

**CONSTRUCCION, PUESTA EN MARCHA Y MONITOREO DE BIOREACTOR
CON OXÍGENO LIMITADO PARA EL ENRIQUECIMIENTO DE BACTERIAS
OXIDANTES DE AMONIO**

JULIAN ANDRES JIMENEZ ORTA

**Proyecto de grado presentado como requisito para optar por el título de
Ingeniero Químico**

Director

Microbióloga Janeth Sanabria, Ph.D.

Codirectores

Ingeniero Civil Jaime E. Sánchez Ms.C

Ingeniera Química María Helena Pinzón, Ph.D.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA
SANTIAGO DE CALI**

2011

CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Antecedentes.....	4
3.2 Marco conceptual	7
3.2.1 Tratamiento de aguas residuales	7
3.2.2 Etapas de tratamiento de aguas residuales	8
3.2.3 Caracterización de aguas residuales	9
3.2.4 Ciclo del nitrógeno.....	10
3.2.5 Procesos de transformación del nitrógeno	12
3.2.6 Bacterias anammox.....	15
3.2.7 Factores que inhiben el proceso anammox.....	18
4. METODOLOGIA.....	20
4.1 Construcción del reactor SBR	20
4.2 Pruebas de operación del reactor SBR anammox	23
4.2.1 Revisión de funcionamiento del reactor.....	24
4.2.2 Funcionamiento hidráulico de la chaqueta de calefacción	24
4.3 Cambios en las condiciones de operación del reactor SBR.	25
4.3.1 Operación de carga continua de sustratos al reactor SBR.....	25
4.3.2 Burbujeo continuo (Ar/CO ₂).....	26
4.4 Funcionamiento del reactor SBR.....	26
4.5 Enriquecimiento de microorganismos anammox.....	27

Montaje de reactores por lotes para el enriquecimiento de anammox.	27
4.6 Método de medición de concentraciones de sustratos en el reactor	30
5. ANALISIS DE RESULTADOS.....	33
5.1 Etapa inicial de enriquecimiento de las bacterias anammox	33
5.2 Adaptación del inóculo enriquecido en el reactor SBR.....	36
5.3 Consumos de nitrito y amonio en el reactor SBR en la etapa final de experimentación	38
Consumos de NO ₂ y NH ₄ diarios.....	39
5.4 Revisión de los consumos por parte de bacterias anammox en el reactor.....	42
5.5 Imágenes de análisis FISH realizado a la biomasa del reactor.	46
Figura 7. Imagen FISH bajo el nitrimix determinante de bacterias nitrificantes.	47
6. CONCLUSIONES.....	49
7. RECOMENDACIONES	50
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51

1. INTRODUCCION

En la actualidad, la recuperación y tratamiento de las aguas residuales es compromiso fundamental para poder preservar los ecosistemas mundiales, la implementación de procesos de tratamiento y el mejoramiento de los procesos existentes es una necesidad, por esta razón se han generado numerosas investigaciones para un mejoramiento continuo de todos los procesos de tratamiento de aguas residuales.

La contaminación generada por el avance industrial y el crecimiento demográfico va desde los desechos sólidos hasta la contaminación de las fuentes hídricas. Existen diversos tipos de tratamientos enfocados a la remoción de contaminantes de las aguas residuales, pero en su mayoría se enfocan en la remoción de la carga orgánica, dejando presentes en altas concentraciones compuestos como el fósforo o el nitrógeno (Ahn, 2006), la presencia de elevadas concentraciones de compuestos nitrogenados además de ser tóxicos, cambian las proporciones de los nutrientes en el cuerpo receptor poniendo en riesgo el equilibrio del ecosistema en el cual se están vertiendo las aguas residuales.

Para la remoción de los compuestos nitrogenados contaminantes de aguas están planteados tratamientos como las lagunas de maduración, el proceso de nitrificación-denitrificación entre otros. Los sistemas de tratamiento más utilizados en la actualidad son la nitrificación – denitrificación por etapas, siendo eficientes en la remoción pero demandan altas cargas orgánicas en la denitrificación para permitir la transformación de los nitratos, posterior a la nitrificación del amonio en la cual se requiere oxigenación; o grandes terrenos para lograr la asimilación de los compuestos por parte de algas en las lagunas de maduración, estas algas requieren la luz solar por lo que la profundidad del lecho donde se realizará el tratamiento no puede ser alta (Mara, 1992).

Debido a todos los factores limitantes que se presentan para la implementación de un tratamiento de remoción de compuestos nitrogenados, las investigaciones basadas en la utilización de diferentes géneros de bacterias han dado buenos resultados en la remoción de contaminantes. Además, bajo la idea de aplicación de sostenibilidad son necesarias tecnologías de bajo costo y cada vez más eficientes, técnicas que no generen lodo en exceso y que disminuyan los consumos de carbono orgánico como fuente extra necesaria.

Parte de los avances obtenidos en el mejoramiento de los procesos de tratamiento, es el proceso mediante la utilización de microorganismos anammox (oxidantes anaerobios de amonio) (Sanabria et al., 2009), Estos microorganismos transforman el amonio y el nitrito directamente a nitrógeno molecular disminuyendo los costos que generan los tratamientos convencionales, ahorrando hasta un 90% en los costos de operación (Wang et al., 2009).

En este trabajo se enriqueció un cultivo de anammox iniciando en reactores por lotes y posteriormente pasando estos inóculos a un reactor biológico secuencial (SBR) en el cual se monitorearon los consumos de sustratos cargados durante 4 meses de operación.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Construir y evaluar a escala de laboratorio un bioreactor para remover compuestos nitrogenados de aguas residuales mediante el proceso anammox.

2.2 Objetivos específicos

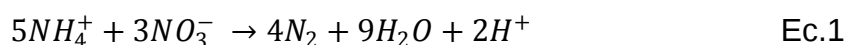
- Estudiar las condiciones de arranque y montaje del reactor a partir de recomendaciones en la literatura.
- Enriquecer un cultivo anammox a partir de inóculos locales para la puesta en marcha del reactor.
- Monitorear el rendimiento de remoción de nitrógeno presente en el reactor en forma de nitrito y amonio.

3. MARCO TEÓRICO

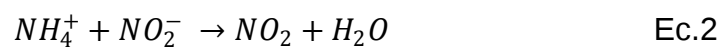
3.1 Antecedentes

Las bacterias anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation) son organismos quimiolitotróficos (pueden utilizar compuestos inorgánicos como aceptores de electrones para la síntesis de adenosin trifosfato (ATP)); el proceso realizado por estos microorganismos oxida el amonio utilizando el nitrito como aceptor de electrones en un ambiente anóxico, esta transformación lleva directamente el nitrito y el amonio a nitrógeno molecular y trazas de nitrato (NO_3^-).

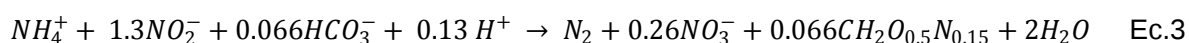
Investigaciones realizadas por Broda (1997), predijeron por medio de cálculos termodinámicos la existencia de ciertos microorganismos quimiolitotróficos capaces de oxidar el amonio utilizando el nitrito como aceptor de electrones, casi dos décadas después, mientras se realizaba una investigación en una planta de tratamiento de aguas residuales, observó que se presentaba conversión de la carga de amonio alimentada al digestor anaerobio, revisando estos resultados, y planteando balances de nitrógeno propuso junto a otros investigadores una expresión para el proceso confirmando lo propuesto en 1977, la Ecuación 1 muestra la expresión que concluyeron luego de la investigación (Mulder, 1995).



Se en 1977 planteaba que el proceso ocurría de manera que el nitrato era utilizado como aceptor de electrones, lo cual era incorrecto. En 1995 se realizaron múltiples ensayos de actividad, se confirmó que la disminución de la carga de amonio era realizada por microorganismos y posteriormente mediante ensayos con trazadores, llegaron a la conclusión de una expresión de la reacción (Van de Graaf et al., 1996), esta expresión era diferente a la planteada por Mulder, ya que el aceptor de electrones era el nitrito y no el nitrato, en la Ecuación 2 se observa la ecuación planteada por Van de Graaf.



Van de Graaf planteó coeficientes para esta ecuación, y en 1999 Strous en conjunto a otros investigadores, utilizando los datos dados por van de Graaf y planteando condiciones óptimas para el proceso en un reactor semicontinuo, llegaron a la siguiente expresión.



Todas estas investigaciones dieron paso a búsquedas de mejoras para el proceso, se realizaron montajes de reactores de membranas en las que queda adherida la comunidad de microorganismos permitiendo la estabilización de los mismos. Los ensayos realizados en reactores de membranas consistían en cargar el sistema con aguas residuales sintéticas a las cuales se les regulaba la concentración de nitrito y de amonio dependiendo de los resultados de la remoción en el reactor; a medida que se consumía más cantidad de nitrito y amonio, se aumenta la concentración de los sustratos en las aguas sintéticas cargadas.

Las aguas residuales no se encontraban en proporciones equivalentes de amonio y nitritos, por esta razón era necesario implementar un proceso preliminar al proceso anammox, como el proceso de nitrificación parcial, el cual transforma el amonio a nitrito parcialmente hasta lograr una relación adecuada de (NO_2^-/NH_4^+) (Dongen et al., 2001).

En los sistemas de tratamiento de aguas residuales, el tratamiento secundario remueve la carga orgánica y transforma el amonio a nitrito y nitrato, al mismo tiempo, ya que los microorganismos oxidantes aprovechan las condiciones del proceso para realizar su metabolismo.

El proceso anammox requiere de concentraciones de amonio y de nitrito similares en el agua residual a tratar, los microorganismos de este género pueden realizar su metabolismo en condiciones de oxígeno limitadas, permitiendo así que los

microorganismos oxidantes de amonio como las *nitrosomonas* transformen el amonio a nitrito generando las condiciones necesarias por los anammox. Se encontró que bajo estas condiciones (nitrificación parcial- anammox en un reactor con oxígeno limitado) se lograba una remoción de 83% del amonio cargado en el afluente (Kartal et al., 1997).

Diferentes configuraciones de reactores se probaron para el enriquecimiento de los microorganismos y la aplicación del proceso anammox, los reactores de membranas permiten una mejor fijación de las bacterias en las paredes de las membranas, dando un crecimiento de mayor actividad (Tsushima et al., 2007). Este es un diseño de reactor recomendado debido a que permite una retención efectiva de biomasa lo cual posibilita trabajar en el sistema con una carga y descargas continuas, cuidando el tiempo de retención hidráulica con la desventaja del alto costo de los sistemas de membranas.

Se conoce que se puede producir una inhibición de los microorganismos a ciertas concentraciones de nitrito las cuales pueden estar desde 2mM hasta 12mM, dependiendo del tipo de microorganismos y del medio que provienen los microorganismos (Dapena-Mora et al., 2007), cargando los sustratos de manera continua se cuida que sean consumidos y no se acumulen llegando a una concentración nociva.

En Rotterdam Holanda se montó el primer reactor a escala industrial para el tratamiento de aguas residuales a partir de anammox. Es un sistema que funciona con flujo ascendente continuo, el reactor está configurado en su interior con un sistema de lecho poroso fluidizado donde se encuentran los anammox enriquecidos, este sistema tiene una eficiencia de remoción de 90-95 %, la carga de compuestos nitrogenados es de 10 kg.- N.- m⁻³.(Wouters et al., 2006).

En estos momentos las investigaciones están centradas en encontrar métodos que reduzcan el tiempo de enriquecimiento, se han encontrado métodos como el

de la utilización de ultrasonido, el cual evidenció avances de una mejora cercana al 14 % en el proceso (Xiumei et al., 2010). Los anammox tienen tiempo de duplicación muy alto, siendo aproximadamente necesarios 12 días, por lo cual el arranque de los reactores a escala real puede durar hasta un año, dependiendo del inóculo. Con inóculos pre-enriquecidos el tiempo de arranque puede disminuirse a 3 meses (Wouters et al., 2006).

3.2 Marco conceptual

3.2.1 Tratamiento de aguas residuales

Los avances tecnológicos y la gran preocupación por la preservación del medio ambiente dan importancia al tratamiento de aguas residuales, ya se han desarrollado diversos métodos para mejorar la calidad y poder devolver el agua residual a los cuerpos de agua bajo unas cargas contaminantes mínimas, pero aun así siguen surgiendo inconvenientes al momento de montar el tratamiento por los costos que demandan.

Amplios estudios han implementado desde hace años la utilización de microorganismos en los tratamientos de aguas residuales empezando a comienzos del siglo XX (Rittmann, 2001), de hecho el tratamiento de aguas residuales se basa en tratamientos biológicos en gran parte, donde una amplia serie de microorganismos se encargan de degradar la carga orgánica y los nutrientes contenidos en ellas.

Continuas investigaciones (Wei et al., 2003; Koivunen et al., 2003) han dado nuevas formas de aplicación para los tratamientos biológicos, modificando los tratamientos ya existentes con la idea de disminuir costos y aumentar la eficiencia del proceso.

3.2.2 Etapas de tratamiento de aguas residuales

3.2.2.1 Tratamiento primario. Son también denominados pretratamientos, los cuales implican la reducción de sólidos en suspensión, o del acondicionamiento de las aguas residuales ya sea por neutralización u otros, se remueven grasas, sólidos gruesos y arenas (Ramalho, 1996).

Los principales tratamientos primarios son los siguientes:

Cribado o desbrozo: Está formado por múltiples rejillas de distintos tamaños, las cuales reducen los sólidos en suspensión de los afluentes de aguas residuales, alcanzan una remoción de un 25% de los sólidos totales suspendidos.

Sedimentación: Esta etapa consigue una remoción de hasta un 60% de los sólidos suspendidos, puede emplearse en varias partes del proceso de tratamiento de aguas residuales, y se puede realizar ya sea por simple sedimentación discreta, donde no se alteran las propiedades físicas de las partículas, o floculada, dando cambios de densidad y aglomerando los sólidos suspendidos.

3.2.2.2 Tratamiento secundario. El tratamiento secundario se encarga de disminuir el contenido orgánico del agua residual degradándolo por medio de los microorganismos existentes en el medio, entre ellos se pueden destacar la utilización de lodos activos y pueden usarse diferentes configuraciones de reactores para lograr la degradación de la materia orgánica, también cuentan con etapas de sedimentación utilizando floculantes para separar el producto de la degradación y adicionalmente etapas de filtración. Esta etapa remueve casi totalmente la carga orgánica de las aguas residuales tratadas.

3.2.2.3 Tratamiento terciario. Son una serie de procesos destinados a mejorar la calidad del efluente del tratamiento secundario. Este tipo de tratamiento posee etapas de separación de sólidos suspendidos como filtros de arena, adsorción en carbón activado (separación de compuestos orgánicos), oxidación química (cloración, ozonización), nitrificación y denitrificación, desinfección entre otros.

También las lagunas y los humedales son parte de los tratamientos terciarios, estos son utilizados específicamente para remover las cargas en exceso de nutrientes presentes en las aguas residuales pre-tratadas como el fósforo o los compuestos nitrogenados, los humedales y las lagunas permiten equilibrar las concentraciones de compuestos nocivos presentes en las descargas de aguas residuales para poder regresarlas a los cuerpos de agua sin que afecten el ecosistema (Rojas, 2000).

Los tratamientos terciarios son poco aplicados debido al costo de su implementación y mantenimiento, en países en desarrollo solo se contempla la eliminación de la carga orgánica como principal factor, debido a los altos costos de la implementación de un tratamiento terciario, permitiendo el vertimiento directo con un tratamiento incompleto. Si los compuestos nitrogenados y los derivados del fósforo no son degradados pueden ser tóxicos para el sistema acuático que recibe los efluentes y toda la fauna y flora que rodea el cuerpo de agua (Rojas, 2000).

3.2.3 Caracterización de aguas residuales

La Tabla 1 muestra los compuestos contaminantes presentes en las aguas residuales, esta clasificación muestra los que están presentes en mayores cantidades y tienen un alto impacto en el medio ambiente.

Tabla 1. Componentes presentes en las aguas residuales.

Sólidos Totales	Sólidos en suspensión	Representan toda la carga orgánica e inorgánica existente en el agua residual, es la parte más contaminante y a la que está dedicado fundamentalmente el tratamiento de las aguas residuales.
	Sólidos sedimentables	
Aceites y grasas		Se encuentran presentes en las aguas residuales dependiendo del foco de la contaminación. Se remueven mediante sistemas primarios.
Nitrógeno	Nitritos	Durante el proceso de tratamiento de las aguas residuales se obtienen estos compuestos como productos de las transformaciones biológicas, en estos procesos el amonio libre y orgánico se convierte en estos dos compuestos.
	Nitratos	
	Orgánico	Toda la carga inicial que trae el afluente de agua residual es de amonio orgánico y amoniaco libre, este es transformado casi totalmente en el tratamiento microbiológico secundario degradándolo a los nitritos y nitratos.
	Amoniaco	
fósforo		El alto contenido de fosforo en las aguas residuales es debido a los fertilizantes y a algunos detergentes, este compuesto genera los mismos problemas que el nitrógeno cuando es descargado en altas concentraciones a los cuerpos de aguas.

