5): 1531–41. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.10.037.

APHA. 2012. "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater." *References Anales de Hidrología Médica* 5(2): 183–90.

Arumi J., Núñez J., Salgado L. y Marcelino Claret. (2006). "Evaluación del Riesgo de Contaminación con Nitrato de Pozos de Suministro de Agua Potable Rural en Chile." *Rev. Panam Salud Pública* 20(6): 385–92.

Bernet N., Habouzit F., Moletta R. (1996). Use of an industrial effluent as a carbon source for denitrification of a high-strength wastewater. Appl Microbiol Biotechnol, 46:92-97.

Beristain-Cardoso, R. Gómez, J. Rowlette, P.Razo Flores, E.G (2011). "Sulfide and Ammonium Oxidation, Acetate Mineralization by Denitrification in a Multipurpose UASB Reactor." *Bioresource Technology* 102(3): 2549–54. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.084.

Beristain-Cardoso R., Texier A-C., Sierra-Álvarez R., Field J., Razo-Flores E. y Gomez, J. (2008). "Simultaneous sulfide and acetate oxidation under denitrifying conditions using an inverse fluidized bed reactor" *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 82(May): 1115–21.

Betlach M., Tiedje J. (1981). Kinetic Explanation for Accumulation of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide During Bacterial Denitrification. Applied and Environmental Microbiology, 42(6):1074-1084.

Burgoa, F. (2015). Diseño de una planta de tratamiento de aguas residuales con fotobiorreactor de microalgas. Universidad de Valladolid, Valladolid.

Campos, J. Carvalho, S., Portela, R., Mosquera-Corral, A., y Mendez, R. (2009). "Procesos Avanzados de Eliminación de Nitrógeno : Nitrificación Parcial , Anammox , Desnitrificación Autótrofa". Universidad de Santiago de Compostela.

Campos J., Carvalho S., Portela R., Mosquera-Corral A., Méndez R. (2008). Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. Bioresource Technology 99:1293-1299.

Cardoso, R. B., Sierra-Alvarez, R., Rowlette, P., Razo-Flores, E., Gómez, J., y Field , J. (2006). Sulfide

Oxidation Under Chemolitoautotrophic Denitrifying Conditions. Biotechnology and Bioengineering, 95, 1148-1156.

Cervantes-Carrillo F., Pérez J., Gómez J. (2000). Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. Revista Latinoamericana de Microbiología, 42:73-82.

Chen C., Ren, N., Wang, A., Yu, Z., y Lee, D. J. (2008). "Simultaneous Biological Removal of Sulfur, Nitrogen and Carbon Using EGSB Reactor." *Applied Microbiology and Biotechnology* 78(6): 1057–63.

Chung J., Amin K., Yoom, S., Kwon, K. y Bae, W. (2014). "Autotrophic Denitrification of Nitrate and Nitrite Using Thiosulfate as an Electron Donor." *Water Research* 58: 169–78. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.071.

Claus G., Kutzner J. (1985). Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by Thiobacillus denitrificans. Applied and Microbiology Biotechnology, 22:283-288.

Curi, A., Granda W., Lima H. y Sousa W. (2006). "Las Zeolitas Y Su Aplicación En La Descontaminación de Efluentes Mineros." *Información tecnológica* 17(6): 111–18. http://www.scielo. cl/scielo.php ?script=sci_arttext&pid=S0718-07642006000600017&lng=es&nr m=iso&tlng=es (October 7, 2016).

Davis, M., y Masten, S. (2005). Ingeniería y Ciencias Ambientales. McGraw-Hill, 146-148.

Doğan, E., Türker M., Dağaçsan L., y Arslan A. (2012). "Simultaneous Sulfide and Nitrite Removal from Industrial Wastewaters under Denitrifying Conditions." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17(3): 661–68.

Du, R., Peng, Y., Cao, S., Wang, S., Wu, C. (2015). "Advanced Nitrogen Removal from Wastewater by Combining Anammox with Partial Denitrification." *Bioresource Technology* 179: 497–504. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.043.

Englert, A. H., y J. Rubio. (2005). "Characterization and Environmental Application of a Chilean Natural Zeolite." *International Journal of Mineral Processing* 75(1–2): 21–29.

Espinosa Márquez, J., Revah, S., Le Borgne, S. (2010). "Rutas Metabólicas De Oxidación Del Azufre En Bacterias Quimiolitoautótrofas , Relevancia Ambiental Y Biotecnología." *Mensaje Bioquímico* XXXIV: 101–20.

