



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

DEPARTAMENTO
DE INGENIERÍA
HIDRÁULICA
Y MEDIO AMBIENTE

**ESTUDIO DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN Y
DESNITRIFICACIÓN VÍA NITRITO PARA EL TRATAMIENTO
BIOLÓGICO DE CORRIENTES DE AGUA RESIDUAL CON ALTA
CARGA DE NITRÓGENO AMONIAICAL**

TESIS DOCTORAL

JAVIER ALFONSO CLAROS BEDOYA

**DIRECTORES:
DANIEL AGUADO GARCÍA
JOSÉ FERRER POLO**

VALENCIA, 2012

AGRADECIMIENTOS

Llegado a este punto, me permito dejar constancia por escrito del profundo agradecimiento que siento hacia las personas y entidades que de una u otra forma han contribuido en esta etapa tan importante de mi vida: *Tesis Doctoral*.

A mis directores de Tesis, los doctores José Ferrer y Daniel Aguado. Su interés, apoyo y buenos consejos me permitieron comprender la esencia de la investigación, que me llevó finalmente a la confección de este documento de tesis doctoral.

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento al doctor Daniel Aguado. Su incondicionalidad, esfuerzo, paciencia, confianza, dedicación y precisión me aportaron la seguridad que necesitaba para llevar a cabo el trabajo que ahora presento. *Muchas gracias Dani*.

A la doctora Aurora Seco por darme la oportunidad de participar en muchas de las actividades que se desarrollan en el grupo de investigación Calagua. Su experiencia investigativa y buenos consejos me han permitido forjarme un perfil como investigador.

Al doctor Joaquín Serralta por su colaboración en las actividades de investigación en las que he participado. Sus aportaciones han sido muy valiosas para la realización de esta tesis doctoral. También quisiera agradecer su acompañamiento durante mis inicios en la docencia universitaria.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Politécnica de Valencia por la beca que me concedió durante cuatro años para la realización de esta tesis.

Al doctor Mark Van Loosdrecht (*Delft University of Technology*) por darme la oportunidad de involucrarme en su grupo de investigación.

A los doctores Alberto Bouzas y Luis Borrás por su valiosa colaboración durante mi etapa de experimentación en el Laboratorio de Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Valencia. Les agradezco las enseñanzas, la confianza y la amistad que me han brindado durante todo este tiempo.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros y amigos del grupo de investigación, los cuales han sido y seguirán siendo parte importante en mi vida:

A Emérita, con la que he compartido muchos momentos en torno al desarrollo de nuestras tesis doctorales.

A Ramón, Paqui y Josep por el apoyo que me han brindado en todo momento.

A Nuria, Laura Pastor, Vicky, Luisa, Marcela y José Pastor por acogerme como uno más en el *despachito*. Les tengo un especial aprecio por tantos y tan buenos momentos compartidos.

A Estela por su amistad.

A Berta, Sara y Ana Peral por el buen ambiente en el laboratorio y la calidad en el desempeño de su trabajo. Su amistad es muy valiosa, y estoy muy agradecido por haber compartido con *ustedes* tantos momentos.

A Laura Segovia, Laura Carretero, Rafa, Brenda, Juan, Ana Ruíz y Silvia por compartir tantos momentos dentro y fuera del laboratorio. Les agradezco el excelente compañerismo y el buen ambiente de trabajo que siempre tuvimos en el laboratorio.

A Javier Eduardo, por su invaluable colaboración. Javi gracias por su amistad y por echarme una mano cuando lo necesité.

A Freddy porque volvemos a coincidir a muchos kilómetros de *nuestra tierra*. Gracias por su amistad, consolidada durante estos últimos años, y por la colaboración tanto dentro como fuera del trabajo.

A Ángel por brindarme su amistad. Han sido muchas las oportunidades que hemos tenido de charlar, y de las que he extraído aspectos muy positivos. Quisiera agradecer tu apoyo en todo momento. *Ángel gracias por el diseño de la portada.*

A Dani (*el informático*), Antonio y Ruth por los *almuerzos* compartidos durante mi permanencia en la UPV. Dani gracias por el buen humor que te caracteriza y la capacidad de trabajo *bajo presión*.

Y al resto de compañeros del grupo Calagua, muchas gracias.

Quisiera expresar también mi agradecimiento a Ángela, Xiomy, Juanmi, Martha Torres, Carlos y Fran. Gracias por las palabras de ánimo y la confianza que han depositado en mí. Sé que coincidiremos en muchas más ocasiones.