3.2.4 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno es un elemento que se encuentra presente en los seres vivos, es indispensable en los procesos biológicos, además cerca del 80% de la atmosfera es nitrógeno en forma de nitrógeno molecular N_2 .

El nitrógeno se transforma a distintos estados de oxidación y reducción: pasa de nitrógeno molecular (N_2) a amoníaco (NH_3) y a compuestos carbono-nitrogenados, luego a óxidos de nitrógeno, y finalmente a N_2 , cerrando así el ciclo (Warakomski et al., 2007). Los microorganismos son un factor esencial en el ciclo del nitrógeno, ellos asimilan los compuestos nitrogenados difíciles de descomponer, reduciéndolos a formas simples fácilmente asimilables.

En las últimas décadas, con el crecimiento demográfico, y la alta demanda de los consumidores de fertilizantes y productos agrícolas, la fijación industrial de nitrógeno (proceso Haber-Bosch) y la utilización de compuestos nitrogenados ha desbalanceado el ciclo aumentando las cantidades fijadas en la biosfera, las consecuencias son observadas en los cuerpos de aguas, estos reciben las altas cargas, y afectan todo el ecosistema.

Las formas de nitrógeno pueden ser no reactivas (N_2), o reactivas (todos los otros compuestos posibles), las no reactivas debe ser transformadas a una forma reactiva para su circulación en la biosfera. Las formas de nitrógeno reactivas se transforman y aportan al funcionamiento de los seres vivos del ecosistema.

El ciclo del nitrógeno utiliza microorganismos en sus etapas de transformación, el paso de los compuestos orgánicos como las aminas, amidas y toda forma carbono nitrogenada a compuestos simples es realizado por diversos microorganismos aerobios y anaerobios, y los productos de estas transformaciones sirven como sustrato para otra serie de metabolismos realizados por otros microorganismos

Las bacterias tipo anammox toman el amonio y los nitritos, convirtiéndolos directamente a nitrógeno molecular en condiciones anaerobias, este metabolismo es diferente a los metabolismos conocidos hasta los años 90 de las bacterias oxidantes de amonio en el ciclo del nitrógeno, en la figura 1 se muestra el ciclo del nitrógeno.

Ciclo del Nitrógeno

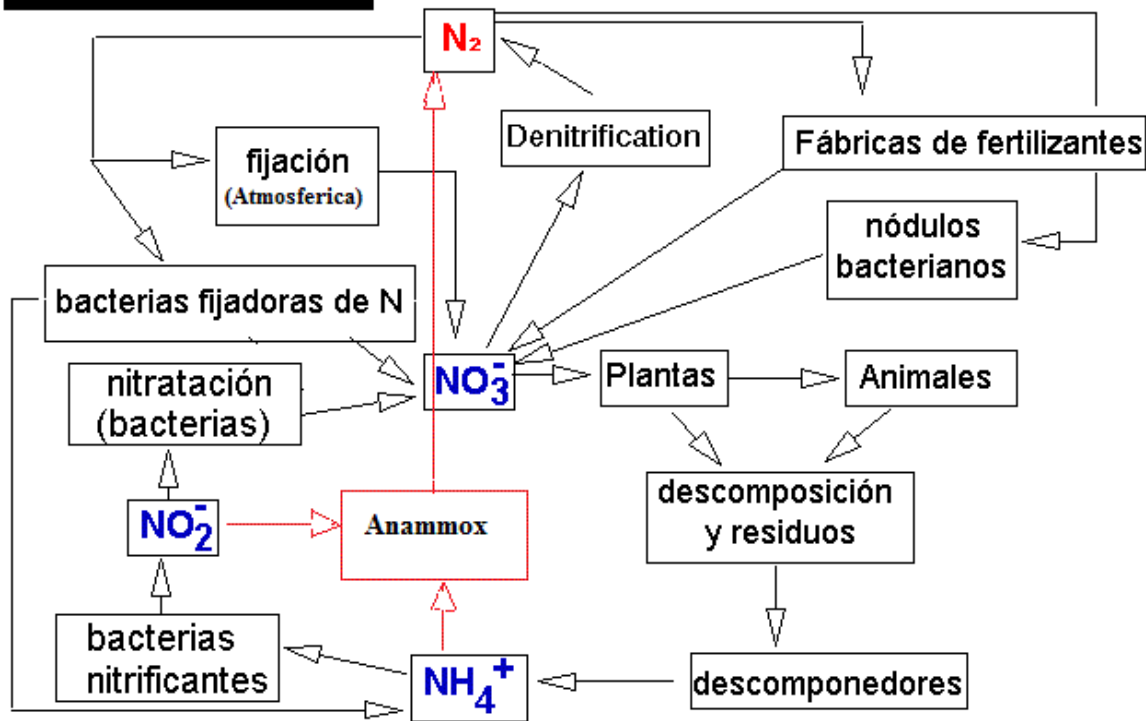


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. Tomada de (<http://www.marietta.edu/~biol/102/ecosystem.html>)

3.2.5 Procesos de transformación del nitrógeno

La transformación del nitrógeno en el ciclo global es realizada por las plantas, las industrias y los microorganismos. Los microorganismos realizan esta transformación en el momento de catalizar las reacciones químicas necesarias para la obtención de energía, generación de biomasa, estos procesos en la actividad bacteriana están clasificados en los siguientes procesos (Mandigan, 2004).

3.2.5.1 Fijación: el proceso de fijación del nitrógeno ocurre en el momento que el nitrógeno molecular es fijado en el medio en forma de otros compuestos al

combinarse con oxígeno o hidrógeno generando amonio y óxidos (N_xO) que se pueden incorporar a la biosfera como compuestos activos, este tipo de compuestos se genera a partir de reacciones abióticas y también biológicas.

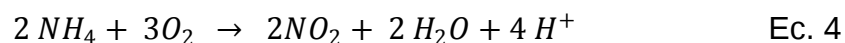
Las reacciones abióticas incluyen descargas eléctricas, fijación industrial y procesos de combustión en la atmosfera que luego pasan a la biosfera por medio de la lluvia, y las reacciones biológicas son generadas por la conversión del nitrógeno molecular a amonio (NH_4) por medio de la enzima nitrogenasa (Sprent y Sprent., 1990).

El crecimiento de las industrias dedicadas a la fijación de compuestos nitrogenados (proceso Haber-Bosch) ya sea para generar fertilizantes o cualquier otro tipo de producto nitrogenado está alterando el ciclo del nitrógeno, se están fijando cantidades mayores al 50% de las fijadas naturalmente. (Vitousek, 1997)

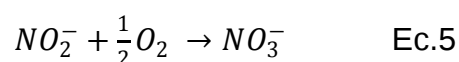
3.2.5.2 Asimilación: la asimilación del nitrógeno se da cuando los compuestos nitrogenados reactivos son absorbidos en el metabolismo por parte de microorganismos transformándolos en compuestos orgánicos nitrogenados (Rittmann, 2001).

3.2.5.3 Nitritación: La nitrificación es el proceso en el cual se oxida el amonio a nitritos, esto se da en presencia de oxígeno, es realizado por *Nitrosomonas*, *nitrospiras*, *nitrosolobus* entre otras.

Las bacterias nitrizantes son aerobias, y utilizando el oxígeno como aceptor de electrones transforman el amonio a nitritos por la reacción mostrada en la Ecuación 4, en la cual se observan todas las transformaciones dadas en la nitritación.



3.2.5.4 Nitratación: es el proceso de transformación del nitrito a nitratos. Los nitritos se oxidan por medio de microorganismos en ambientes aerobios, las bacterias del género nitrobacter entre otras, utilizan el oxígeno en su metabolismo realizando las transformaciones. La segunda parte de la transformación la realizan los microorganismos llamados nitrobacter y las nitrospiras entre otros, los cuales convierten el nitrito a nitrato utilizando oxígeno como lo muestra la Ecuación 5.



Para que el proceso de nitrificación se pueda efectuar son necesarias altas concentraciones de oxígeno 7 mg L⁻¹ (necesario un burbujeo constante de aire) (Eckenfelder, 1995).

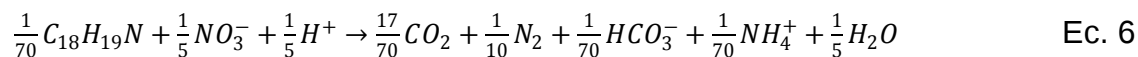
3.2.5.5 Reducción desasimilatoria del nitrato: es la transformación del nitrato por medio de la enzima nitrato reductasa en un primer paso, el proceso desasimilatorio transforma el nitrato a nitrito y posteriormente puede tomar distintas rutas dependiendo de los microorganismo involucrados, generando una denitrificación heterótrofa la cual tiene como producto final el N₂, N₂O y NO; o también una reducción desasimilatoria de nitrato la cual tiene como producto final amonio.

Los microorganismos que se encargan de este proceso son facultativos, quimioheterótrofos, y utilizan el nitrato o el nitrito como aceptor de electrones generando la energía necesaria para la oxidación de los compuestos orgánicos (Maier et al., 2000).

3.2.5.6 Denitrificación El proceso de denitrificación es anaerobio, la mayoría de las bacterias denitrificantes son heterótrofas, lo que significa que requieren una fuente de carbono externa como donador de electrones para poder realizar su metabolismo, esta fuente de carbono puede estar contenida en las aguas

residuales, pero no es suficiente, siendo necesario agregar una fuente de carbono orgánico al tratamiento.

La Ecuación 6 muestra la reacción descrita en el proceso de denitrificación.

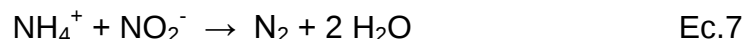


La nitrificación tiende a acidificar el medio, mientras que la denitrificación lo alcaliniza, la combinación de estas dos transformaciones es eficiente, pero demanda altos costos por la aireación requerida en la primera etapa, y por la fuente de carbono orgánico necesaria en la segunda (Vazques. 2005).

3.2.6 Bacterias anammox

Luego del descubrimiento de los microorganismos que desarrollan el proceso anammox, se han logrado identificar muchas características de su comportamiento y metabolismo.

Las bacterias anammox son microorganismos quimiolitotróficos que realizan la oxidación anaerobia del ion amonio como donador de electrones, convirtiéndolo directamente junto con el nitrito a nitrógeno gaseoso, la Ecuación 7 muestra la reacción producida (Kartal et al., 2007).



Los productos intermedios de esta reacción son la hidracina (N₂H₄) y la hidroxilamina (NH₂OH). El proceso inicia cuando el amonio y la hidroxilamina reaccionan para formar hidracina la cual es oxidada posteriormente a N₂, en esta oxidación se generan 4 electrones que son aprovechados para reducir el nitrito hasta hidroxilamina y pequeñas proporciones de nitrato. En la Figura 2 se muestra el ciclo de la reacción del proceso anammox.

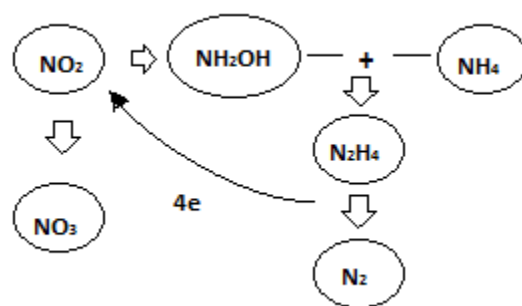


Figura 2. Esquema de la reacción de los anammox incluyendo las reacciones intermedias presentadas (Schalk et al .2000).

Este tipo de microorganismos tiene una baja tasa de crecimiento, necesitando hasta 11 días para su duplicación (Kuenen, 2008), esto es por la baja conversión de sustrato, el consumo de carbono de la bacteria esta en $0.07 \text{ mol C mol}^{-1} \text{ NH}_4$.

Algunos estudios han demostrado que la fijación de N_2 y pérdidas de nitrógeno en el océano están ligados a la presencia de nitritos, a altas profundidades la presencia de nitritos y amonio favorecen el proceso realizado por las bacterias anammox, también se conoce que pueden asimilar los nitratos, siempre y cuando tengan presente un formato o un acetato (Kartal et al., 2007).

Las bacterias anammox pertenecen al dominio de los Planctomycetes, del cual se han reportado ya distintos subgéneros (*C. Brocadia anammoxidans*, *C. Kuenenia stuttgartiensis*, *C. Scalindua sorokini* y *Scalindua brodae*, *C. Scalindua wagneri*, *C. Anammoxoglobus*)

Dependiendo del género de anammox que esté presente en el enriquecimiento, el sistema deberá tener ciertas condiciones de operación, en diversas investigaciones realizadas con los subgéneros *brocadia* y *kuenenia*, se encontraron ciertas diferencias notables como lo son sus actividades de $26.5 \text{ nmol N}_2/(\text{mg proteína min})$ a pH 8 y 37°C para *C. kuenenia* (Egli et al., 2001), y 55 nmol

N_2 /(mg proteína min) pH 8 y 40 °C para *C. brocadia* (Jetten et al., 1999). El género *kuenenia* tiene mayor resistencia a concentraciones de nitrito elevadas, se mantienen más activas en poblaciones con bajas concentraciones de células y no se inhibe fácilmente por la presencia de fosfatos.

En la Figura 3 se puede observar una imagen de una bacteria anammox, se distingue el anammoxisoma -que es un organelo interno donde se produce la reacción.

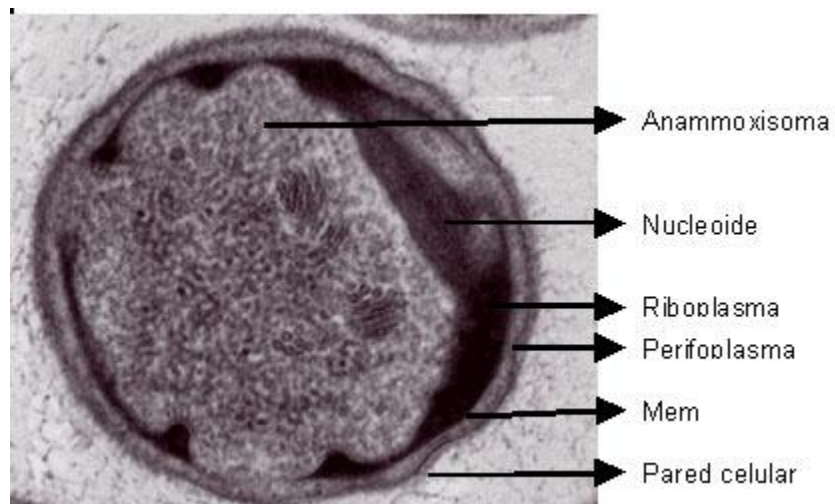


Figura 3. Imagen de un anammox (Kuenen et al., 2008)

3.2.7 Factores que inhiben el proceso anammox

Las bacterias tipo anammox, por su baja tasa de crecimiento y su naturaleza anaerobia presentan diversos factores que pueden afectar su proceso dentro de los cuales están:

Presencia de oxígeno: el oxígeno inhibe completamente el proceso, esta inhibición es reversible, de manera que si se recupera la anaerobiosis en el medio donde se encuentran los microorganismos se podrá reiniciar el proceso. Se debe mantener una concentración inferior a 0.2 mg L^{-1} de oxígeno en el medio para evitar problemas de inhibición. Investigaciones de Sliekers et al. (2003) mostraron que un proceso anammox puede soportar hasta una concentración limitada de oxígeno disuelto de 0.5 mg L^{-1} , esto sería aplicable para la nitrificación parcial, donde los microorganismos oxidantes de amonio aerobios pueden utilizar estas concentraciones de oxígeno para realizar su proceso, transformando el amonio a nitrito y consumiendo el oxígeno que afectaría a los anammox (procesos CANON y HOLAND).

pH : se ha definido un intervalo en el cual se mantiene la biomasa activa [6.7 – 8.3]; Strous et al (1999) afirma que el intervalo óptimo para el proceso es de [7.5- 8.0].

Si el medio basal que contiene el sustrato tiene un pH elevado (>8.0) el amonio se puede transformar en amoniaco y alterar las concentraciones al interior del reactor, además el amoniaco en altas concentraciones es nocivo para este tipo de microorganismos. La inhibición del sistema se presenta a pH inferiores a 6.2 hasta 5, donde se puede mantener una inhibición reversible, ya por fuera de este intervalo el sistema se inhibe irreversiblemente (Strous et al. 1999).