Espinoza, A. (2012). Desarrollo del proceso anammox para la remoción biológica de nitrógeno: enriquicimiento de biomasa anammox con alta carga de compuestos nitrogenados en un reactor discontinuo usando zeolita como soporte microbiano. Memoria, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso.

Fajardo, C., Mora, M., Fernández, I., Mosquera-Corral, A., Campos, J. (2014). "Cross Effect of Temperature, pH and Free Ammonia on Autotrophic Denitrification Process with Sulphide as

Electron Donor." *Chemosphere* 97: 10–15. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.028.

Fajardo, C., A. Mosquera-Corral, J. L. Campos, and R. Méndez. (2012). "Autotrophic Denitrification with Sulphide in a Sequencing Batch Reactor." *Journal of Environmental Management* 113: 552–56. http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.018.

Fajardo, C., Mosquera-Corral, A., Campos, J. L., Méndez, R. (2008). Depuración conjunta de aguas ricas en nitratos y efluentes con compuestos reducidos del azufre. Revista Técnica de Medio Ambiente (127), 38-51.

Fajardo, M. (2011). Autotrophic denitrification for treatment of wastewater with high concentration of sulphur and nitrogen compounds. (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela,España.

FAO. (2014). Post-2015 y los objetivos de desarrollo sostenible. Recuperado el 10 de Mayo de 2015, de FAO: de www.fao.org/post-2015-mgd/es

Fernandez, N., Montalvo, S., Fernandez-Polanco, F., Guerrero, L., Cortes, I., Borja, R., y otros. (2007). Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anaerobic fluidized bed reactors. Process Biochemistry , 42, 721-728.

Fortt, Felipe. (2014). "Puesta en marcha de un reactor de lecho fijo desnitrificante autótrofo, para la remoción de nitrógeno y azufre a partir de nitrito." Tesis para optar al grado de Ingeniero Civil Químico, UTFSM, Valparaíso Chile.

Fuentes-Rivas, Ramos J., Jiménez M., y Esparza M. (2015). "Cacaracterización de la materia orgánica disuelta en agua subterranea del valle del toluca mediante espectrofotometría de fluorescencia 3D" 31(3): 253–64.

Garrido, Marisol. (2014). "Obtención de Biomasa Enriquecida En Bacterias Desnitrificantes Autótrofas Y Formación de Biopelícula Sobre Zeolita Natural Chilena Como Soporte." Tesis para optar al grado de Ingeniero Civil Ambiental, UTFSM, Valparaíso Chile.

Hernández, Natalia. (2014). "Diseño y puesta en marcha de un filtro anaerobio para la desnitrificación autótrofa a partir de nitrato." Tesis para optar al grado de Ingeniero Civil Ambiental, UTFSM, Valparaíso Chile.

Janssen A., Ruitenberg R., Buisman C. (2001). Industrial applications of new sulphur biotechnology. Water Science and Technology, 44(8):85-90.

Jing, C., Ping, Z., Mahmood, Q. (2009). "Simultaneous Sulfide and Nitrate Removal in Anaerobic Reactor under Shock Loading." *Bioresource Technology* 100(12): 3010–14. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.041.

Kim H., Lee I., Bae J. (2004). Performance of a sulphur-utilizing fluidized bed reactor for post-

denitrification. Process Biotechnology, 39:1591-1597.

Kotsopoulos, T., Karamanlis, X., Dotas, D., Martzopoulos, G. (2008) “The Impact of Different Natural Zeolite Concentrations on the Methane Production in Thermophilic Anaerobic Digestion of Pig Waste.” *Biosystems Engineering* 99(1): 105–11.

Lee, S,. y Hojeong Kang. (2016). “The Activity and Community Structure of Total Bacteria and Denitrifying Bacteria across Soil Depths and Biological Gradients in Estuary Ecosystem.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(4): 1999–2010.

Lens, P. N., y Kuenen, J. G. (2001) “The Biological Sulfur Cycle: Novel Opportunities for Environmental Biotechnology.” *Water Science and Technology* 44(8): 57–66.

Li, W., Zhao, Q.-l., Liu, H. (2009). “Sulfide Removal by Simultaneous Autotrophic and Heterotrophic Desulfurization-Denitrification Process.” *Journal of Hazardous Materials* 162(2–3): 848–53.

Liu, Ch., Kang Han, Duu Jong Lee, y Qilin Wang. (2016). “Simultaneous Biological Removal of Phenol, Sulfide, and Nitrate Using Expanded Granular Sludge Bed Reactor.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(9): 4211–17.

Liu, H., Jiang, W., Wan, D., y Qu, J. (2009). “Study of a Combined Heterotrophic and Sulfur Autotrophic Denitrification Technology for Removal of Nitrate in Water.” *Journal of Hazardous Materials* 169(1–3): 23–28.