Finalmente, quisiera darle las gracias a mi familia por su confianza, especialmente a mi mamá que siempre ha estado en primera fila apoyándome en las decisiones que he tomado, que me ha sabido levantar en los momentos difíciles, y que sé que se alegra enormemente con cada uno de mis pequeños logros. *Gracias mamá.*

RESUMEN

RESUMEN

El crecimiento acelerado de los núcleos urbanos, la explotación inadecuada de los recursos naturales y la sensibilización y concienciación de la sociedad hacia la calidad ambiental, han puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar e implementar tecnologías enfocadas a prevenir, mitigar, corregir y compensar los graves problemas de contaminación de origen antropogénico. Uno de los problemas que presenta especial interés en la actualidad es el tratamiento que debe darse a las aguas residuales en función de su destino y teniendo en cuenta su posible reutilización antes de su vertido.

A nivel legislativo, la Directiva 2000/60/EC del Parlamento Europeo y el Consejo de Europa establece un marco comunitario de acción en el ámbito de la política del agua, y en cuanto a depuración de agua se refiere, la Directiva 91/271/EC establece los límites de vertido de contaminantes procedentes de las estaciones de depuración de agua residual (EDAR), e introduce el concepto de zonas sensibles, en el que se establece la importancia de eliminar nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, de las aguas residuales, en vista de su impacto negativo sobre los ecosistemas acuáticos.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la posibilidad de optimizar el funcionamiento de las EDAR mediante el empleo de procesos que permitan eliminar el nitrógeno amoniacal vía nitrito de corrientes de agua residual con elevada concentración de amonio, como es el caso de la corriente del sobrenadante deshidratado procedente de la digestión anaerobia de fangos. La investigación también ha abordado la mejora en la instrumentación y el análisis del proceso, promoviendo el desarrollo de metodologías y estrategias que permitan monitorizar, controlar y automatizar en tiempo real el funcionamiento de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito, para cumplir los requisitos de vertido establecidos en la normativa, minimizar el impacto ambiental negativo y reducir costes operacionales en la explotación de las EDAR.

El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral ha sido el estudio a escala de laboratorio del proceso de eliminación de nitrógeno vía nitrito, para eliminar el amonio de la corriente del sobrenadante procedente de la deshidratación de fangos estabilizados mediante digestión anaerobia.

Inicialmente, se estudiaron diversas estrategias para optimizar la puesta en marcha del proceso SHARON operado para la nitrificación parcial. Tras alcanzar un funcionamiento estable del proceso, se empleó biomasa procedente de este reactor para estudiar el efecto de diversos factores ambientales y de operación sobre los organismos amonioxidantes (AOB) y la calidad del efluente

del reactor SHARON, respectivamente. Este estudio se realizó mediante experimentos respirométricos, los cuales permitieron conocer y cuantificar la influencia de estos factores ambientales y de operación sobre el rendimiento y la estabilidad del proceso SHARON. Los resultados del estudio se recogen y discuten en este documento de tesis doctoral.

Posteriormente, se estudiaron diversas estrategias para optimizar la puesta en marcha del proceso SHARON operado para la nitrificación y desnitrificación vía nitrito, empleando una fuente externa de materia orgánica. A partir del análisis de la información aportada por los sensores de pH, potencial redox y oxígeno disuelto instalados en el reactor, y su relación con las concentraciones de los compuestos nitrogenados durante las etapas de puesta en marcha y seguimiento del proceso biológico, se desarrolló una estrategia de monitorización mediante la cual se establecieron los criterios de funcionamiento óptimo del proceso. Esta información fue empleada para desarrollar un sistema de control, basado en lógica difusa, utilizando sensores de pH y potencial redox para optimizar los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en un reactor SHARON.

El sistema de control desarrollado integra dos algoritmos de control independientes que permiten optimizar la duración de las etapas aerobias y anóxicas de cada ciclo de operación y, optimizar la dosificación de materia orgánica. El primero de los algoritmos permite ajustar de manera automática y optimizada la duración de las etapas aerobia y anóxica a partir del análisis en tiempo real de la evolución del perfil de pH en cada etapa, mientras que el segundo algoritmo emplea la información aportada por los sensores de pH y potencial redox para el control de la dosificación de materia orgánica al inicio de la etapa anóxica en cada ciclo de operación.