Dependiendo del subgénero de anammox que se esté enriqueciendo se puede trabajar en diferentes rangos de pH (Ahn et al., 2004).

Temperatura: entre los 20 y 40 °C la actividad anammox es dependiente de la temperatura y obedece a la ley de Arrhenius, se estimó una energía de activación de 70kJ mol^{-1} (Strous et al., 1999).

Se conoce que la actividad de los anammox es nula a temperaturas menores de 10 °C y mayores de 50°C (Strous et al., 1999). La máxima eficiencia se da en un intervalo de temperatura de 35 - 40 °C, entendiendo que el proceso puede darse en otro intervalo de temperaturas (20 °C o 18° C) pero implica demasiado tiempo de adaptación de los microorganismos a estas condiciones (Dosta et al., 2008), además que requieren grandes cantidades de biomasa para poder adaptarse correctamente, siendo así el intervalo de 30 a 40 °C lo recomendable para el buen funcionamiento del proceso.

Sustratos y productos de la reacción: El principal sustrato que inhibe el proceso anammox es el nitrito, esta inhibición puede ocurrir si se tiene una concentración mayor a 5mM, este valor puede variar dependiendo del subgénero que se tenga de los microorganismos pero en sí, dejar acumular una concentración por encima de 5mM de nitrato en el sistema ya está arriesgando el enriquecimiento. La inhibición dada por el nitrito es irreversible (Strous et al., 1999), Se recomienda en casos de inhibición por nitrito la adición de hidracina y hidroxilamina para tratar de ayudar el proceso metabólico, teniendo también precaución con las cantidades de hidroxilamina agregadas ya que esta es toxica y puede terminar de inhibir el sistema. Las concentraciones de amonio cercanas a 40 mM pueden inhibir el proceso (Dapena-Mora, 2007).

Estrés por Agitación: La agitación puede afectar el rendimiento de los microorganismos, se ha comprobado que el estrés por una agitación alta puede reducir la actividad de los anammox, velocidades de agitación superiores a 150 rpm pueden estresar la biomasa y también romper los *flocs* (Arroyo et al., 2006); siempre se debe mantener una agitación suficiente para suspender totalmente la biomasa, si esta se queda inmóvil no se generarán consumos.

4. METODOLOGIA

4.1 Construcción del reactor SBR

Con base en la literatura respecto al diseño, funcionamiento, condiciones de operación y ventajas para poder evaluar el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes concentraciones de sustrato se decidió construir un reactor SBR.

El reactor se construyó en acrílico considerando su transparencia, menor fragilidad que el vidrio y bajo costo. Así como también sus ventajas en cuanto a reducción de las posibilidades de presencia de contaminantes.

El reactor debe ser anaerobio, y tener agitación, en el Anexo (1) se pueden observar los planos realizados del cuerpo del equipo en su diseño previo.

Las dimensiones del reactor son las siguientes:

Volumen total = 5.7 L

Volumen mínimo de operación = 3 L

Volumen de la chaqueta = 3,4 L

Altura = 25cm

Diámetro interno = 18cm

Diámetro externo = 24cm

El reactor está formado por dos partes, un tanque el cual tiene dos cilindros concéntricos, el tanque de menor volumen es el de almacenamiento de los

inóculos y el cilindro exterior es la chaqueta por la cual circula el agua caliente para mantener la temperatura de operación. La segunda parte del reactor es la tapa superior, esta tapa cuenta con 10 aberturas en las cuales se pueden adaptar las sondas de medición, conexiones de carga y descarga de sustratos, soluciones niveladoras de pH, gases de burbujeo, sectores para toma de muestras y una entrada para el sistema de agitación. En la Figura 4 se muestra el esquema del reactor construido.

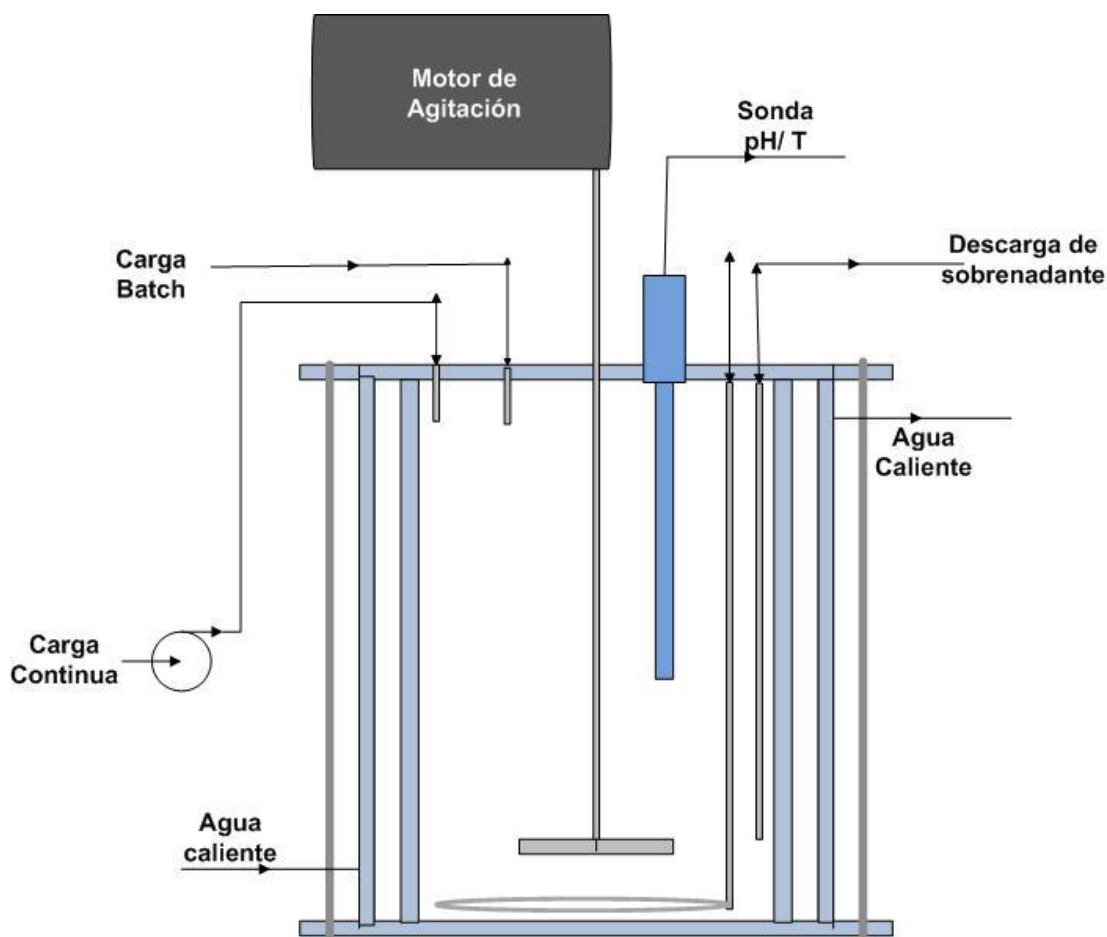


Figura 4. Esquema del reactor SBR anammox construido.

Para ajustar el tanque y la tapa del reactor se utilizaron 8 varillas de acero inoxidable de 1/8 pulg. Las varillas están distribuidas alrededor del reactor, estas se ajustan con tuercas de seguridad y dan un selle preciso el reactor.

Las entradas y salidas al reactor así como las sondas son:

Sonda de pH: Sonda de medición de pH Endress + Hauser. Tophic CPS471, esta sonda permite adicional a la medición de pH, la medición de temperatura mediante un sistema integrado de medición.

Entrada de gases: para el burbujeo de los gases se tiene un aro de acero inoxidable en el fondo del reactor el cual tiene aberturas a lo largo de su circunferencia las cuales dosifican el gas alimentado al reactor de manera homogénea.

Sistemas de carga y descarga de sustratos del medio: cada abertura en la tapa del reactor está sellada con corchos de caucho; en el Anexo 1b se puede observar la tapa del reactor. Las entradas y salidas de sustratos se realizan por tubos de acero inoxidable que atraviesan estos corchos.

Se cuenta con dos entradas, una para realizar una carga de sustrato intermitente y otra para realizar una carga de sustrato continua. La descarga de sobrenadante del reactor se realiza por medio de un tubo de acero inoxidable al cual se le puede graduar la profundidad de succión, permitiendo así fijar un volumen de descarga diario sin correr riesgos de sobrepasar el nivel asignado, puede graduarse desde un volumen mínimo de 1 litro hasta 4 litros.

Salida de gases: uno de los tapones en la tapa cuenta con una conexión a una manguera la cual descarga a una botella vacía, denominada buffer de gases, todos los gases producidos por el sistema y el gas burbujeado son descargados por esta salida.

Sistema de agitación: se adaptó un motor DC 110 V, con dos ejes que generan velocidades diferentes, el eje mayor genera 2600 rpm y el eje menor genera 56 rpm. Estas velocidades pueden ser graduadas utilizando un potenciómetro para regular la corriente que se le suministra al motor, permitiendo velocidades mínimas de 40 rpm graduables hasta 200 rpm utilizando el eje opcional del motor.

El eje agitador se construyó teniendo en cuenta las heurísticas mencionadas en (Geankoplis, 1998) teniendo en cuenta las medidas de diámetro y altura del reactor.

- Los propulsores de paletas deben tener un tamaño equivalente al 60-80% del diámetro del reactor.
- el ancho del aspa es de 1/6 a 1/10 de la longitud de la misma.
- La velocidad de operación es baja, < 100 rpm, no requiere la instalación de deflectores en el tanque.

La necesidad de mantener la biomasa suspendida en el reactor conlleva a utilizar paletas inclinadas para la agitación. El reactor tiene un sistema de 4 paletas de agitación inclinadas, su inclinación permite que al momento de iniciar la agitación, la corriente fluya hacia el fondo del reactor arrastrando todos los sólidos sedimentados del sistema suspendiéndolos uniformemente en el reactor, el agitador esta hecho de acero inoxidable. La velocidad de agitación fue de 56 rpm, el tamaño de las paletas de 5.5 cm, el diámetro del agitador de 11 cm, y el espesor de las paletas de 0.1 cm.

4.2 Pruebas de operación del reactor SBR anammox

Al reactor a escala de laboratorio se le realizaron diferentes pruebas (fugas, entrada de oxígeno, temperatura) para verificar que el inicio de la operación no afectaría la comunidad de microorganismos ya enriquecida durante 6 meses.

4.2.1 Revisión de funcionamiento del reactor

Se realizó una revisión completa de todos los puntos de unión del acrílico en el reactor para asegurar que el sistema no presentara fugas.

El ajuste realizado por las 8 varillas de acero inoxidable no generó un sello total entre la tapa y el tanque, por esta razón se realizaron 2 empaques de silicona y se colocaron en los dos cilindros concéntricos entre la tapa y el tanque (tanque interno y tanque externo), estos empaques aislaron completamente el tanque de la chaqueta de calentamiento, y al mismo tiempo la chaqueta de calentamiento de la atmósfera externa.

La abertura por la cual ingresa el eje de agitación al reactor tiene 2 mm de diámetro mayor al diámetro del eje, esto permite la entrada y salida de gases del reactor y afectaba la anaerobiosis, para corregir esto se ubicó un empaque de caucho en la tapa del reactor.

4.2.2 Funcionamiento hidráulico de la chaqueta de calefacción

El flujo a través de la chaqueta, se diseñó de acuerdo a un ajuste de deflectores de flujo intercalados, de manera que el agua recorriera toda la superficie externa del reactor, se incluyeron 8 deflectores en la chaqueta, ubicados intercaladamente uno adherido a la tapa superior, y el siguiente a la base, como se puede observar en la Figura 5.

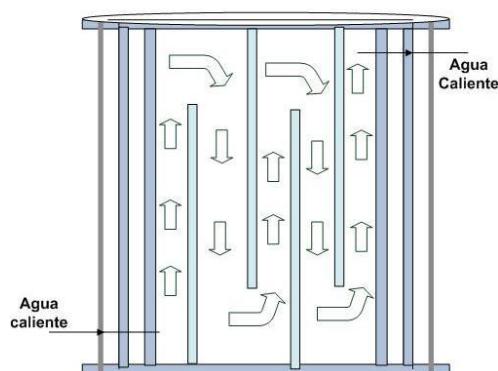


Figura 5. Esquema de distribución del flujo en la chaqueta de calentamiento.

4.3 Cambios en las condiciones de operación del reactor SBR.

A partir del montaje en el reactor SBR, se realizaron pruebas adicionales para determinar el comportamiento de los inóculos a diferentes condiciones de operación.

4.3.1 Operación de carga continua de sustratos al reactor SBR

Dado que en el proceso de cargas puntuales (lotes) se aumenta la concentración del sustrato agregado bruscamente, y para evitar la posible inhibición del sistema por altas concentraciones de nitrito, se ajusta una alimentación continua de sustrato al reactor.

El sistema final se cargó con 2 litros de medio y sustrato a las concentraciones determinadas por las remociones actuales, durante 23 horas; luego de este tiempo se apagó la agitación, se sedimentó la biomasa y se descargaron 2 litros de sobrenadante, diariamente se tomó una muestra de 2 mL de sobrenadante para realizar un análisis de las concentraciones de nitritos y amonio.

Diariamente luego de la descarga y recarga ya sea en operación por lotes o en alimentación en continuo se burbujeaba el reactor con Ar/CO₂ durante 5 minutos para recuperar la anaerobiosis del sistema, el gas se burbujeó para generar un desplazamiento de gases, el aire que se encuentra en el interior del reactor se desplazó hacia afuera al llenar el reactor con Ar/CO₂.

Se observó que se generaron mejores resultados por un burbujeo con mezcla de gases que contenían CO₂ que un burbujeo con nitrógeno puro, el CO₂ ayuda a la regulación del pH (ver Ecuación. 8).



Posterior a las correcciones realizadas en los parámetros de operación en el reactor, se fijó la temperatura del sistema de calentamiento en 33°C, la agitación se estableció en 56 rpm, velocidad de agitación a la cual se observó que los sólidos se suspenden totalmente en el medio y que no se generan turbulencia en el líquido.

4.3.2 Burbujeo continuo (Ar/CO₂).

Para evitar los problemas de altas cantidades de oxígeno disuelto (OD) en el medio basal y en el reactor se realizó un montaje de burbujeo en continuo de la mezcla de gas patrón Ar/CO₂, manejando flujos de 10 cc min⁻¹ al reactor y 5 cc min⁻¹ al contenedor del medio basal cargado, realizando mediciones durante la operación y la descarga del sistema se registró que el reactor mantiene concentraciones de 0.15 mg L⁻¹ de O₂, esto limita las poblaciones aerobias.

4.4 Funcionamiento del reactor SBR

El reactor puede funcionar aerobio o anaerobio, todo dependiendo del proceso requerido. Y se puede ajustar a un funcionamiento como sistema por lotes o sistema de reacción de flujo continuo y descarga puntual.

Cuenta con un sistema de descarga graduable el cual permite definir un nivel estándar de volumen que se mantiene en el reactor, se puede burbujear gas inerte o aire por un sistema que tiene en el fondo por el cual se dosifican los gases de manera que todo el volumen recibe una carga uniforme de gas burbujeadado.

El sistema de calentamiento es estable, se puede trabajar desde la temperatura ambiente hasta 60° C, este intervalo de temperatura es el indicado para trabajar procesos biológicos, dando amplias aplicaciones al reactor.

4.5 Enriquecimiento de microorganismos anammox

La primera etapa experimental correspondió al enriquecimiento de dos inóculos que cumplieran con las condiciones de sistema anaerobio y carga continua de compuestos nitrogenados, condiciones que posibilitaron la existencia de bacterias anammox, el proceso de enriquecimiento se monitoreó constantemente cambiando las condiciones del tratamiento durante el proceso.

El primer inóculo fue tomado de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del barrio El Caney, de la ciudad de Cali- Valle del Cauca, la cual maneja concentraciones de amonio por la carga orgánica nitrogenada y el amonio ya presente en los afluentes.

El segundo inóculo provenía de una laguna de sedimentación del Ingenio Castilla, ubicado en el municipio de Pradera- Valle del Cauca. Esta laguna de sedimentación es parte de un proceso de tratamiento de aguas residuales del lavado de caña, estas aguas residuales contienen los restos de los fertilizantes utilizados en los cultivos de caña lo que las hace ricas en compuestos nitrogenados.

Los dos inóculos se sembraron bajo las mismas condiciones iniciales las cuales serán descritas a continuación, la única diferencia fue la concentración inicial de sustratos utilizada.

Montaje de reactores por lotes para el enriquecimiento de anammox.