Manconi, I., Carucci, A., Lens, P. (2007). Combined Removal of Sulfur Compounds and Nitrate by Autotrophic Denitrification in Bioaugmented Activated Sludge System. Biotechnology and Bioengineering , 98(3), 515–723.

Mohseni-Bandpi, Anoushiravan, David Jack Elliott, y Mohammad Ali Zazouli. (2013). “Biological Nitrate Removal Processes from Drinking Water Supply-a Review.” *Journal of environmental health science & engineering* 11(1): 35. http://www.pubmedcentral.nih.go v/articlerender.fcgi?artid=3880027&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Montalvo, S., y Guerrero, L. (2003). “Tratamiento Anaerobio de Residuos (1ª Edición). Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.”

Montalvo, S., Díaz, F., Guerrero, L., Sánchez, E., Borja, R. (2005). Effect of particle size and doses of zeolite addition on anaerobic digestion processes of synthetic and piggery wastes. Process Biochemistry , 40, 1475-1481.

Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., y otros. (2012). “Application of Natural Zeolites in Anaerobic Digestion Processes: A Review.” *Applied Clay Science* 58: 125–33. http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2012.01.013.

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 and Biodegradation 108: 158–65.

Moraes, B., Souza, T., y Foresti, E. (2012). “Determination of the Intrinsic Kinetic Parameters of Sulfide-Oxidizing Autotrophic Denitrification in Differential Reactors Containing Immobilized Biomass.” *Bioresource Technology* 104: 250–56. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.050.

Metcalf y Eddy. (1998). Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento vertido y reutilización (Tercera edición ed., Vol. II). Mc Graw-Hill.

Muñoz, Carla. (2015). “‘ Operación de un reactor anaerobio de lecho fijo desnitrificante autótrofo para la remoción simultánea de azufre y nitrógeno a partir de nitrato." Tesis para optar al grado de Ingeniero Civil Ambiental, UTFSM, Valparaíso Chile.

Navarro , J. (2008). Diseño, construcción y evaluación de filtros anaerobios de flujo ascendente para el tratamiento de las aguas residuales provenientes de Petrosantander (Colombia) inc. Universidad Indsutrial de Santander, Escuela Química.

OEHS. (2005). Nitrogen reducing technologies for onsite wastewater treatment systems. Office of Environmental Health & Safety, Washington State Department of Health.

Oh, S., Bum, M., Yoo, Y., Zubair, A., Kim, I. (2002). Nitrate removal by simoltaneous sulfur utilizing autotrophic and heterotrophic denitrification under different organics and alkalinity conditions: batch experiments. Water Science and Technology , 47, 237-244.

Oh, S., Kim, K., Choi, H., Cho, J., Kim, I. (2000). Kinetics and physiological characteristics of autotrophic dentrification by denitrifying sulfur bacteria. Water Science and Technology , 42(3), 59–68.

Offre, P., Anja Spang, y Christa Schleper. (2013). “Archaea in Biogeochemical Cycles.” *Annual Review of Microbiology* 67: 437–57. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23808334.

Pan, Y., Liu Y., y Zhiguo Y. (2013). “Effect of H_2S on N_2O Reduction and Accumulation during Denitrification by Methanol Utilizing Denitrifiers.” *Environmental Science and Technology* 47(15): 8408–15. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.003.

Peirano, Clio. (2016). "*Eliminación Biológica de Azufre , Nitrógeno Y Carbono Mediante Desnitrificación Autótrofa / Heterótrofa Simultánea*". Tesis para optar al grado académico de Magíster en Ciencias de la Ingeniería Química, UTFSM, Valparaíso Chile.

Pérez J. (1998). Estudio y evaluación del efecto del pH y la fuente de electrones en la desnitrificación en estado estacionario. Tesis para optar al grado de Magíster en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México. Página 30.

Pokorna, D., y Zabranska, J. (2015). Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. Biotechnology Advances, 33, 1246–1259.

Reyes-Avila, J., Razo-Flores, E., y Gomez, J. (2004). “Simultaneous Biological Removal of Nitrogen, Carbon and Sulfur by Denitrification.” *Water Research* 38(14–15): 3313–21.

Sánchez J., Sanabria J. (2009). Metabolismos microbianos involucrados en procesos avanzados para la remoción de Nitrógeno, una revisión prospectiva. Revista Colombiana de Biotecnología, XI(1):114-124.

Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., y Strous, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. FEMS Microbiology Reviews, 27, 481-492.