En este documento de tesis doctoral se describe el desarrollo, implementación y validación del sistema de control en un reactor SHARON alimentado con sobrenadante sintético cuyas características reproducen la composición típica del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos, y con sobrenadante deshidratado de la digestión anaerobia de fangos procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia).

Los resultados de funcionamiento obtenidos tras la implementación y validación del sistema de control ponen de manifiesto que es posible el control automático y en tiempo real del proceso de eliminación de nitrógeno vía nitrito con sensores robustos y de bajo coste, y que tiene como principal ventaja la flexibilidad y capacidad de adaptarse en tiempo real a las características de la corriente afluente y al estado del proceso.

RESUM

El creixement accelerat dels nuclis urbans, l'explotació inadequada dels recursos naturals i la sensibilització i conscienciació de la societat envers a la qualitat ambiental, han posat de manifest la necessitat de desenvolupar i implementar tecnologies enfocades a prevenir, mitigar, corregir i compensar els greus problemes de contaminació d'origen antropogènic. Un dels problemes que presenta especial interès en l'actualitat és el tractament que ha de donar-se a les aigües residuals en funció de la seua destinació i tenint en compte la seua possible reutilització abans del seu abocament.

A nivell legislatiu, la Directiva 2000/60/EC del Parlament Europeu i el Consell d'Europa estableix un marc comunitari d'acció en l'àmbit de la política de l'aigua, i en quant a depuració d'aigua es refereix, la Directiva 91/271/EC estableix els límits d'abocament de contaminants procedents de les estacions de depuració d'aigua residual (EDAR), i introdueix el concepte de *zones sensibles*, en el qual s'estableix la importància d'eliminar nutrients, especialment nitrogen i fòsfor, de les aigües residuals, degut al seu impacte negatiu sobre els ecosistemes aquàtics.

Diversos estudis han posat de manifest la possibilitat d'optimitzar el funcionament de les EDAR mitjançant processos que permeten eliminar el nitrogen amoniacal via nitrit de corrents d'aigua residual amb elevada concentració d'amoni, com és el cas del corrent del sobrenedant deshidratat procedent de la digestió anaeròbia de fangs. La investigació també ha abordat la millora en la instrumentació i l'anàlisi del procés, promovent el desenvolupament de metodologies i estratègies que permeten monitoritzar, controlar i automatitzar en temps real el funcionament dels processos de nitrificació i desnitrificació via nitrit, per tal de complir els requisits d'abocament establerts en la normativa, minimitzar l'impacte ambiental negatiu i reduir costos operacionals en l'explotació de les EDAR.

L'objectiu fonamental d'aquest treball de tesi doctoral ha sigut l'estudi a escala de laboratori del procés d'eliminació de nitrogen via nitrit, per tal de eliminar l'amoni del corrent del sobrenadant de la deshidratació de fangs estabilitzats mitjançant digestió anaeròbia.

Inicialment, es van estudiar diverses estratègies per a l'engegada del procés SHARON operat per a la nitrificació parcial. Després d'aconseguir un funcionament estable del procés, es va utilitzar biomassa procedent d'aquest reactor per tal d'estudiar l'efecte de diversos factors ambientals i d'operació sobre els organismes amonioxidants (AOB) i la qualitat de l'efluent del reactor SHARON, respectivament. Aquest estudi es va realitzar mitjançant experiments respiromètrics, els quals van permetre conèixer i quantificar la influència d'aquests factors ambientals i d'operació

sobre el rendiment i l'estabilitat del procés SHARON. Els resultats de l'estudi s'arreglen i discuteixen en aquest document de tesi doctoral.

Posteriorment, es van estudiar diverses estratègies per a l'engegada del procés SHARON operat per a la nitrificació i desnitrificació via nitrit, emprant una font externa de matèria orgànica. A partir de l'anàlisi de la informació aportada pels sensors de pH, potencial redox i oxigen dissolt instal·lats en el reactor, i la seua relació amb les concentracions dels compostos nitrogenats durant les etapes d'engegada i seguiment del procés biològic, es va desenvolupar una estratègia de monitoratge mitjançant la qual es van establir els criteris de funcionament òptim del procés. Aquesta informació va ser emprada per a desenvolupar un sistema de control, basat en lògica difusa, utilitzant sensors de pH i potencial redox per a optimitzar els processos de nitrificació i desnitrificació via nitrit en un reactor SHARON.