Los reactores por lotes fueron erlenmeyers de 1000mL, a continuación se describe el montaje el cual fue realizado teniendo en cuenta el protocolo de Luesken et al., (2011).

- Se midieron 80 mL de cada uno de los lodos a sembrar (en el montaje de estos reactores el lodo no se filtró ni se lavó antes de ser medido).
- Se prepararon 500 mL de medio basal con los componentes y en las cantidades que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio basal preparado (van de Graaf, 1996).

Compuesto	Cantidad
KHCO ₃	0.5 g L ⁻¹
MgSO ₄ · 7H ₂ O	300g L ⁻¹
CaCl ₂ · 2H ₂ O	180g L ⁻¹
KHPO ₄	0.02 g L ⁻¹
*Elements trace I	1 mL L ⁻¹
**Elements trace II	1mL L ⁻¹

*Elements trace I: 5 g de EDTA, 5g FeSO₄

**Elements trace II: 15g de EDTA, 0.43g ZnSO₄ · 7H₂O, 0.24g CoCl₂ · 6H₂O, 0.99g MnCl₂ · 4H₂O, 0.25g CuSO₄ · 5H₂O, 0.22g NaMoO₄ · 2H₂O, 0.19g NiCl₂ · 6H₂O, 0.21g NaSeO₄ · 10H₂O, 0.02g H₃BO₄

- Se mezclaron 500 mL de medio basal y 80 mL de lodo dentro del reactor (erlenmeyer de 1000mL).
- Se ajustó un tapón con 2 perforaciones y 2 tubos de vidrio sobre la parte superior del reactor para permitir la carga, burbujeo de gases y descarga de medio a los reactores
- Se selló el tapón utilizando parafilm, se mezcló el lodo en el medio y se agregaron 200 mL de una solución 0.5 mM de NH₄⁺ y NO₂⁻ respectivamente.
- La carga de KHCO₃ en el medio basal es la fuente de carbono disponible para los anammox, esta siempre se agregó en exceso.

- Se fijó como volumen mínimo 580 mL y como volumen máximo 780 mL, las descargas y cargas que se realizaron diariamente se encontraban dentro de este intervalo.
- Se burbujeó una mezcla Ar/CO₂ dentro del reactor durante 15 minutos. Esta mezcla desplazó el oxígeno contenido en el reactor. Posteriormente se selló una de las 2 salidas y en la otra se ubicó una jeringa. El émbolo de la jeringa se desplazaba al aumentar la presión de los gases en el interior del reactor.
- Los reactores se colocaron en una incubadora a 35 °C sobre un checker (Agitador mecánico) y se agitó continuamente.
- Se tomaron muestras de los reactores para determinar las concentraciones de NH₄⁺ y de NO₂⁻ iniciales.

Luego de 24 horas de haber iniciado el enriquecimiento el reactor se sedimentó hasta que se observó que los sólidos suspendidos eran mínimos (15 minutos) y se descargaron 200 mL de sobrenadante, al volumen descargado se le midió el pH y se tomaron 2 mL de muestra para medir el amonio y el nitrito en el efluente. El resto de la descarga del reactor se depositó en una botella de descarga en la cual se guardó el sobrenadante desechado durante toda la etapa de enriquecimiento y operación del reactor, allí se conservó la biomasa que se perdió por no tener una sedimentación total y también parte de los sólidos no deseados en el reactor.

Luego de la descarga se alimentaron 200 mL de sustrato al reactor, y se burbujeó con una mezcla de Ar/CO₂ para mantener la anaerobiosis, en el Anexo 2a se observa uno de los erlenmeyers en el enriquecimiento.

El enriquecimiento de los anammox se realizó como se menciona anteriormente durante 3 meses agregándoles una solución que solo contenía las concentraciones definidas de NO₂ y NH₄. Posterior a esto, se agregaron los nutrientes del medio basal al sustrato y así se continuó el proceso. Las concentraciones de los sustratos en el medio basal se duplicaban cada que los

consumos de nitrito en el reactor fueran 70% de la carga suministrada el día anterior.

De no presentarse un consumo de los sustratos cargados luego de 24 horas, se dejaba el mismo medio hasta que se registrara un cambio en las concentraciones. El pH de los reactores se mantuvo siempre en un intervalo entre 7,2 - 8,0; si el sistema se encontraba con un pH por debajo de este intervalo se regulaba con la adición de Na_2CO_3 , si el pH tenía un valor por encima del intervalo, se burbujeaba con N_2/CO_2 durante un tiempo mayor lo cual ayuda a acidificar el medio dentro del reactor.

4.6 Método de medición de concentraciones de sustratos en el reactor

Los tres compuestos nitrogenados involucrados en el proceso pueden ser medidos por medio de la colorimetría siguiendo protocolos que se presentan a continuación.

4.6.1 Medición del Nitrito.

La determinación de la concentración de nitrito se realizó de acuerdo al procedimiento planteado en Anexo 3a, para la medición colorimétrica se montó una curva de 5 puntos, este método funciona en un intervalo de 0,1 a 1 mM de concentración de NO_2^- (Luesken et al. 2011).

Las soluciones base utilizadas para medir estas concentraciones se prepararon con NaNO_2 , las muestras toman un color rosado el cual se torna más oscuro si la concentración de nitrito es mayor, se deben agregar los dos reactivos que menciona el anexo a la muestra a medir, luego esperar 10 minutos para que

ocurra la reacción y medir la absorbancia con una longitud de onda de 540nm en el espectrofotómetro.

4.6.2 Medición del Amonio.

Se utilizó el método del fenol para la medición del amonio ver el Anexo 3b, el intervalo para las mediciones de las muestras de amonio es bajo, de 10 μM a 200 μM , las soluciones se tiñen de un color azul, dependiendo de la cantidad de amonio en la muestra, más oscuro será el azul que de la reacción. El protocolo indica que se deben leer las absorbancias a una longitud de onda de 623nm luego de 30 minutos de agregar los reactivos (Luesken et al. 2011).

4.6.3 Medición del Nitrato.

Para la medición de nitratos se siguió el protocolo dado por Standard Methods (Anexo 3c), se utiliza HCl como reactivo, este se agrega a la muestra a medir y luego se lee su absorbancia en un espectrofotómetro que maneje rangos UV, a una longitud de onda de 220nm y 275nm, maneja un rango de 1 a 10 mg L^{-1} de N, y cuenta con un método para corregir los datos por interferencia de materia orgánica.

4.6.4 Identificación de los microorganismos presentes en el sistema

El porcentaje de enriquecimiento de las bacterias en el sistema se realizó por determinación visual mediante la técnica FISH (Fluorescent In Situ Hibridation). Esta técnica de hibridación in situ permite la identificación de bacterias en cultivos puros y mixtos por medio de epifluorecencia, microbiología confocal, microscopía de laser o citometría de flujo.

Las muestras para el análisis FISH se tomaron en el día 80 de operación del reactor SBR, se lavó en paraformaldehído y se hibridizó según el procedimiento descrito en el Anexo 4.

Las siguientes son las sondas utilizadas para la determinación de los microorganismos:

para las bacterias nitrificantes se utilizó un nitrimix compuesto por las siguientes sondas en una mezcla equimolar.

nitA CY3 *nitritizantes nitrosomonas* CCTAAGTGGGGAATAACGCATCG, nitB CY3 *nitritizantes* TTACGTGTGAAGCCCTACCCA y Nspa CY3 *nitritizantes nitrospira* GGAATTCCGCGCTCCTCT.

Para los anammox se utilizó la sonda AMX820 CY3 *kuenenia y brocadia* AAAACCCCTCTACTTAGTGCCC.

Todas las muestras fueron teñidas con DAPI el cual se muestra en color azul, y analizadas en CY3, en color rojo. Las muestras fueron analizadas en el microscopio *nikon* de epifluorecencia del laboratorio de microbiología ambiental de la facultad de Ingeniería Sanitaria Universidad del Valle.

4.6.5 Determinación de rendimientos de remoción de sustratos

Se calculó teniendo la relación de las mmoles de sustrato cargadas al reactor con las mmoles en el efluente diario.

$$Y = \text{mmoles A} - \text{mmoles c} / \text{mmoles B}$$

Y= rendimiento (%)

A= Sustrato cargado (mmol d⁻¹)

B= Sustrato presente en la descarga del reactor (mmol d⁻¹)

C= Sustrato remanente del reactor (mmol d⁻¹)

5. ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 Etapa inicial de enriquecimiento de las bacterias anammox

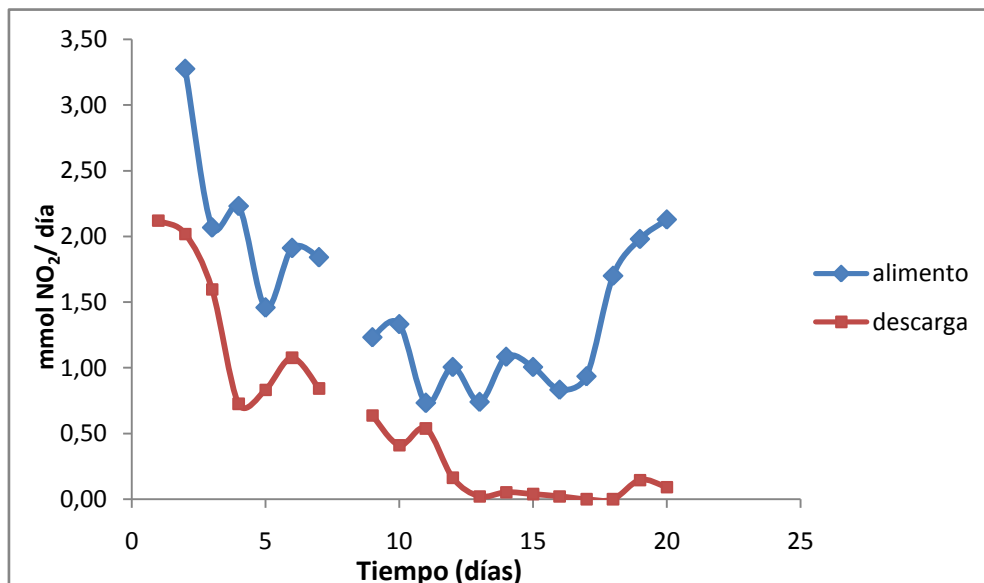
Luego de 6 meses desde el inicio del enriquecimiento se realizó un seguimiento riguroso al consumo de nitrito y amonio en los reactores por lotes para comprobar la estabilidad de los consumos permitiendo transferir las bacterias al reactor SBR e iniciar el proceso en el reactor diseñado. Durante 20 días continuos se tomaron dos muestras de los reactores, una muestra era de la descarga del sobrenadante del día anterior, y la siguiente era luego de cargar el nuevo medio con sustrato al reactor. Estas muestras se caracterizaban por colorimetría para determinar las concentraciones inicial y final de nitrito y amonio.

Las Gráficas 1 y 2 presentan la cantidad en mmoles d^{-1} de nitrito y de amonio durante los 20 días de muestreo. Se puede observar que el consumo de nitrito aumenta a partir del día 14, y de igual manera el consumo de amonio se estabiliza, esto puede estar representado por fallas en la anaerobiosis del sistema.

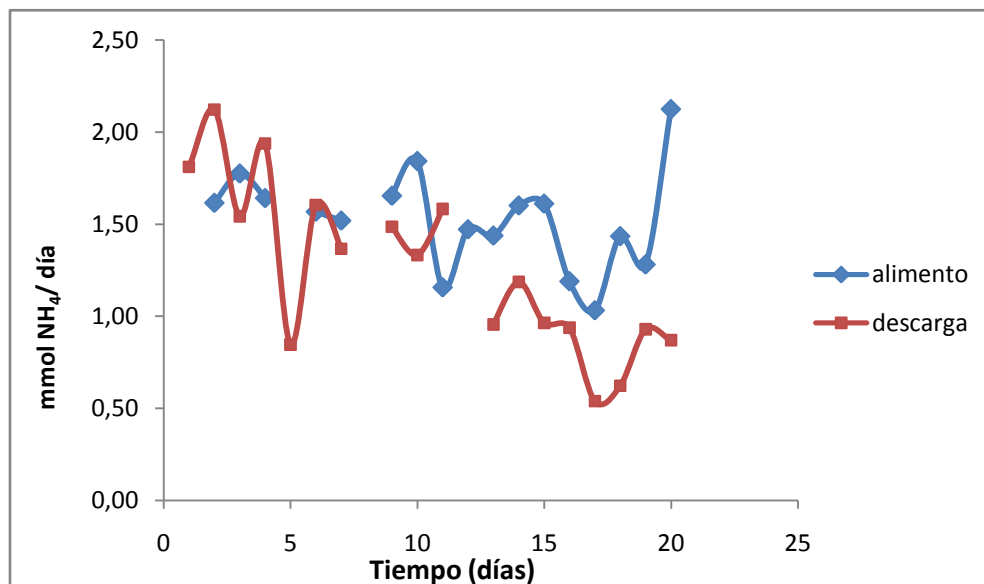
Luego de 6 meses de enriquecimiento durante los cuales se monitorearon los reactores, las comunidades aerobias están inhibidas en parte dado que se mantuvo un sistema anaerobio y esto limita la existencia y crecimiento de comunidades microbianas, los consumos significativos del reactor serán representados por los anammox.

Durante el proceso de carga y descarga diario se presentaron fallas en la anaerobiosis del sistema, el sistema presentara una inhibición la cual puede ser observada en la gráfica 2, donde se ve una variación constante en las cantidades de sustrato en el reactor.

Gráfica 1. $\text{mmol NO}_2^-/\text{día}$ de nitrato en la carga y descarga del reactor en función del tiempo de enriquecimiento.



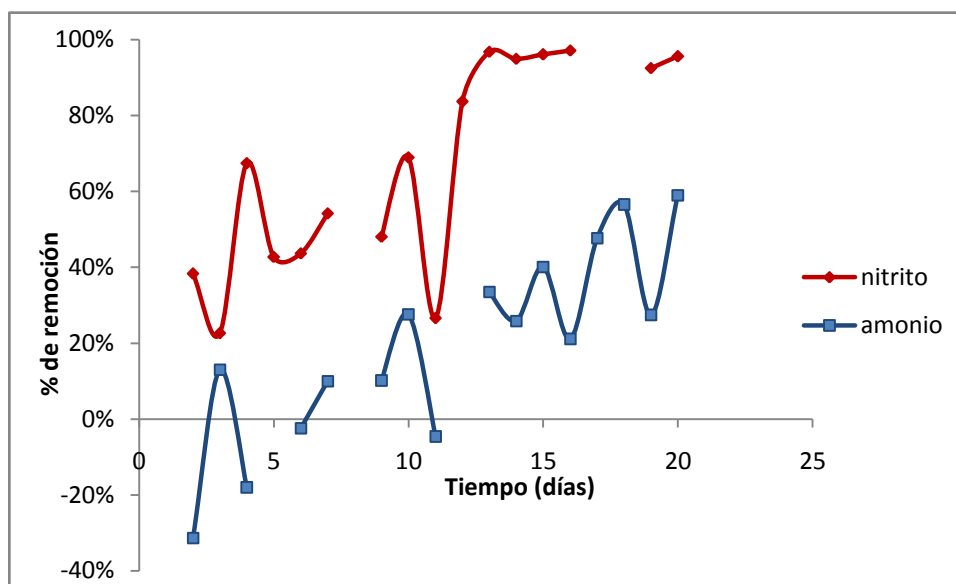
Gráfica 2. $\text{mmol NH}_4^+/\text{día}$ de amonio en la carga y descarga del reactor en función del tiempo de enriquecimiento.



En la Gráfica 3 se puede observar el rendimiento de remoción de amonio y nitrito durante los 20 días continuos evaluados.

La Gráfica 3 muestra una tendencia a un aumento en las remociones del nitrito, mientras que las remociones de amonio fueron inestables durante los primeros días, es importante considerar que las condiciones en los reactores no se mantuvieron totalmente anaerobias, durante la carga y descarga diaria entró oxígeno al reactor, esto retrasó el metabolismo de los anammox y al mismo tiempo favorecía el crecimiento de las bacterias oxidantes aerobias de amonio. La falla en la anaerobiosis genera esos rendimientos negativos por la acumulación de sustratos en el reactor.

Gráfica 3. Remociones de amonio y nitrito en los reactores por lotes en función del tiempo.



Luego de seis meses y medio de enriquecimiento las condiciones de operación de los reactores se modificaron como se establece a continuación:

Al reactor 1 se cargaban 300 mL d⁻¹ de medio basal con una concentración de 15 mM de amonio y nitrito equivalentes. Mientras que al reactor 2 se le cargaban 300 mL d⁻¹ de medio basal con una concentración de 30 mM de amonio y nitrito equivalentes.