Severiche, C., y González, H. (2012).. “Aguas Por Método Turbidimétrico Modificado Analytical Evaluation for the Determination of Sulfate in Water By Modified Turbidimetric Method.” 3(2): 6–11.

Show, K.-Y., Lee, D.-J., y Pan, X. (2013). “Simultaneous Biological Removal of Nitrogen-Sulfur-Carbon: Recent Advances and Challenges.” *Biotechnology Advances* 31(4): 409–20. http://dx.doi.org /10.1016/j.biotechadv.2012.12.006.

Soto, Gonzalo. (2016). “Desnitrificación autótrofa a partir de nitrato en un reactor EGSB, usando tiosulfato como agente reductor” Tesis para optar al grado de Ingeniero Civil Químico, UTFSM, Valparaíso Chile.

Su, Jun Feng, Kai Zhang, Ting-lin Huang, Gang Wen, Lin Guo y Shao-fei Yang. (2015). “Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification at Low Nutrient Conditions by a Newly Isolated Bacterium, Acinetobacter Sp. SYF26.” *Microbiology (United Kingdom)* 161(4): 829–37.

Sun, Y., y Nemati, M. (2012). “Evaluation of Sulfur-Based Autotrophic Denitrification and Denitritation for Biological Removal of Nitrate and Nitrite from Contaminated Waters.” *Bioresource Technology* 114: 207–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.061.

Tang, K., An, S., y Nemati, M. (2010) “Evaluation of Autotrophic and Heterotrophic Processes in Biofilm Reactors Used for Removal of Sulphide, Nitrate and COD.” *Bioresource Technology* 101(21): 8109–18. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.037.

Tang, Kimberley, Vikrama Baskaran, y Mehdi Nemati. (2009). “Bacteria of the Sulphur Cycle: An Overview of Microbiology, Biokinetics and Their Role in Petroleum and Mining Industries.” *Biochemical Engineering Journal* 44(1): 73–94.

Wang, L. K., Shammas, N. K., y Hung, Y. T. (2009). Handbook of Environmental Engineering Vol.9. Humana Press.

Wang, S., y Peng Y. (2010). “Natural Zeolites as Effective Adsorbents in Water and Wastewater Treatment.” *Chemical Engineering Journal* 156(1): 11–24.

Xu, X., Chen, C., Wang, A., Guo, W., Zhou, X., Lee, D. J., Ren, N., y Chang, J. S. (2014). “Simultaneous

Removal of Sulfide, Nitrate and Acetate under Denitrifying Sulfide Removal Condition: Modeling and Experimental Validation." *Journal of Hazardous Materials* 264: 16–24. http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.056.

Yin, Zhixuan, Li Xie, Samir Kumar Khanal, y Qi Zhou. (2015). "Interaction of Organic Carbon, Reduced Sulfur and Nitrate in Anaerobic Baffled Reactor (ABR) for Fresh Leachate Treatment." *Environmental technology* 3330(just-accepted): 1–33.

Zhou, W., Sun, Y., Wu, B., Zhang, Y., Huang, M., Miyanga, T., y otros. (2011). "Autotrophic Denitrification for Nitrate and Nitrite Removal Using Sulfur-Limestone." 23(6): 991–97.

ANEXOS

A.1 pH (APHA, 2012).

Principios: La medición del pH se efectúa para controlar la estabilidad del reactor, al ser esta una variable crítica ya que al bajar de los 6,5, se considera que el medio se está acidificando y la población de bacterias podría disminuir al no estar en el rango óptimo de crecimiento, y por lo tanto su capacidad de degradación que las caracteriza disminuye, en este escenario se aumenta el pH agregando un exceso de bicarbonato para aumentar la alcalinidad de alimentación preparada para el reactor.

Este procedimiento se realiza a fin de verificar que el valor se mantenga entre 6 y 8, que es el rango que permite el crecimiento de *Thiobacillus Denitrificans* óptimamente.

Equipos y materiales:

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

Procedimiento

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

Cálculo:

- Directamente de la lectura entregada por el equipo.

A.2 Método espectofotometrico uv-vis para determinación: nitratos (APHA, 2012).

Principios: Este método se basa en la técnica con luz ultravioleta ,donde se mide la absorbancia del nitrato a 200 nm la cual es adecuada para aguas que no presentan una carga orgánica elevada ,es decir su contenido de materia orgánica es bajo. La curva de calibrado verifica la Ley Lambert-Beer hasta 1 mgN/L. La medida de 220 nm hace posible una rápida determinación del nitrato, dado que la materia orgánica no absorbe a tal magnitud y el nitrato no lo hace a 275 por lo que se puede utilizar una segunda medida a 275 para corregir el valor de nitrato. La corrección puede variar dependiendo de los distintos

tipos de aguas se le agrega 1 mL de ácido clorhídrico 1 N para eliminar posibles interferencias. Se recomienda el análisis de inmediato de las muestras de lo contrario congelar no más allá de 4 días.