El sistema de control desenvolupat integra dos algorismes de control independents que permeten optimitzar la durada de les etapes aeròbiques i anòxiques de cada cicle d'operació i, optimitzar el dosatge de matèria orgànica. El primer dels algorismes permet ajustar de manera automàtica la durada de les etapes aeròbiques i anòxiques a partir de l'anàlisi en temps real de l'evolució del perfil de pH en cada etapa, mentre que el segon algoritme utilitza la informació aportada pels sensors de pH i potencial redox per al control del dosatge de matèria orgànica a l'inici de l'etapa anòxica en cada cicle d'operació.

En aquest document de tesi doctoral es descriu el desenvolupament, implementació i validació del sistema de control en un reactor SHARON alimentat amb sobrenedant sintètic les característiques del qual reproduïxen la composició típica del sobrenedant de la digestió anaeròbia de fangs, i amb sobrenedant deshidratat de la digestió anaeròbia de fangs procedent de la EDAR del Barranc del Carraixet (València).

Els resultats de funcionament obtinguts després de la implementació i validació del sistema de control posen de manifest que és possible el control automàtic i en temps real del procés d'eliminació de nitrogen via nitrit amb sensors robusts i de baix cost, i que té com a principal avantatge la flexibilitat i capacitat d'adaptar-se en temps real a les característiques l'afluent i a l'estat del procés.

SUMMARY

The increasing urban growth, the unsustainable use of the natural resources and the society awareness of the environmental impact, highlight the necessity to develop and implement advanced technologies aimed to prevent, mitigate, correct and offset the pollution problems derived from anthropogenic origin. Currently, one key environmental problem is the wastewater treatment to be applied depending on its discharging place and taking into account its possible reuse before its discharge.

With regard to legislation, the Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of Europe provides a framework for community action in the water policy field. Specifically for wastewater treatment, the Directive 91/271/EC establishes the discharging limits of pollutants from wastewater treatment plants (WWTPs), and defines the concept of “sensitive areas”, which denotes the importance of removing nutrients from wastewater, in particular nitrogen and phosphorus, due to their negative impact on the aquatic ecosystems.

Several studies have shown the possibility of optimizing WWTP operation by means of processes that allow removing nitrogen via nitrite from wastewater streams with high ammonium concentration, such as the supernatant from anaerobic sludge digestion. The scientific community has also tackled the improvement of the instrumentation and process assessment related to nitrification and denitrification via nitrite. In this respect, different methodologies and strategies have been developed to monitor, control and automate in real time the operation of these processes in order to: fulfill the discharge requirements established in the legislation; minimize the negative impact to the environmental; and reduce operational costs in WWTP operation.

The main objective of this PhD thesis has been to study, at laboratory scale, the nitrogen removal process via nitrite in order to reduce the ammonium concentration in the supernatant from anaerobic sludge digestion.

Initially, several starting-up strategies for the so-called SHARON reactor have been studied in order to achieve a proper partial nitritation process. After achieving a stable process operation, activated sludge was withdrawn from the partial nitritation SHARON reactor to study the effect of several environmental and operating factors on the ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and on the effluent quality of the SHARON reactor, respectively. Respirometric batch experiments were carried out in order to determine and quantify the effect of these environmental and operating

factors on the performance and stability of the SHARON process. These results are included and discussed in this PhD thesis.

Subsequently, several starting-up strategies for the SHARON reactor have been studied in order to achieve a suitable nitrification and denitrification process via nitrite, using organic matter as external carbon source. On the basis of the information provided by pH, redox potential and dissolved oxygen sensors installed in the reactor, and their correlations found with the nitrogenous compounds concentrations throughout the stages of the start-up and process operating periods, a monitoring strategy was developed in order to establish the criteria of optimum process operation. This information was used to develop a fuzzy-logic-based control system based on pH and redox potential sensors, which main aim was to optimise the nitrification and denitrification process via nitrite in a SHARON reactor.

The developed controller includes two independent control algorithms to optimize both aerobic and anoxic stage durations of each operation cycle, and organic matter dosage. The first algorithm commands in real time the optimal aerobic and anoxic stage durations using the pH evolution profile in each stage, whereas the second algorithm controls the organic matter dosage at the beginning of the anoxic stage in each operation cycle based on the information provided by pH and redox potential sensors.

In this PhD thesis the development, implementation and validation of the control system in a SHARON reactor fed with synthetic supernatant whose composition is similar to the supernatant from anaerobic sludge digestion, and with supernatant from the anaerobic sludge digestion of the Carraixet WWTP (Valencia) are described.