El inóculo del reactor 2 presenta consumos constantes y cada vez que se registraba un consumo del 70% del reactivo límite (NO₂⁻) alimentado, se duplicaba la concentración de los sustratos en el medio (nitrito y amonio).

Dado que en los dos reactores se observó consumo de nitrito y amonio, en cantidades considerables y en proporciones cercanas a la estequiometria anammox, se decidió mezclar la biomasa de los dos reactores enriquecidos para inocular el reactor SBR.

5.2 Adaptación del inóculo enriquecido en el reactor SBR

Para el cambio desde los reactores por lotes al reactor SBR se purgaron los sistemas durante 30 minutos con gas (Ar/CO₂). La tapa del reactor SBR se ajustó rápidamente al momento de agregar los inóculos manteniendo el flujo de nitrógeno hacia la fase gaseosa interna del reactor. Las condiciones de operación en esta etapa del proceso fueron las siguientes: velocidad de agitación: 56 rpm, volumen mínimo: 2 litros, volumen cargado diario: 2 litros, volumen total de operación: 4 litros.

El volumen de la biomasa agregada era de 1 litro. Se completo el nivel mínimo con 2 litros de medio basal sin sustrato previamente burbujeado durante 40 minutos con nitrógeno.

El sistema se puso bajo agitación durante 24 horas para que los microorganismos se ajustaran al nuevo entorno. Pasadas las 24 horas se inició una carga por lotes

en el reactor, agregando 2 litros de medio basal con una concentración de 0.5 mM de nitrito y amonio respectivamente, la chaqueta de calentamiento mantenía una temperatura al interior del reactor de 36 °C y el pH se mantuvo en un intervalo de 7,1-7,3.

El diseño terminado con todos los ajustes realizados se puede observar en la siguiente figura.

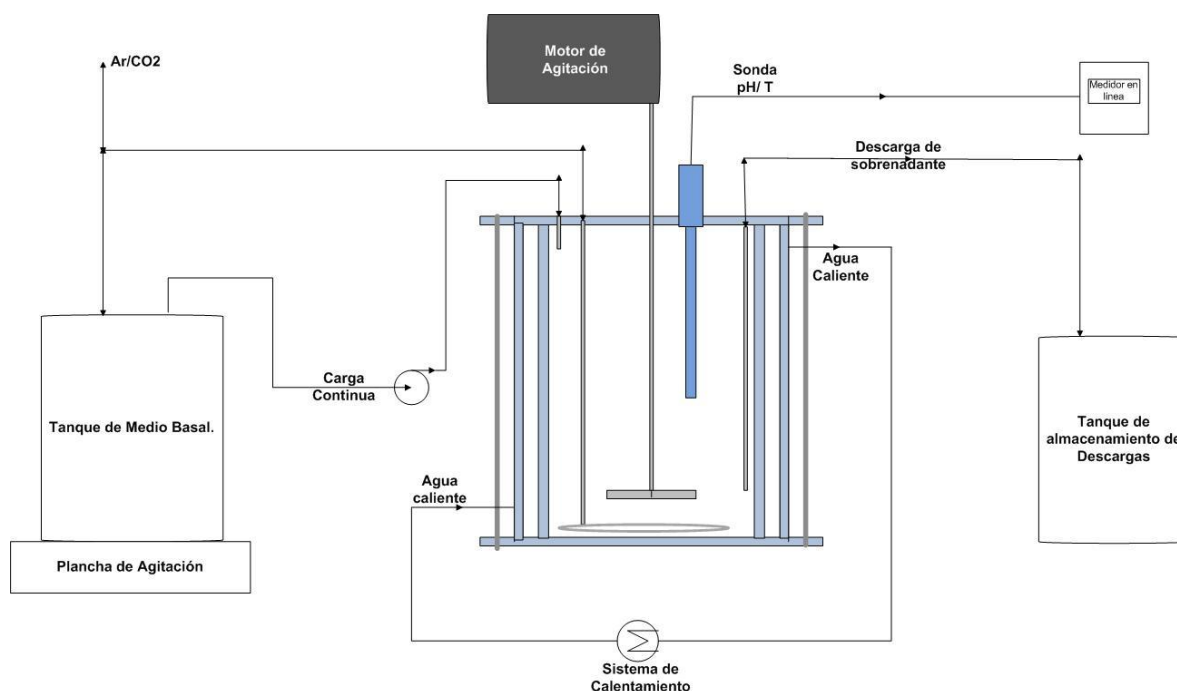
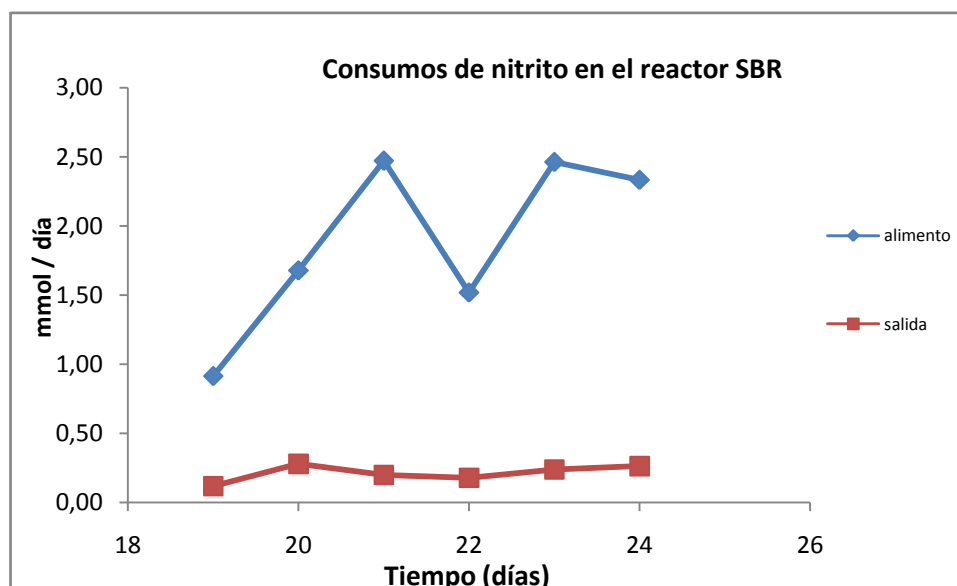


Figura 6. Esquema final del Reactor SBR anammox.

De la misma manera que se realizaba en los reactores por lotes de los erlenmeyers, se tomaron 2 muestras diarias para monitorear las concentraciones de amonio y nitrito en el reactor. Luego de 10 días de operación en el nuevo sistema, no se registraron consumos significativos dado que el inoculo se estaba adaptando al nuevo sistema, a partir del día 17 se observó que había consumo de nitrito en el reactor. En la Gráfica 4 se representan los consumos en los días 18 a 24.

Gráfica 4. Consumos de NO_2^- durante el cambio al reactor SBR (inicio de operación).



El consumo de nitrito está estabilizado en el reactor, se está transformando el nitrito en nitrato (anammox), además las bacterias oxidantes de amonio están consumiendo parte del amonio presente en el medio.

5.3 Consumos de nitrito y amonio en el reactor SBR en la etapa final de experimentación

Luego de 3 meses de operación del enriquecimiento de anammox, se analizaron datos continuos de los consumos de amonio y nitrito, en esta etapa el sistema presentaba altas remociones de esos sustratos. La biomasa presentó cambio de color, tornándose rojiza-marrón (Anexo 2b), lo cual indica la presencia de anammox, y también explica porque los consumos están en 240 mmoles d^{-1} de nitrito y 171 mmoles d^{-1} de amonio.

Consumos de NO_2 y NH_4 diarios

Se cuenta con una muestra del efluente, y también con las concentraciones y cantidades alimentadas, por medio de estos datos se pudo realizar el balance de materia determinando el consumo de los sustratos en el sistema, los cuales no se pueden relacionar directamente con los anammox ya que estos no son la única población oxidante de amonio existente en el reactor pero por las condiciones registradas de anaerobiosis se puede decir que la interferencia por otro tipo de microorganismos no será demasiado significativa.

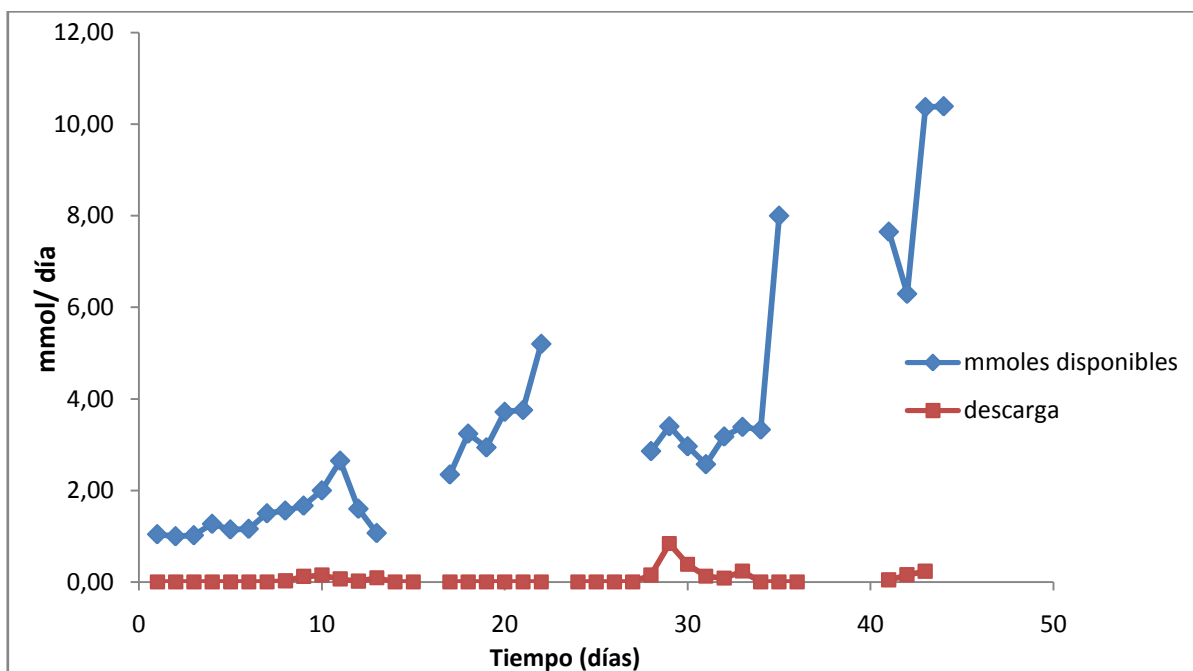
Para determinar las variaciones en las concentraciones y cantidades de medio alimentadas, se utilizaron tiras determinantes de nitrito las cuales miden la concentración de nitrito, permitiendo tomar decisiones inmediatas respecto a las condiciones de operación del sistema.

En las Gráficas 5-8 se presentan los consumos de amonio y nitrito del reactor SBR durante los últimos 80 días de operación.

Al inicio de estas mediciones, el reactor estaba siendo cargado con 1 mmol d^{-1} de nitrito y de amonio, y los consumos eran, prácticamente, totales. El nitrito es el reactivo límite del sistema, por esta razón, cuando se presentaba ausencia de nitrito o cero acumulaciones, se aumentaba la carga de nitrito al sistema aumentando la velocidad de la bomba peristáltica que se encarga de la carga continua de sustrato al reactor.

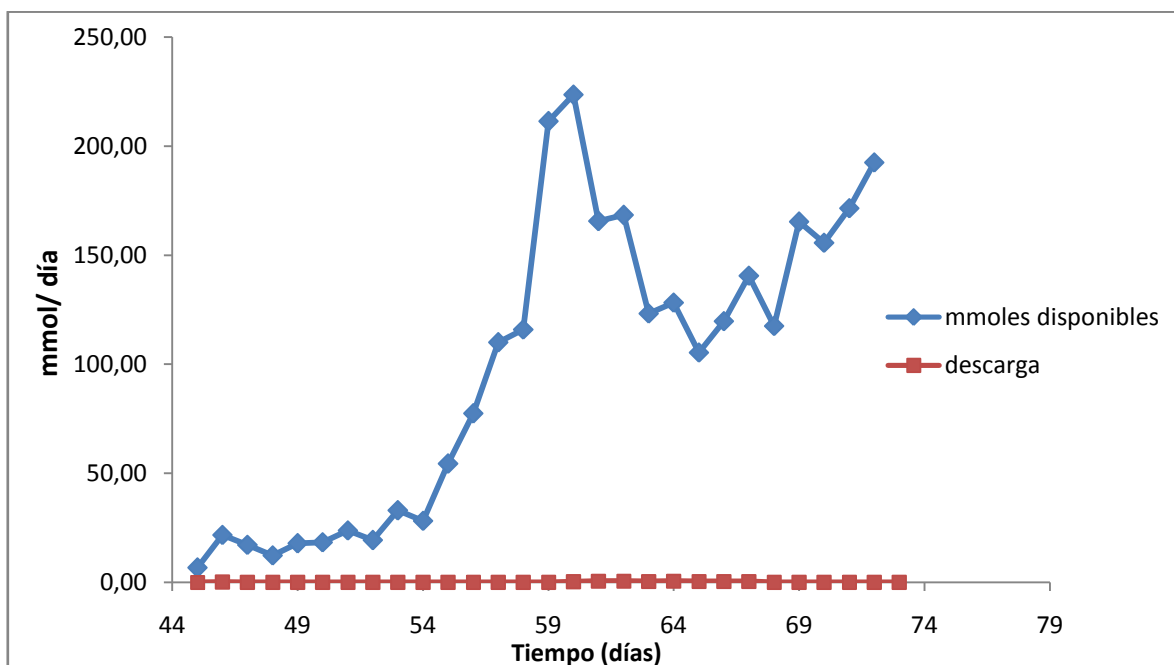
En la Gráfica 5 y 7 se observa una disminución de la cantidad de nitrito y amonio respectivamente, cargados al sistema en los días 27-36, esto fue causado por una evaluación realizada al comportamiento del reactor sin el burbujeo continuo de gas, la anaerobiosis disminuyó afectando el metabolismo de los anammox.