Equipos y materiales

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

Reactivos y soluciones

- Agua exenta de nitrato
- Utilizar agua destilada o re-destilada, desionizada de la máxima pureza posible para preparar todas las soluciones y diluciones
- **Solución Stock de Nitratos**
    - Pipetear 1 mL de la solución patrón de NO_3^- (1000 mg/L), y se aforan a 100 mL (esta solución tiene una concentración 10 mg/L).preparar en el momento.
    - En caso de no contar con la solución patrón se debe secar nitrato de potasio KNO_3 en horno a 105°C durante 24 horas, de los cuales se disuelven 0.7218 g en agua y se diluye a 1L; esta solución tiene una concentración de 1,00 mL = 100 micro gramos de NO^-_3-N. Preservar agregando 2 mL de cloroformo $CHCl_3$/Estable al menos durante seis meses.
- **Solución intermedia de Nitratos**
    - Tomar 100mL de la solución madre de nitratos y se diluyen a 1Lde agua destilada, 1.00mL= 10.0microgramos NO^-_3-N, se conserva con 2mL de cloroformo. Con esta solución se prepara la curva de calibración
- **Solución HCl 1N**
    - Se prepara a partir de 83 mL HCl concentrado llevándose a volumen de 1 L almacenándolo en una botella ámbar para posteriormente estandarizarlo con carbonato de sodio como patrón primario, previamente secado en estufa durante 1 hora a 206-270ºC.Realizar procedimiento bajo campana.

Procedimiento

- Tratamiento de la muestra
- Sobre 50 mL de muestra, filtrada de ser necesario, añadir 1 mL de HCl 1N y mezclar bien, en caso que las muestras no se encuentren dentro de la curva es necesario considerar dilución.
- La conservación de la muestra no se recomienda, en caso de ser necesario no debe exceder las 48 horas de tomada, de ser necesario congelar no más allá de dos días.

Preparación curva de calibración

- Preparar estándares del calibrado de nitrato en el rango de 0 a 7 mg NO^-_3 N/L agregando mediante bureta volúmenes conocidos de la solución intermedia de nitratos. Se trata a los patrones de la misma manera que las muestras

Medida espectrofotométrica

- Leer a 220 nm frente a blanco de agua destilada y a 275 para obtener los interferentes debidos a materia orgánica disuelta.

Cálculo

- Directamente de la curva de calibración, se debe considerar dilución en caso de ser necesario.

Referencia: Standars Methods for the examination of water and wastewater 20th edition, method 4500 NO_3^- B ultaviolet spectrophotometric screening method

A.3 Método turbidimetrico modificado sulfatos (Severiche y González, 2012).

Principios: El ion sulfato precipita en medio acido con cloruro de bario formando cristales de Sulfato de bario de tamaño uniforme, tal cantidad es proporcional a la concentración de sulfatos presentes en la muestra y la absorbancia luminosa d-Ne la suspensión; puede ser medido espectrofotométricamente a 420 nm, siendo la concentración de sulfatos determinada respecto a una curva de calibración de acuerdo con los métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales preparados por la APHA.

Este método nos permite determinar hasta una concentración de 40 mg/L de sulfatos, en caso de presentar una concentración mayor es necesario diluir y de presentar turbidez filtrar o centrifugar, la posible interferencia de sílice y muestras con alto contenido de materia orgánica, pero este no es el caso. Las muestras pueden colectarse en frascos de plástico o vidrio. Dado que ciertas bacterias pueden reducir el sulfato a sulfuro, especialmente en muestras contaminadas, almacenar a temperatura 6°C por un período máximo de 28 días.

Equipos y Materiales

- Material común de vidrio de uso en laboratorio, ejemplos volumétricos, vasos de precipitado.
- Espectrofotómetro ultravioleta UV-VIS para trabajar a 420nm con celdas de paso óptico de 1cm
- Reactivos y soluciones
- Solución trazable de sulfatos P.A. Merck
- Cloruro de bario di hidratado P.A. Merck
- Solución acondicionadora para sulfato:
    - Es utilizada como forma de acondicionamiento al proporcionar un método de suspensión para los iones sulfatos al ser leídos en el espectrofotómetro, es de vital importancia ya que al no usarla precipitaría todo el analito al momento de la adición del cloruro de bario.
    - Su preparación debe ser en orden agregando a un vaso precipitado de un litro y mezclando después de cada adición: 300 mL de aguas destilada, 30 mL ácido clorhídrico concentrado, 100 mL de alcohol isopropilico y 75 gramos de cloruro de sodio, finalmente añadir 50 mL de glicerol medidos en probeta, mezclar todo y llevar a volumen final de 500 mL con agua destilada, esta solución es estable durante seis meses en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Procedimiento:

- Las condiciones ambientales no tienen mayor influencia en las condiciones del ensayo

Preparación de la curva de calibración: Se utilizó el método de adiciones estándar para la curva de calibración, de esta manera se agregaron volúmenes crecientes de solución trazable de sulfatos mediante bureta a matraces aforados de 100 mL para obtener al menos seis calibraciones que van desde los 0 mg/L a 40mg/L.

A continuación se transfirieron estos patrones a vasos precipitados de 100mL y se adicionaron 2,5 mL de solución acondicionadora y se agitó en cada vaso mediante varilla de vidrio, luego se adiciono una pequeña cantidad de cristales de cloruro de bario y se agito nuevamente hasta la disolución de los cristales.

Una medida crítica de este método es que debe ser leído antes de cinco minutos en espectrofotómetro a 420 nm en celda de 1 cm de paso óptico .y se crea la curva de calibración

No es necesario realizar una curva de calibración cada vez que se realice una medición, pero si se debe comprobar la validez de la existente, para ello se prepara un patrón de 20 mg/L de la solución trazable se sulfatos y se lee como muestra normal si el resultado es coincidente en rango del 10% se considera que la curva es válida y es posible realizar la medición de las muestras, de no ser así se debe repetir el patrón o construir una nueva curva de calibración.

Cálculos

La concentración puede ser leída directamente en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración, hay que considerar dilución y corregir.

Referencia: Standars Methods for the examination of water and wastewater 20th edition, method 4500-SO42-E. Turbidimetric Method

A.4 Determinación de nitritos por método espectrofotométrico (APHA, 2012).

Principio: Se fundamenta en la base de la formación de un colorante azo purpura rojizo (compuesto azo), el cual se desarrolla en un pH ácido por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con N-(1-Naftil)- etilendiamina dihidriclorada (diclorhidrato de NED). El rango de aplicación de este método va desde los 10 a 1000 ug/L. El sistema de color obedece la ley de Lambert-Beer hasta 180 ug/L con 1 cm de paso de luz a 543 nm. El

Colección, preservación y almacenaje de muestras: Las muestras pueden colectarse en frascos de plástico o vidrio, no agregar preservantes ácidos, analizar dentro de un plazo máximo de 48 horas para prevenir la conversión bacterial de nitrito a nitrato, refrigerada a 4°C, de lo contrario congelar no más allá de 1-2 días.

Equipos y materiales

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

Reactivos y soluciones

- Agua exenta de nitrito
- Ácido fosfórico (Sigma Aldrich art. 100317)
- Sulfanilamida (Merck art. 100731)
- Permanganato de potasio (Merck art. 105084)
- N-(1-Naftil)- etilendiamina dihidriclorada (Merck art. 106237)
- Patrón Nitrito (Merck art. 106549)

Procedimiento

- Preparación del reactivo.
    - Disolver 100 mL ácido fosfórico al 85% en 800 ml de agua destilada y 10 gramos de sulfanilamida, luego de disolver completamente agregar 1 gramo de N-(1-Naftil)-etilendiamina dihidriclorada, aforar a 1 litro en botella ámbar. Refrigerar.
- Solución stock de nitrito.
    - Pipetear 0,1 mL de la solución patrón de NO_2^- (1000 mg/L), y se aforran a 500 mL (esta solución tiene una concentración 200 ug/L).preparar en el momento
    - En caso de no contar con solución patrón, se deben disolver 1,232 gramos de $NaNO_2$ (1mL=250ug), previamente secado a 105 °C, por una hora, al menos y enfriar en desecador (20 minutos) y ser retrovalorado con permanganato de potasio. Aforar a 1000 mL.
- Tratamiento de la muestra
    - Filtrar para eliminar cualquier solido suspendido con un filtro de membrana (filtro pirinola) de 0,45 µm, en caso de ser necesario.
    - Tomar 50 mL de muestra de agua y se agregan 2 mL de reactivo de color (reactivo de NED), dejar actuar por 10 minutos.

- Medir la absorbancia a 543 nm de la muestra y de los estándares.

Cálculo

Directamente de la curva de calibración realizada, se debe contar dilución en caso de ser necesario

Referencia: Standars Methods for the examination of water and wastewater 20th edition, method 4500-NO2- Colorimetric Method.