Gráfica 5. Consumo de nitrato en función del tiempo reactor SBR

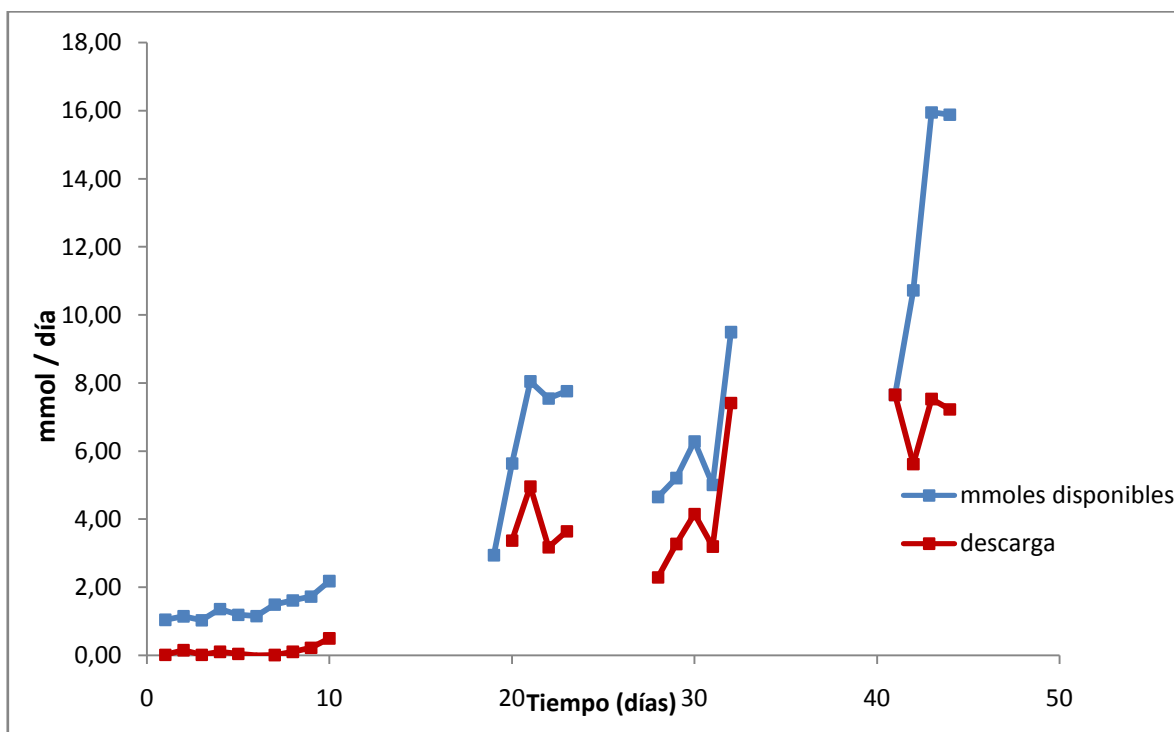


*Día 1 = 5 Abril 2011 = 271 días de enriquecimiento

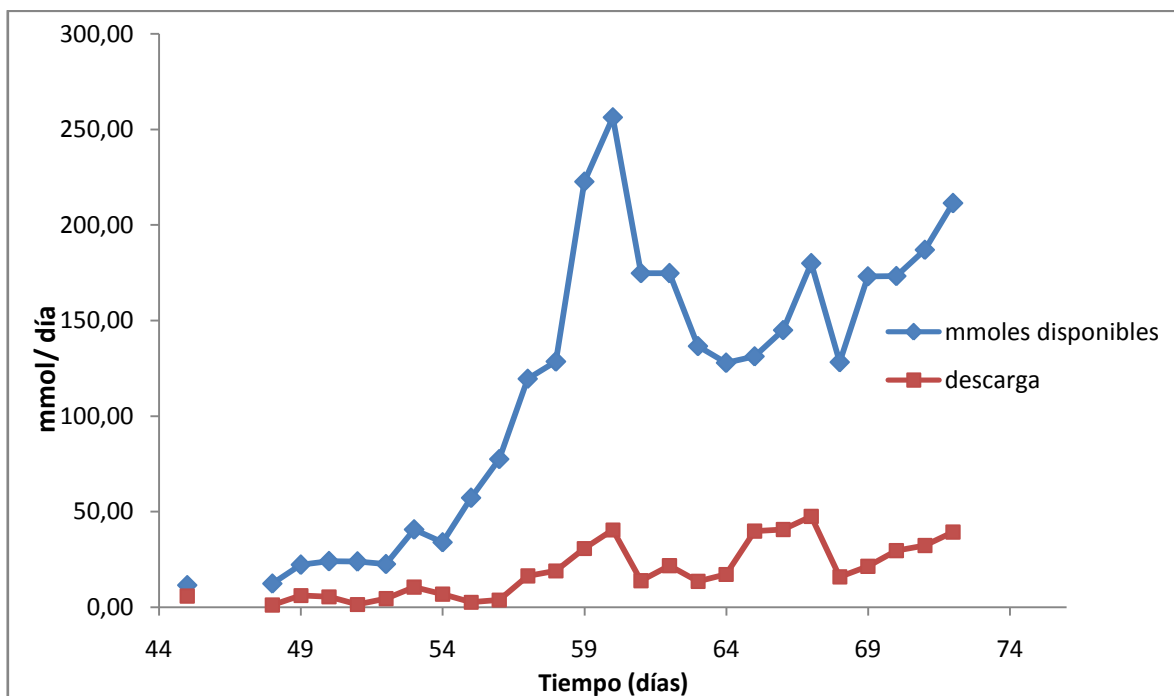
Gráfica 6. Consumo de nitrato en función del tiempo reactor SBR



Gráfica 7. Consumo de amonio en función del tiempo reactor SBR



Gráfica 8. Consumo de amonio en función del tiempo reactor SBR



Se puede ver una tendencia de crecimiento exponencial en los consumos, en los últimos 30 días, el reactor estaba en un estado estable respecto a las transformaciones de los compuestos nitrogenados y se mantuvo una carga estable de nitrito y amonio, en la siguiente sección se analizarán los consumos presentados por las bacterias anammox en el reactor.

5.4 Revisión de los consumos por parte de bacterias anammox en el reactor.

En los últimos días de seguimiento, el volumen de medio basal cargado era de 3.8 mL con una concentración 60mM y 54mM de NO_2^- y NH_4^+ respectivamente.

mmoles de NO_2^- cargadas $\text{d}^{-1} = 228$

mmoles de NH_4^+ cargadas $\text{d}^{-1} = 205.2$

Las concentraciones en los efluentes diarios promedio es la siguiente.

[] $\text{NO}_2^- = 0 \text{ mM}$

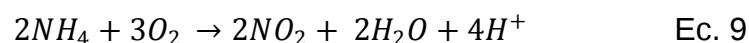
[] $\text{NH}_4^+ = 4.8 \text{ mM} = 18.2 \text{ mmoles acumuladas de } \text{NH}_4 / \text{ día}$

Así, los consumos de mmoles diarios del reactor son los siguientes.

$\text{NO}_2^- = 228 \text{ mmoles}$

$\text{NH}_4^+ = 205.2 \text{ (mmoles cargadas)} - 18.2 \text{ (mmoles en el efluente)} = 186.9 \text{ mmoles } \text{NH}_4$

Por los análisis FISH (ver sección 5.5) se determinó que la cantidad de nitrosomonas presentes en el reactor SBR estaba cerca del 5% (cantidad de microorganismos). A continuación se presenta la reacción dada por estas bacterias.



9.35 mmoles de NH_4^+ son transformadas generando 9.35 mmoles de NO_2^- diarios aproximadamente.

Dentro del reactor hay oxígeno disuelto en bajas cantidades, esto es debido a la entrada de aire que se genera al momento de descargar el efluente cada día.

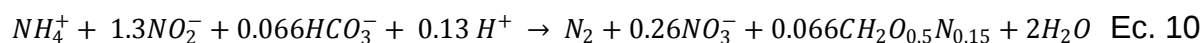
En el proceso de descarga entran al reactor 2 litros de aire. Parte de este oxígeno es aprovechado por las bacterias oxidantes de amonio presentes

Las mmoles disponibles para la reacción anammox modificando las cantidades por la influencia de las bacterias nitrificantes es la siguiente.

$$\text{NO}_2^- = 237.3 \text{ mmoles}$$

$$\text{NH}_4^+ = 177.6 \text{ mmoles}$$

La reacción de estequiometria de los microorganismos anammox es la siguiente.



La relación teórica de $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ es de 1.32 como se puede ver en la estequiometria de la reacción.

Con los datos de mmoles disponibles de NO_2^- y NH_4^+ en el reactor, teóricamente serian necesarias 179,7 mmoles de NH_4^+ para que puedan reaccionar las 237.3 mmoles disponibles de NO_2^- y se generarían 46.74mmoles de NO_3^- que equivalen a una concentración de 12.3 mM de NO_3^- .

Los datos reales muestran una relación de 1.34 de NO_2^- y NH_4^+ y un promedio de concentración en las mediciones de nitrito de 11.3 mM que equivalen a 42.9 mmoles.

Esta comparación de la estequiometria teórica y la dada en el proceso muestra la similitud existente, lo cual confirma la reacción anammox dentro del reactor y la posibilidad de operación del proceso bajo condiciones de oxigeno limitadas.

Con los datos medidos durante el seguimiento presentado en las Graficas 5-8, se puede plantear una expresión para el crecimiento de los microorganismos anammox dentro del reactor SBR en función del sustrato consumido.

La ec. de monod para el crecimiento exponencial es la siguiente (Fogler, 2001)

$$r_g = \mu C_c$$

r_g = velocidad de crecimiento celular

C_c = Concentración de células

μ = velocidad de crecimiento específica

La velocidad de crecimiento celular específica se expresa como

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_s}{K_s + C_s}$$

μ_{max} = velocidad de crecimiento específica máxima

K_s = constante de Monod

C_s = concentración de sustrato

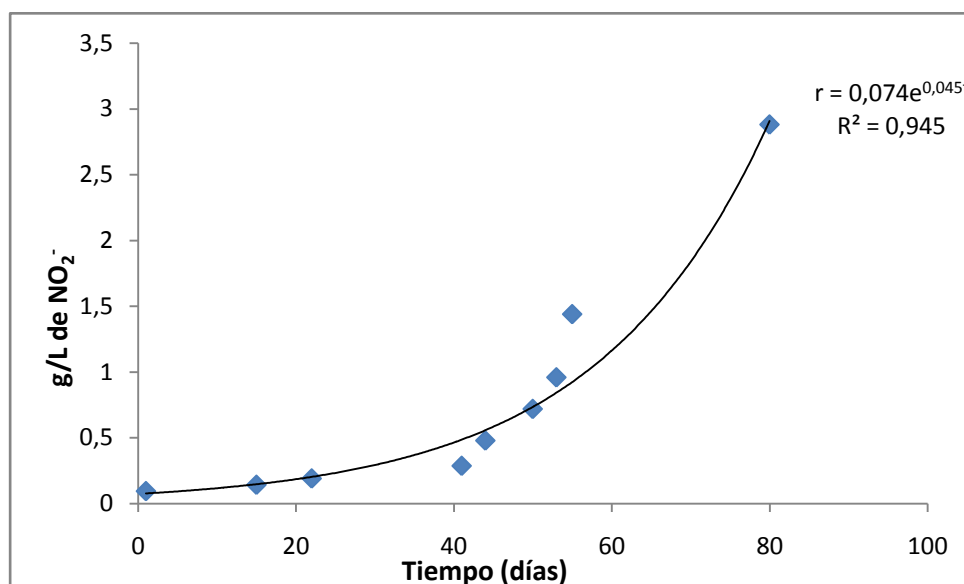
En el caso de los anammox, K_s es pequeño por lo cual $\mu = \mu_{max} = 0.072 \text{ d}^{-1}$ (Strous, 1999).

La Ecuación 11 muestra la expresión final para el crecimiento de anammox.

$$r_g = \mu_{max} C_c \quad \text{Ec. 11}$$

La Gráfica 9 muestra la velocidad de consumo de nitrito ($\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), esta gráfica permite ajustar una función exponencial como función de la velocidad de consumo de nitrito en el reactor SBR, esta función es representativa de estos datos dado que el reactor estuvo utilizando el nitrito como sustrato limite todo el tiempo.

Gráfica 9. Velocidad de consumo de nitrito en función del tiempo en el reactor SBR.



$$r = 0.074 e^{0.045 t} \quad \text{Ec.12}$$

Donde

r = velocidad de consumo de nitrito ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$).

t = Tiempo de operación. (d)

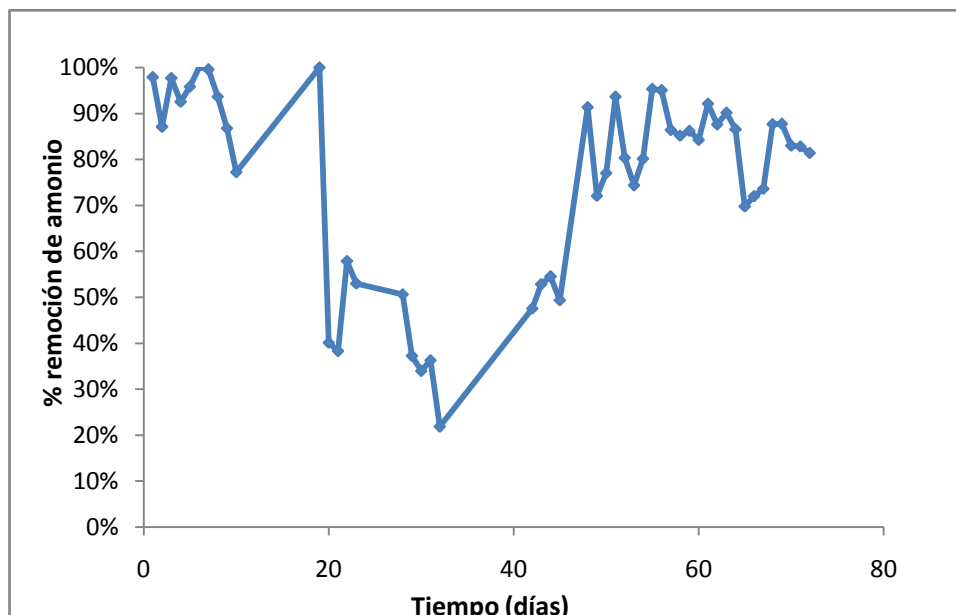
El valor de μ_{max} expresado en la ecuación de crecimiento de anammox es de 0.072 d^{-1} y se puede ver que el término de la Ecuación 12 es 0.074, de esta manera se observa que la Ecuación 12 representa la velocidad de consumo de las bacterias presentes en el sistema en función del tiempo de enriquecimiento.

Rendimientos de remoción de compuestos nitrogenados

En la Gráfica 10 se observa el rendimiento de remoción de amonio en el reactor. Se tiene un promedio de remoción de amonio de 88% aproximadamente, la remoción de amonio no es total porque se carga en exceso, como los consumos de nitritos son totales (100%), el amonio no se transformara totalmente en la reacción. La

disminución de remoción entre los días 25-36 se debe como se explico antes, a la falta de burbujeo de gas inerte, se puede observar el gran impacto que tiene la falla de la anaerobiosis en el sistema.

Gráfica 10. % Rendimiento de remoción de amonio en el Reactor SBR en función del tiempo.



5.5 Imágenes de análisis FISH realizado a la biomasa del reactor.

Las bacterias hibridizan en las sondas dando distintos colores, la hibridización con DAPI genera un color azul, y la hibridización con CY3 da un color rojo.

En la figura 7 se observa un *floc* de la biomasa del reactor bajo el nitrimix determinante de bacterias nitrificantes. Los puntos rojos son los microorganismos nitrificantes presentes.

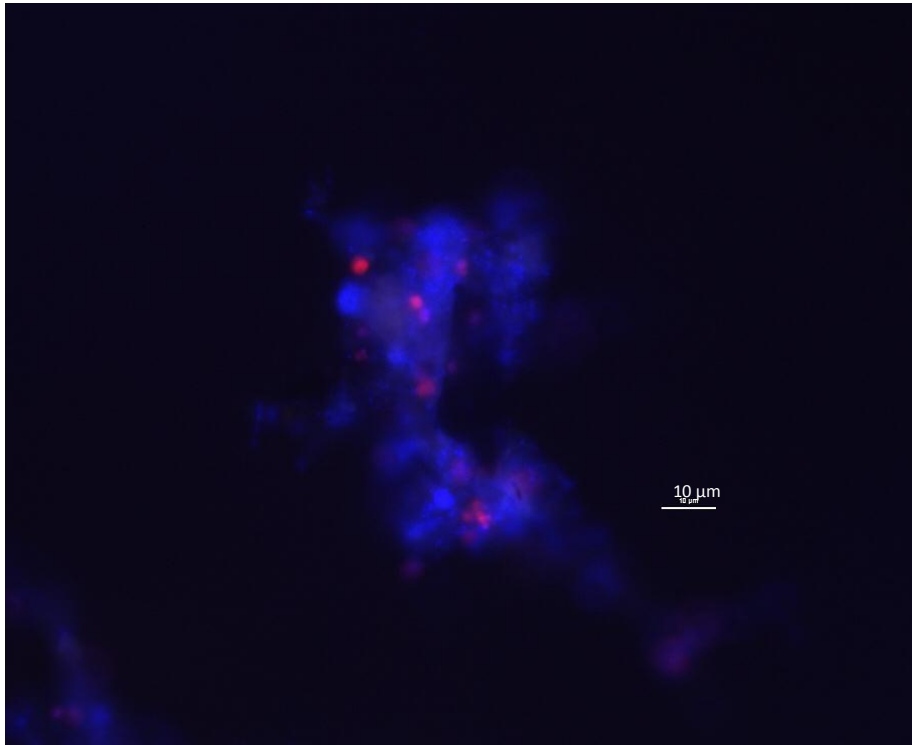
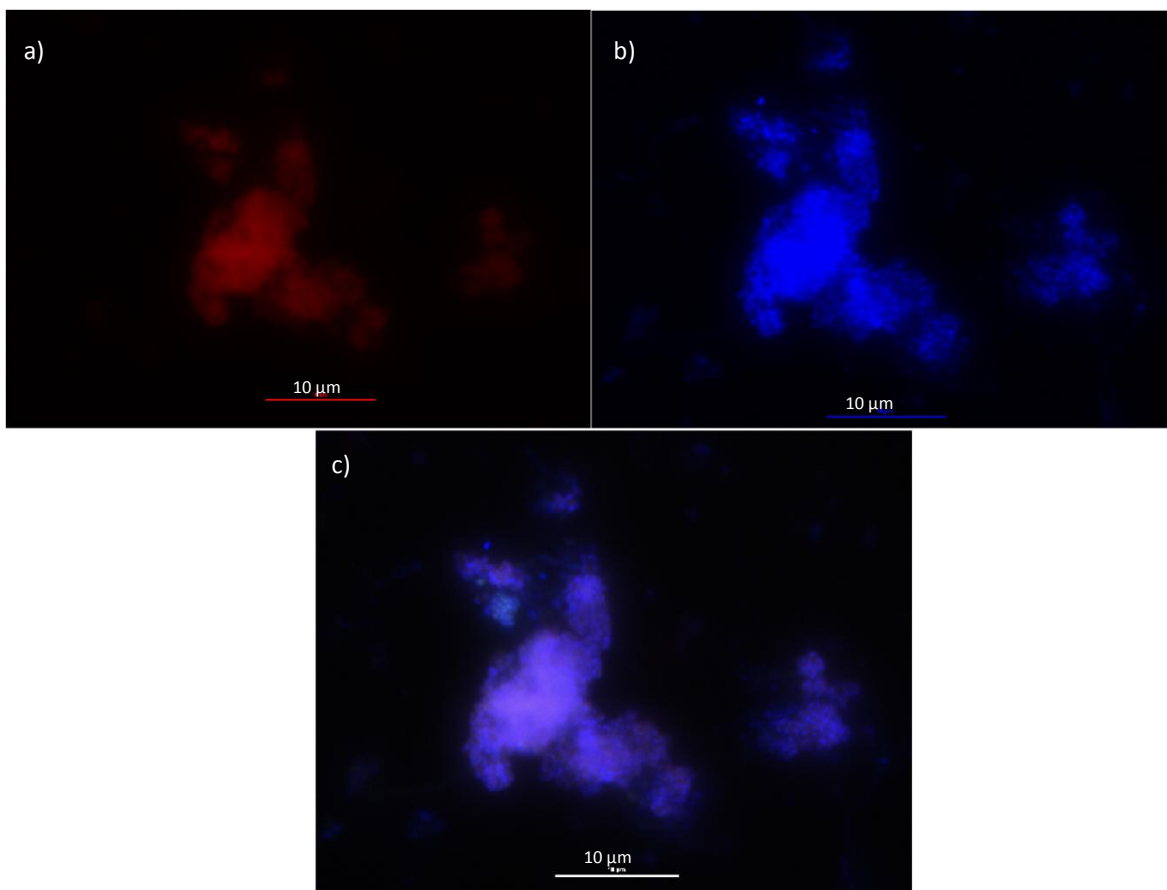


Figura 7. Imagen FISH bajo el nitrimix determinante de bacterias nitrificantes.

En las figuras 8,9 y 10 se observa el análisis FISH a los anammox de la biomasa del reactor SBR, la Figura 8 es bajo la sonda CY3, la Figura 9 esta hibridizada bajo la sonda DAPI, y la Figura 10 es la combinación, en esta se puede observar que todo lo que tiene un color azul violeta son los anammox en el *floc* los cuales son casi el 100 % de la imagen.



a) Figura 8. Hibridización CY3, b) Figura 9. Hibridización DAPI, c) Figura 10. Combinación de DAPI y CY3.

6. CONCLUSIONES

- El reactor SBR alcanzó una remoción total de $840 \text{ g d}^{-1} \text{ m}^{-3} \text{ N-NO}_2^-$ y $688 \text{ g d}^{-1} \text{ m}^{-3} \text{ N-NH}_4^+$, a una temperatura de 33°C y velocidad de agitación de 56 rpm. Estas remociones representan un rendimiento del 90 %. Además se obtuvo un modelo representativo para el consumo de amonio y nitrito dentro del reactor utilizando estos inóculos.
- La operación del sistema mostró que la alimentación continua al sistema de reacción es el mejor método de enriquecer una comunidad de microorganismos del tipo anammox ya que se evitan los problemas de inhibición por altas concentraciones de nitrito presentes y se da tiempo suficiente para la asimilación constante de los sustratos por parte de las bacterias.
- La agitación es un factor que influye notoriamente en el proceso, si esta se detiene, inmediatamente se inhibe la comunidad de anammox ya que el nitrito empieza a acumularse dentro del sistema.
- El reactor puede operar para el tratamiento de aguas residuales con oxígeno limitado promoviendo la nitrificación parcial y evitando la aplicación directa de nitrito. La nitrificación parcial y el proceso anammox se pueden aplicar en reactores a escala de laboratorio, evitando el uso de burbujeo de gases para mantener la anaerobiosis.

7. RECOMENDACIONES

- Cuando se alcanzan altos consumos de nitritos y amonio como los presentados en el reactor SBR, se puede intentar iniciar una carga con agua residual real, teniendo todas las precauciones necesarias, de esta manera el sistema se empezará a ajustar progresivamente a manejar las aguas residuales reales y así se puede evitar los costos de la preparación del agua residual sintética.
- El burbujeo de gas Ar/CO₂, demanda altos costos de operación, para evitar estos gastos, sería aconsejable cambiar y evaluar distintos métodos de burbujeo, como por ejemplo realizando una entrada de gases a la atmósfera interna del reactor de manera que cuando se descargue el sobrenadante diariamente, se inicie una carga de gases inertes en la atmósfera del reactor evitando la entrada de aire al sistema por la diferencia de presiones que genera la descarga.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ahn Y. Hwang IS, Min KS (2004) Anammox and partial denitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste. *Water Sci. Technol.* 49: 145-153.

Ahn Y. Choi H. (2006). Autotrophic nitrogen removal from sludge digester liquids in upflow sludge bed reactor with external aeration. *Process Biochemistry*, Volumen (41), 9 : 1945-1950.

Arroyo B. Mosquera-Corral A. Campos JL. Mendez R (2006) Effects of mechanical stress on anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *J. Biotechnol* 123: 453-463.

Broda E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17, 123-143.

Dapena-Mora,A, Fernandez,I., Campos,J.L,Mosquera-Corral, A.,Mendez, R, Jetten, M.S.M (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on anammox process by batch test based on the nitrogen gas production.*Enzyme Microbiol. Technol.*40(4), 859-865.

Dosta J. Fernandez I. Vazquez-Padin J. Mosquera-Corral A. Campos JL. Mata-Alvarez J. Mendez R (2008). Short- and Long-term effects of temperatura on the anammox process. *J. Hazard Mater* 154: 688-693.

Egli K. Franger U. Alvarez PJ. Siergrist H. Vandermeer JR, Zehnder AJ (2001). Enrichment and Characterization of an anammoxbaterium from rotating biological contractor treating ammonium-rich leachate. *Arch. Microbiol.* 175 : 198-207

Eckenfelder W., Musterman J. (1995). *Activated Sludge treatment of industrial wastewater*,Lancaster. P.

Fogler H.S.(2001), *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. Tercera edición, Pearson Education. Capitulo 7.

Grady C.P, Daigger G. T, Lim H.C.1999. *Biological wastewater treatment*. Marcel Dekker, segunda edición.

Geankoplis C.J (1998). *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. Tercera edición. Compañía Editorial Continental S.A., 3 :161-173

Kartal B., et al (2006). Adaptation of freshwater anammox population to high salinity wastewater. *J. Biotechnol*, 126: 546-553.

Kartal B. , Rattray J., Niftrik L., Vossenberg J., Schmid M., Webb R. , Schouten S. , Fuerst J. , Damsté J. , Jetten M., Strous M. (2007). Anammox bacteria disguised as denitrifiers : nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Systematic and Applied Microbiology*, Volumen (30), 1: 39-49.

Koivunen J., Siitonen A., Heinonen-Tanski H., (2003) Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Research* 37: 690-698.

Kuenen JG. (2008) .Anammox bacteria: from discovery to application. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 320-326 .

Mara, D.D., Alabaster, G.P., Pearson, H.W. and Mills, S.W. (1992). *Waste Stabilization Ponds: A Design Manual for Eastern Africa*. Lagoon Technology International. Leeds, England.

Mulder A., Graaf A. , Robertson L. , Kuenen J.G (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16 : 177-184.

Ramalho RS. (1996) *Tratamiento de Aguas residuales*. Ed. Rev. Reverté. Cap 3, 5-9.

Rittmann B. McCarty P. (2001). *Biotecnología del medio ambiente: Principios y Aplicaciones*. Ed. 1. Mc Graw Hill. Pag 102-104.

Rojas, Jairo (2000). *Tratamiento de aguas residuales: Teoría y principios de diseño*. Escuela Colombiana de Ingeniera.

Sanabria J, Sanchez J, Bedoya L. (2009). *Proceso ANAMMOX una aplicación en ingeniería: Revisión general de los aspectos microbianos*.

Luesken F. A., Sánchez J., van Alen T., Sanabria J, Hub J.M, Jetten M.S.M, Kartal B.(2011). Simultaneous Nitrite-Dependent Anaerobic Methane and Ammonium Oxidation Processes. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 6802-6807.

Schalk J. De Vries S. Kuenen JG. Jetten MS (2000) Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in anaerobic ammonium oxidation. *Biochemistry* 39 : 5405-5412

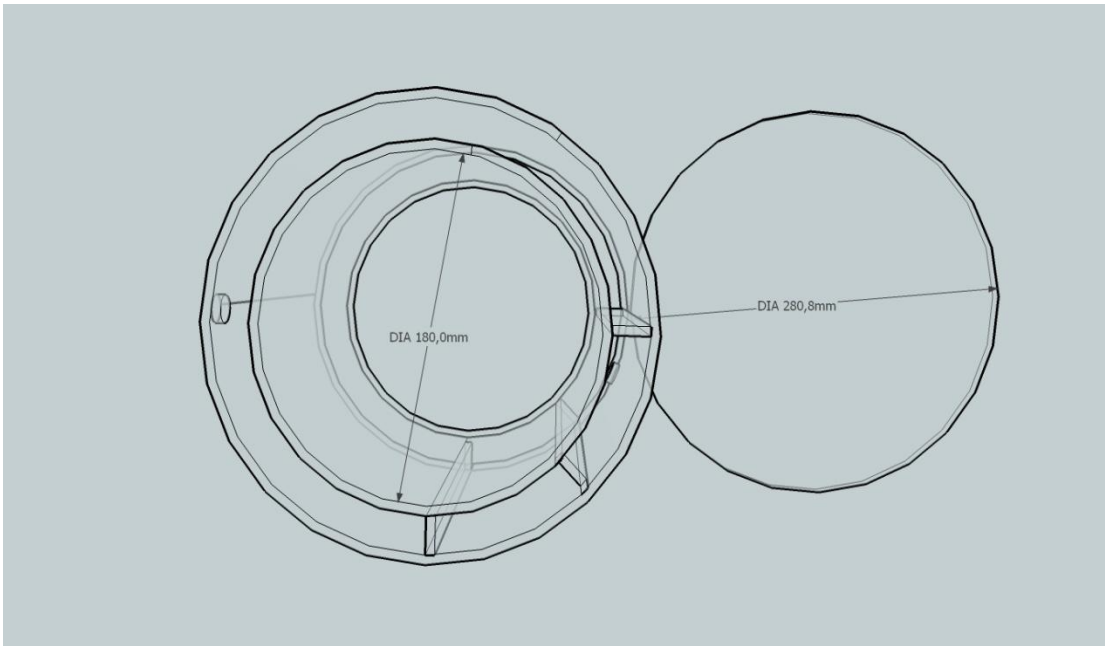
Sliekers AO, Third K, Abma W, Kuenen JG, Jetten MSM (2003). CANON and Anammox in gas-lift reactor. *FEMS Microbiology Ecology* 218: 339-344.

- Strous M., Van Gerven E., Zheng P., Kuenen J., Jetten M. (1997) . Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Research*, Volumen (31), 8: 1955-1962.
- Strous M, Fuerst JA, Kramer EH (1999). Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 7: 3248-3250.
- Tsushima I. , Ogasawara Y., Kindaichi T., Satoh H., Okabe S. (2007). Development of high-rate anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) biofilm reactor. *Water Research*, Volumen (41), 8 : 1623-1634.
- Van de Graaf, A.A. de Bruijn P. Robertson L.A., Jetten MS. Kuenen JG.(1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology (UK)* 142: 2187-2196.
- Vitousek P., Mooney H. , Lubchenco J. , Melillo J. (1997), Human domination on Earth's ecosystems. *Science*, 277: 494-499.
- Wang T. , Zhang H., Yang F. , Liu S. , Fu Z. , Chen H. (2009) .Star-up of the anammox process from the conventional activated sludge in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, Volumen (100), 9 : 2501-2506.
- Warakomski A. , Kempen R., Kos P. (2007). Microbiology /biochemistry of the nitrogen cycle. *Proceedings of the Water Environment Federation*, 26 : 495-520.
- Wei Y., Van Houten R., Borger A., Eikelboom D., Fan Y.,(2003). Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment. 37: 4453-4467.
- Wouter R., Wiebe A., Blommers D. , Mulder J., Tokutomi T., Strous M. , Picioreanu C., van Loosdrecht M. (2006) .Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Research*, Volumen (41), 18: 4149-4163.
- Xiumei D. Jiti Z. Sen Q. Haifeng W. (2010) Application of low intensity ultrasound to enhance the activity of anammox microbial consortium for nitrogen removal. *Bioresource Technology* 102 : 4290-4293.

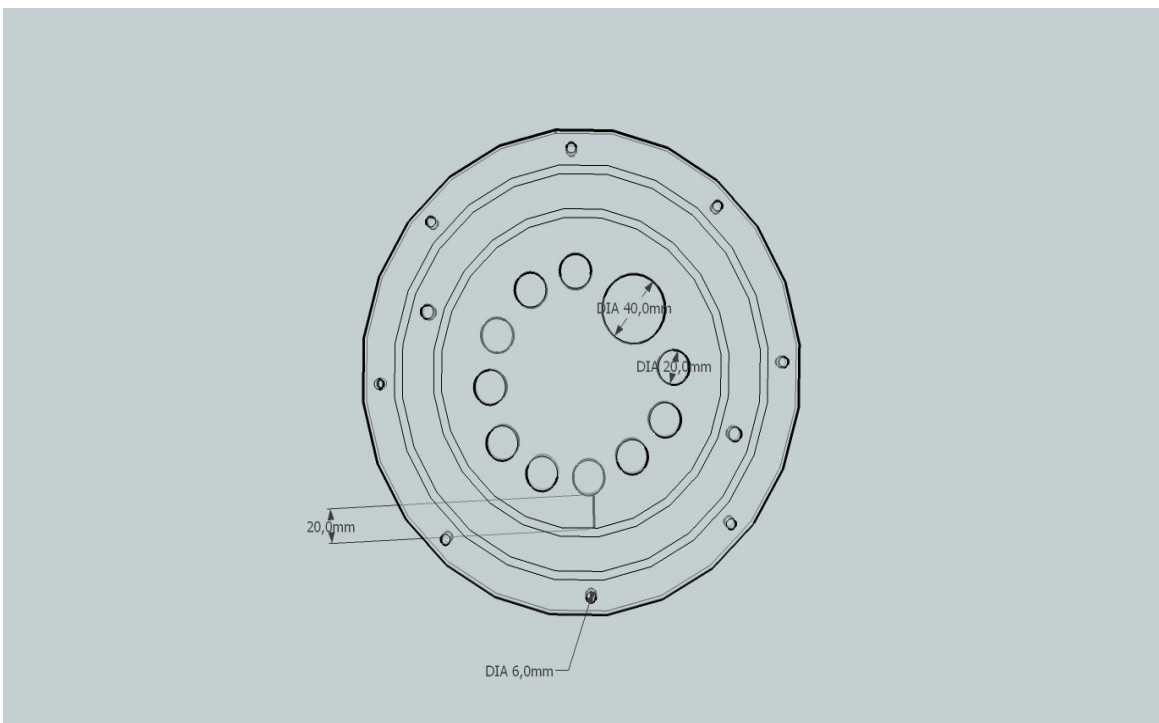
ANEXOS

Anexo 1. Planos Iniciales del Diseño del Reactor Anammox (Diseño realizado en colaboración con Julien Wist y Jorge Requejo).

Anexo 1a. Tanque interno del reactor, base y chaqueta de calentamiento.

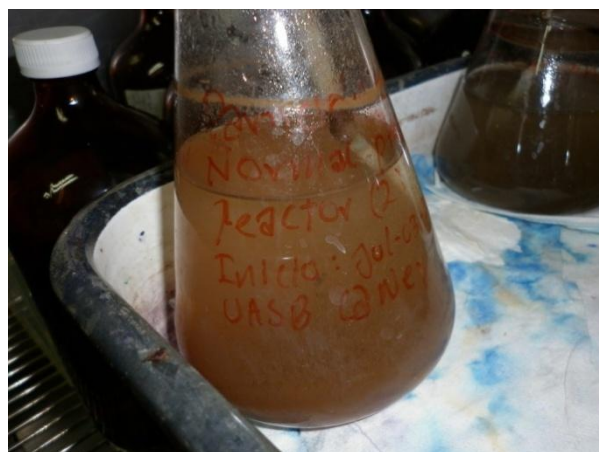


Anexo 1b. Tapa del reactor SBR, perforaciones para sondas y entradas y salidas del sistema.



ANEXOS 2. Fotografías de los montajes realizados.

Anexo 2a. montaje de reactor en erlenmeyer.



Anexo 2b. color de la biomasa dentro del reactor SBR.



Anexo 2c. fotografia completa del reactor SBR.