A.5 Determinación de DQO por espectrofotometría UV-visible (APHA, 2012)

Principio: La demanda química de oxígeno (DQO) se define como la cantidad de un oxidante específico que reacciona con la muestra bajo condiciones controladas. La cantidad de oxidante consumido se expresa en términos de su equivalencia en oxígeno. Por sus propiedades químicas, el dicromato es el oxidante utilizado. Cuando una muestra es digerida, el ión dicromato oxida la materia orgánica presente en la muestra. Esto resulta en un cambio del cromo en estado hexavalente (Cr^{+6}) a un estado trivalente (Cr^{+3}). Ambas especies crómicas son coloreadas y absorben en la región visible del espectro. El ión dicromato ($Cr_2O_7^{-2}$) absorbe fuertemente en la región de los 400 nm, donde el ión crómico (Cr^{+3}) absorbe mucho menos. El ión Cr+3 absorbe fuertemente en la región de los 600 nm, donde el ión dicromato tiene una absorción cercana a cero.

Para valores de DQO entre 100 y 900 ppm se determina el incremento de Cr^{+3} a los 600 nm. Los valores más altos pueden determinarse por dilución de la muestra.

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

Equipos y materiales

- Espectrofotómetro para trabajar en el rango de 600 nm
- Digestor (150 ºC)
- Material de uso común en laboratorio.
- celdas plásticas 1cm de paso óptico.

Reactivos y soluciones

- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
- sulfato de plata ($AgSO_4$).
- Sulfato de mercurio ($HgSO_4$)
- Ftalato ácido de potasio (KHP) ($HOOCC_6H_4COOK$).

Solución digestora

- Se disuelven en 500mL agua destilada las siguientes cantidades de reactivos:
- 10,216 g Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$, previamente secado por dos horas a 105°C.
- 167 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- 33.3 gramos de sulfato de mercurio $HgSO_4$ (esta cantidad depende de la cantidad de cloruros presentes en la muestra la cual debe ser de una relación $HgSO_4$:Cl^- igual o superior a 10:1
- dejar enfriar y aforar.

Solución catalítica

- Disolver en un litro de ácido sulfúrico 10,7 gramos de sulfato de plata ($AgSO_4$) dejando en agitación por 48 horas.
- Solución patrón DQO.
- Disolver 0,1 gramos de Ftalato ácido de potasio (ligeramente aplastado y secado a 104°C hasta peso constante).Esta solución tiene una concentración de 1176 mg DQO aproximadamente.

Procedimiento

- En tubo de DQO se agregan cuidadosamente 1,5 mL de solución digestora.
- Posteriormente 3,5 mL de solución catalítica esta adición debe ser cuidadosamente por las paredes del tubo, para observar la separación de fases, el tubo se puede calentar por lo que se reitera el sumo cuidado de la operación a realizar.
- Tomar 2,5 mL de muestra diluida o no, en caso de ser necesario, y se agregan al tubo.
- Sellar el tubo con teflón y cierra herméticamente con la tapa.
- Agitar el contenido del tubo y colocar en un digestor previamente calentado a 150°C por dos horas, después de transcurrido el tiempo dejar enfriar a temperatura ambiente.

- El blanco es un tubo sin digerir, se comprueba este blanco con un tubo digerido
- Calcular los volúmenes de solución patrón y se realizan los pasos mencionados anteriormente.
- Realizar la medida espectrofotométrica a 605 nm, traspasando cuidadosamente el contenido del tubo a una cubeta de 1cm de paso de luz.
- Muestras y estándares se tratan de la misma manera.

Cálculo

Directamente de la curva de calibración, considerar factor dilución en caso de ser necesario.

Referencia: Standars Methods for the examination of water and wastewater 20th edition, method 5220-COD D. Closed Reflux,Colorimetric Method.

A.6 Valoración óxido-redución: tiosulfatos (Harris, 2007)

Principios: Se determina el tiosulfato presente en las muestras por yodometría, que es un método volumétrico indirecto en el que los oxidantes son determinados haciéndolos reaccionar con un exceso de iones ioduro y determinándose el iodo liberado con un reductor estándar como el tiosulfato de sodio.

La conservación y almacenamiento debe realizarse en envases de vidrio o polipropileno y su almacenamiento en refrigerador no debe extenderse por más de dos días(4°C), de lo contrario congelar no más allá de siete días.

Materiales

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

Reactivos y soluciones

Reactivos utilizados en la determinación de tiosulfatos.