Anexo 2d. Fotografia sistema de agitación, carga y almacenamiento de sustratos.



ANEXOS 3. PROTOCOLOS DE MEDICION DE SUSTRATOS (NO_2 , NO_3 Y NH_4)

Anexo 3a. Protocolo de medición de nitrito (Van Eck.1966).

Rango de medición: 0.1 – 1 mM NO_2^-

La curva de calibración es realizada con las siguientes concentraciones : 0.1mM, 0.2mM, 0.4mM , 0.5 mM, 1 mM de NO_2^-

Reactivos

Solución A: 1% (p/v) de ácido sulfanílico en una solución 1M de HCl (disolverla en la oscuridad, esto tarda al menos media hora).

Solución B: 0.1% (p/v) de Diclorhidrato de NED, disuelto en agua milli-Q.

Estas mediciones se basan en la reacción de deionización descrita por 1879 (Griess, 1879) en la cual el nitrito reacciona bajo condiciones ácidas con el ácido sulfanílico para formar un catión diazonio () el cual después empata con la amina aromática nalttilamina () para producir un color violeta rojizo soluble en el agua

Antes de medir las concentraciones de nitrito se debe asegurar que tenga diluida las muestras para que estén dentro del rango del protocolo.

1. Adicionar 0.1 mL de la muestra a la cubeta del espectrofotómetro
2. Adicionar 0.9 mL de agua.
3. Adicionar 1mL de la solución A.
4. Agregar 1 mL de la solución B
5. Esperar 10 minutos.
6. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm

Siempre realizar la curva de calibración y el blanco al mismo tiempo para asegurarse que los resultados son verídicos.

Anexo 3b. Protocolo de medición de amonio (Van Eck.1966)

Método del fenol

Este método aplica para un rango de concentraciones bajas de amonio, a partir de 10 micromoles de amonio.

Para la curva se deben realizar las siguientes diluciones con estas concentraciones.

10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M.

Reactivos.

Solución A: 14.1 g/L Fenol

140mg /L Na-nitroferricianida

Diluir hasta el volumen deseado con agua milli-Q.

Solución B: 5.2g/L NaOH (pellets)

3.542 mL/L de NaOCl 13%

Diluir hasta el volumen deseado con agua Milli-Q

Método de medición.

1. Agregar 0.4mL de muestra en un tubo de ensayo con tapa.
2. Agregar 1mL de la solución A.
3. Agregar 1 mL de la Solución B.
4. Agitar.
5. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
6. Medir la absorbancia a una longitud de onda de 623 nm.

Anexo 3c. Protocolo colorimétrico de medición de nitrato

Este método es aplicable a muestras limpias con bajo contenido de materia orgánica, tales como las provenientes de plantas de suministro o posos de agua subterránea. Las mediciones se realizan utilizando un fotómetro a 220nm, para concentraciones inferiores a 10 mg/L de nitrógeno en forma de NO₃, rango para el cual se cumple la ley de Beer.

Teniendo en cuenta que tanto la materia orgánica como el ion nitrato absorben energía radiante a una longitud de onda de 220 nm, y que la materia orgánica mas no el ion nitrato absorbe también a 275nm, el método analítico realiza las mediciones a estas dos longitudes de onda con el objeto de corregir las primeras mediciones por la interferencia que haya podido ocasionar la materia orgánica presente en la muestra.

El método fotométrico es muy bueno para muestras limpias y puede adaptarse bien para muestras con materia orgánica, siempre que esta permanezca estable y constante. La filtración de las muestras a través de membranas de 0.45 μ antes de realizar las mediciones ayuda bastante a minimizar las interferencias ocasionadas.

Equipos y Materiales.

- Espectrofotómetro para medir a 220 y 275 nm
- Agua destilada.
- Solución stock de nitratos: disolver 0.7218 g de KNO₃ previamente secado en un litro de agua y preservar por la adición de 2 ml de cloroformo.

A partir de esta solución la cual es de 100mg/ L de N. se preparan las soluciones para realizar la curva.

1mg/L

2mg/L

4mg/L

5mg/L

10mg/L

Se toman las muestras y se disuelven hasta alcanzar una concentración estimada que este dentro del rango del método.

Se toman 5 ml de muestras y de la curva y se les agregan 100 μL de la solución HCl 1N.

Se agita vigorosamente y se lee la absorbancia a 220 y 275 nm.

Para realizar la corrección por materia orgánica se toma el valor leído a 220 y se le resta el valor medido a 275nm multiplicado por 2.

$$\text{Abs 220} - (2) \text{ Abs 275}$$

Si el valor medido a 275 es mayor al 10% del valor medido a 220nm este método no es recomendable.

ANEXO 4. Protocolo montaje de técnica FISH para el análisis de las poblaciones de microorganismos presentes

1. Equipos y materiales

- Balanza analítica Acculab Sartorius Group
- Plancha de agitación y calentamiento Corning Stirrer/hot plate
- pH Hanna
- Tubos falcon de 50 mL
- Micropipeta de 0.5 a 10 uL eppendorf
- Centrifuga
- Pesa sal
- Espátula
- Probeta de 50 mL
- Magnetos
- Cinta de enmascarar
- Tips de 0.5 a 10 uL
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Nevera a 4°C Phillips
- Incubadora a 45°C WTB
- Microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i

2. Reactivos y soluciones

- Hidróxido de potasio
- Etanol al 96%
- Gelatina
- $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$
- Paraformaldehído
- Hidróxido de sodio

3. Desarrollo

Soluciones

1. Solución de KOH etanolico

- Disolver 20 gr de KOH (hidróxido de potasio) en 200 ml de etanol al 96%.
- Colocar en el agitador magnético hasta la completa disolución.

2. Preparación de la solución de gelatina y $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$

- Disolver 1 gr de gelatina en 50 ml de agua destilada estéril.

- Calentar en el microondas hasta ebullición.
- Colocar en el agitador magnético y añadir 50 µl de $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ al 10%.
- Mantener a temperatura de $40 \pm 50^\circ\text{C}$.

3. Buffer de Fijación (PFA Al 4% En PBS pH 7.2)

- Calentar 44.5 ml de agua destilada estéril a 60°C .
- Añadir 5 mL de PBS 1X (buffer fosfato salino)
- Añadir una gota de NaOH 10M
- Colocar en el agitador magnético y añadir 2 g de paraformaldehído (PFA)
- Mezclar hasta disolución completa del paraformaldehído
- Dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente
- Ajustar pH a 7.2
- Filtrar la solución a través de un filtro de 0.2 µm

Nota: El buffer de fijación debe prepararse en fresco y puede almacenarse máximo 12 horas a -20°C .

4. Preparación de Láminas con Gelatina

- Remojar las láminas durante 1 hora en solución de KOH etanólico.
- Enjuagar con agua MilliQ, dejar secar a temperatura ambiente
- Repetir el paso anterior dos veces
- Colocar las láminas en una bandeja y remojar durante 1 minuto con solución de gelatina y $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ caliente.
- Agitar con pequeños movimientos en todas las direcciones.
- Retirar las láminas de la bandeja y dejarlas secar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Repita el paso anterior tres veces
- Almacenar las laminas en una caja portaobjetos a 4°C

1. Buffer de hibridación

3. 4.5 M NaCl

5. 200 mM Tris-HCl (pH 7.2)

7. 10% SDS

9. Formamida deionizada (FA)

2. 30% FA

4. 0.2 ml

6. 0.1 ml

8. 10 µl

10. 0.3 ml

11. Agua doblemente estéril*

12. 0.4 ml

13. Volumen total (approx.)

14. 1 ml

Agua destilada esterilizada en autoclave y posteriormente esterilizada por filtración a través de un filtro de 0.22 μ M

% de Formamida	Añadir X μ l de Formamida	Añadir Y μ l de Agua MilliQ
30	600	998

6. Buffer de lavado

Formamida deionizada	30%
Concentración NaCl (mM)	112
4.5M NaCl (ml)	0.5
0.5 M EDTA, pH 8.0 (μ l)	200
200 mM Tris-HCl, pH 7.2 (ml)	2
10% SDS (μ l)	200
Completar el volumen con agua destilada doblemente estéril	20

% de Formamida usado en el Buffer de Hibridación	Añadir X μ l de NaCl 5M	Añadir Y ml de Agua MilliQ
30	1120	47,33

Desarrollo

1. Fijación Celular

- Tomar 1 mL de la muestra de lodo anaerobio en un tubo eppendorf de 2 mL
- Adicionar 1 mL de PBS 1X (buffer fosfato salino), mezclar con el vortex aproximadamente 5 minutos.
- Centrifugar la mezcla a 13.000 g durante 3 minutos. (repita esta operación tres veces)
- Retirar el sobrenadante y suspender nuevamente el pellet en 0.25 mL de PBS 1X

- Añadir 0,75 ml de paraformaldheido al 4%, mezclar en vortex
- Incubar durante dos horas o toda la noche a 4°C
- Lavar las células, centrifugar a 13.000 g durante 3 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Añadir 1 mL de PBS 1X, mezclar y centrifugar a 13.000g durante 3 minutos.
- Repetir el paso anterior dos veces
- Resuspender el pellet en un volumen 1:1 (v/v) de PBS 1X y etanol absoluto (96%), mezclar
- Almacenar a -20°C

2. Deshidratación de las muestras

- Esparcir 10 µl de la muestra de lodo anaerobio previamente fijada sobre el pozo de la lámina previamente cubierta con la gelatina y dejar secar a temperatura ambiente por 21/2 horas aproximadamente.
- Deshidratar la muestra con etanol al 50% durante tres minutos luego con etanol al 70% durante tres minutos y finalizar con etanol al 96% durante tres minutos.
- Dejar secar completamente la lámina a temperatura ambiente.
- Almacenar en oscuridad a temperatura ambiente si no se utilizan inmediatamente.

3. Hibridación de las muestras

- Colocar 9 µl de buffer de hibridación en cada pozo de la lámina, sobre la muestra previamente deshidratada (si solo va a trabajar una sonda).
- Añadir 1 µl de sonda etiquetada con el fluorocromo CY3 o FAM (Concentración final = 5 ng/µl).
- Colocar cuidadosamente la lámina dentro de un tubo falcon de 50 ml, el cual está asentada sobre papel wathman previamente humedecido con buffer de hibridación.
- Incubar por 2 horas a 45 0C.
- Colocar 50 ml de buffer de lavado en otro tubo falcon e incubar a la misma temperatura.
- Al terminara el período de incubación transferir la lámina que se está hibridando al tubo con el buffer de lavado precalentado a esta misma temperatura e incubar durante 20 minutos.

- Remover la lámina del tubo, enjuagar cuidadosamente con agua destilada estéril varias veces y dejar secar a temperatura ambiente.
- Dispensar 1 μ l de citifluor y DAPI (v/v) en cada uno de los pozos.
- Colocar el cubreobjetos de 20 x 60 mm sobre la lámina cuidadosamente.
- Observar al microscopio Nikon Eclipse 90i
- Almacenar cada una de las láminas a -20 $^{\circ}$ C si no se va observar inmediatamente.

Nota: Tener en cuenta que cada la lamina tiene 8 pozos, donde se coloca la muestra con la sonda o sondas a testar y además deben sembrarse un control positivo, un control negativo (muestras sola = autofluorescencia), y uno para fluorescencia no especifica (con sonda NON).

4. Observación al microscopio

- Encender el microscopio, la intensilight, la cámara y el computador.
- Abrir el software Nis-elements
- Situar la lamina en la platina y asegurarla con las pinzas
- Enfocar la placa sobre el papel de la lamina para mayor seguridad y luego pasar a la muestras (no se pierde el enfoque del campo visual) con el objetivo de 10X, luego pasar al objetivo de 20X, 40X y por ultimo adicionar 1 gota de aceite de inmersión de fluorescencia en el pozo de la lamina para observar en el objetivo de 100X.
- Escoger el filtro para visualizar: DAPI, CY3 o FITC
- Observar el campo visual y al obtener la imagen deseada tomar la foto y guardarlo en el formato ND2 que es el del microscopio para después contar, editar o importarla a formato jpg. De acuerdo a las sondas trabajadas debe tener la foto con los diferentes filtros testados
- Continúe con el mismo procedimiento con el resto de pozos
- Al finalizar limpie el objetivo de 100X, deje el equipo en el objetivo de 10X, apague el microscopio, la intensilight, la cámara y el computador.
- Registre el uso del equipo en la carpeta colocada enseguida del equipo.

ANEXO 5.Base de datos, mediciones realizadas al reactor SBR.

Muestra día	NO2[] del Medio(mM)	NH4 [] del Medio(mM)	Volumen alimentado(ml)	mM disponibles NO2(mM totales en el reactor)	mM disponibles NH4(mM totales en el reactor)	mM de NO2 en el efluente del reactor	mM de NH4 en el efluente del reactor
05-abr	2	2				0	0,0
06-abr	2	2	500	1	1	0	0,1
07-abr	2	2	500	1	1,15	0	0,0
08-abr	2	2	500	1	1,01	0	0,1
09-abr	2	2	450	0,9	0,97	0	0,1
10-abr	2	2	550	1,1	1,15	0	0,0
11-abr	2	2	750	1,5	1,5	0	0,0
12-abr	2	2	750	1,5	1,50	0,02	0,1
13-abr	2	2	650	1,3	1,35	0,12	0,2
14-abr	2	2	920	1,945	2,02	0,15	0,5
15-abr	2	2	930	2	2,18	0,06	
16-abr	2	2	700	1,435		0,016	
17-abr	2	2	800	1,6		0,09	
18-abr	2	2	500	1,07		0	
19-abr	3	3				0	
20-abr	3	3	0				
21-abr	3	3	500			0	
22-abr	3	3	750	2,25		0	
23-abr	3	3	720	2,16		0	
24-abr	3	3	980	2,94	2,94	0	3,38
25-abr	3	3	1600	4,8	7,29	0	4,97
26-abr	4	4	900	3,6	7,71	0	3,18
27-abr	4	4	1300	5,2	7,55		3,65
28-abr	4	4	1300		7,28	0	
29-abr	4	4	0			0	
30-abr	4	4	0			0	
01-may	4	4	0			0	
02-may	4	4	680			0,15	2,30
03-may	4	4	700	2,8	4,56	0,84	3,27
04-may	4	4	630	3,2585	4,99	0,39	4,16
05-may	4	4	650	2,964	6,29	0,12	3,19

06-may	4	4	600	2,519	4,91	0,08	7,42
07-may	4	4	450	1,814	5,42	0,24	
08-may	4	4	850	3,6555		0	
09-may	4	4	600	2,4		0	
10-may	4	4	2000	8		0	
11-may	4	4	2600				
12-may	4	4	1050				
13-may	4	4	1500				
14-may	4	4	650				
15-may	6	6	1400			0,045	7,650
16-may	6	6	1700	10,2	10,2	0,155	5,624
17-may	10	10	600	6,12	10,43	0,235	7,527
18-may	10	10	1000	10,16	15,62		7,231
19-may	10	10	1000	10,26	15,69	0,136	5,808
20-may	10	10	650	6,61	11,23	0,20	
21-may	10	10	1250	12,62		0	
22-may	10	10	1700	17		0,00	1,07
23-may	15	15	1100	16,5	16,5	0,00	6,18
24-may	15	15	1200	18	22,23	0,00	5,51
25-may	15	15	1200	18	23,37	0,00	1,51
26-may	15	15	1550	23,25	23,25	0,00	4,44
27-may	20	20	950	19	22,09	0,00	10,41
28-may	20	20	950	19	23,32	0,00	6,74
29-may	30	30	950	28,5	34,21	0,00	2,67
30-may	40	40	1900	76	79,73	0,00	3,87
31-may	60	60	1200	72	72	0,00	16,29
01-jun	60	60	1880	112,8	122,53	0,00	19,09
02-jun	60	60	1860	111,6	123,65	0,00	30,79
03-jun	60	60	3450	207	218,05	0,36	40,48
04-jun	60	60	2050	123	140,99	0,73	13,81
05-jun	60	60	1950	117,3	123,78	0,69	21,66
06-jun	60	60	2100	126,3	131,01	0,53	13,46
07-jun	60	60	2650	159,3	176,38	0,71	17,21
08-jun	60	60	2100	126,5	126	0,57	39,72
09-jun	60	60	1750	105,4	131,26	0,54	40,64
10-jun	60	60	1950	117,3	141,99	0,54	47,49
11-jun	60	60	1450	87,3	111,67	0,00	15,82
12-jun	60	60	2000	120	130,79	0,00	21,30
13-jun	60	60	3100	186	194,71	0,00	29,54

14-jun	60	60	2380	142,8	158,79	0,00	32,17
15-jun	60	60	2800	168	183,15	0,00	39,29
16-jun	60	55	3250	195	213,98	0	