Código	**Nombre**	**Fórmula**	**Proveedor**
0102-17-7	*Tiosulfato de Sodio pentahidratado*	*$Na_2 S_2 O_3 \cdot 5H_2O$*	*GA ventas.*
105044	*Yoduro potasio*	*KI*	*Merck*
9257.1000	*Cloroformo*	*$CHCl_3$*	*J.T Baker*
7758-05-6	*Yodato de potasio*	*KIO_3*	*Merck*
	Yoduro de Potasio libre de Yodato	*KI*	

- Yoduro de potasio 10%.
- Solución Tiosulfato de Sodio 0,1N ($Na_2 S_2 O_3 \cdot 5H_2O$), p.a.
- Solución de yodo 0,1N.
- Solución de almidón al 1%.
- Solución de yodo 0,1N.
- Yodato de Potasio (KIO3) 0,1 N, patrón primario.

Procedimiento

- La muestra es tomada en envases de polipropileno y su análisis es en el transcurso de unos minutos no se almacena de esta se toman en duplicado, 10 [mL] de muestra previamente filtrada y se vacía en un matraz Erlenmeyer y se titula con una solución de iodo 0,1000 N aproximadamente, desde bureta hasta que la muestra varíe de incolora a amarillo pálido ,luego esta se valora con tiosulfato de sodio desde bureta 0,1000n aproximadamente hasta que esta vire a un color incoloro ,luego se agregan unas gotas de almidón para ver si quedan trazas de iodo de ser asi se observara una color verdoso y se debe continuar titulando hasta que la muestra quede incolora.
- Preparación tiosulfato de sodio ($Na_2 S_2 O_3 \cdot 5H_2O$):

- Se pesa en balanza granataria 25.0 g de $Na_2 S_2 O_3 \cdot 5H_2O$ y se transfieren a una botella ámbar de un litro, mediante un embudo de vástago largo, utilizando agua recién hervida y previamente enfriada, se agregan diez gotas de cloroformo y se lleva a volumen de homogeniza la solución y se deja reposar un par de días para su posterior estandarización.

- Estandarización tiosulfato de sodio ($Na_2 S_2 O_3 \cdot 5H_2O$) con Yodato de Potasio (KIO_3):
  - Se toma una alícuota de 10 mL de yodato de potasio (patrón primario, el cual se preparó pesando una cantidad de 0,3567 gramos previamente desecados a 110°C durante una hora, y luego se aforaron a 100mL) y se traspasaron cuantitativamente a matraz Erlenmeyer, luego se agregaron 10mL de ácido clorhídrico 1N ó 5 mL de ácido sulfúrico 2N y 10 mL de yoduro de potasio al 10% (o aproximadamente dos gramos del este compuesto), se valoró con tiosulfato desde bureta hasta cambio de color a amarillo pálido y luego se agregó 5 gotas de almidón y se continuo valorando hasta cambio el color de azul vinoso a incoloro ,se realiza duplicado.
- Solución Iodo 0,1 N.
  - Se pesaron 20 gramos de yoduro libre de yodato p.a en 30-40 mL se agua destilada en matraz aforado de un litro con tapa esmerilada, se pesan en balanza granataria 12.7 gramos de Yodo resublimado sobre vidrio reloj y se traspasa cuantitativamente al matraz de aforo. Se tapa el matraz y se deja en agitación hasta que el Yodo se haya disuelto, se deja en reposo por veinte minutos y se lleva al aforo. Se conserva en frasco con tapa de vidrio esmerilado en lugar frio y oscuro.
- Estandarización solución de Yodo con Tiosulfato:
  - En matraz Erlenmeyer se agregan 10 [mL] de la solución de Yodo preparada y se agrega mediante bureta, la solución valorada de tiosulfato de sodio (patrón secundario) hasta que esta tenga un color amarillo pálido, se anota el gasto y se realiza duplicado.
- Solución de almidón:
  - Se realiza una pasta con un gramo de almidón soluble y una pequeña cantidad de agua y se agrega con buena agitación ,100 mL de gua a ebullición y se hace hervir durante un minuto. Se deja enfriar y se agregan tres gramos de yoduro de potasio.

Cálculo

- Conociendo el volumen utilizado de iodos consumido por el iodo de la solución de tiosulfatos como patrón primario se calculan los milimoles totales consumidos por la solución estándar.
- Al saber el volumen de iodo agregado a la muestra se tiene los moles totales de iodo.
- Al restar ambas cantidades sabremos la cantidad de milimoles consumidos por la muestra y de acuerdo con la relación:
- 1[mL] de I2 = 0.1581[g] de $Na_2 S_2 O_3 \cdot 5H_2O$

Referencia: Análisis químico cuantitativo. Daniel Harris 1992