The results from the control system performance after its implementation and validation have shown that it is possible to control automatically in real time the nitrogen removal via nitrite using robust and low-cost sensors. The main novelty of the control system lies on its flexibility and capacity to real-time adaptation to variations in both wastewater influent characteristics and process state.

ÍNDICE

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	El Nitrógeno.....	4
1.1.1	<i>El ciclo del Nitrógeno.....</i>	4
1.1.2	<i>La contaminación de las aguas por compuestos nitrogenados.....</i>	6
1.1.2.1	Disminución de los niveles de oxígeno disuelto	7
1.1.2.2	Eutrofización.....	8
1.1.2.3	Acidificación	8
1.1.2.4	Toxicidad de los compuestos nitrogenados	9
1.1.3	<i>Legislación Ambiental</i>	11
1.2	Eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales	13
1.2.1	<i>Procesos convencionales de eliminación de nitrógeno</i>	14
1.2.1.1	Nitrificación y desnitrificación vía nitrato.....	14
1.2.1.2	Esquemas de tratamiento y características de aplicación	18
1.2.2	<i>Procesos no convencionales de eliminación de nitrógeno</i>	24
1.2.2.1	Nitrificación y desnitrificación vía nitrito. Características del proceso SHARON	31
1.2.2.2	Oxidación anaerobia de amonio. Características del proceso ANAMMOX	33
1.2.2.3	Nitritación parcial combinada con oxidación anaerobia de amonio	35
1.2.2.4	Nitrificación y desnitrificación simultánea. Características del proceso SND	37
1.2.2.5	Potenciación de organismos nitrificantes. Características del proceso BABE	38
1.2.3	<i>Microbiología asociada a la eliminación biológica del nitrógeno</i>	40
1.2.3.1	Características de los organismos amonioxidantes (AOB).....	42
1.2.3.2	Características de los organismos nitritoxidantes (NOB).....	43
1.2.3.3	Características de los organismos desnitrificantes.....	45
1.2.3.4	Identificación y cuantificación bacteriana mediante la técnica de hibridación in situ FISH	46
1.3	Monitorización y control de los procesos de tratamiento de aguas residuales	47
1.3.1	<i>Sistema de control basado en la lógica difusa</i>	51
1.3.1.1	Estructura y diseño de un sistema de control basado en lógica difusa	53
1.3.1.2	Calibración y validación de un sistema de control basado en lógica difusa	57
1.3.2	<i>Control automático de los procesos de eliminación biológica de nitrógeno.....</i>	58
2	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	65
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
3.1	Descripción de los montajes experimentales.....	71
3.1.1	<i>Reactores para la nitritación parcial y para la nitrificación y desnitrificación vía nitrito.....</i>	72
3.1.2	<i>Reactor empleado en los experimentos puntuales</i>	73
3.2	Procedimiento experimental.....	74
3.2.1	<i>Estudio del proceso de nitritación parcial</i>	75

3.2.1.1	Puesta en marcha del proceso	76
3.2.1.2	Efecto de la concentración de amonio y amoníaco sobre la actividad de los organismos AOB	77
3.2.1.3	Efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB	79
3.2.1.4	Efecto de la concentración de nitrito y ácido nitroso sobre la actividad de los organismos AOB	79
3.2.1.5	Efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB	80
3.2.1.6	Efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB.....	81
3.2.1.7	Efecto del tiempo de retención hidráulico sobre las características del efluente.....	82
3.2.2	<i>Estudio del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.....</i>	<i>82</i>
3.2.2.1	Puesta en marcha del proceso	82
3.2.2.2	Monitorización y control automático del proceso	84
3.3	Métodos analíticos y microbiológicos	86
3.3.1	<i>Métodos de análisis de contaminantes en las aguas residuales</i>	<i>86</i>
3.3.1.1	Amonio, nitrito, nitrato y ortofosfato.....	86
3.3.1.2	Nitrógeno total	86
3.3.1.3	Sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles.....	86
3.3.1.4	Alcalinidad	86
3.3.1.5	Demanda química de oxígeno	87
3.3.2	<i>Técnicas microbiológicas y moleculares.....</i>	<i>87</i>
3.3.2.1	Técnica de hibridación in situ FISH	87
3.3.2.2	Técnica de viabilidad celular.....	91
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
4.1	ESTUDIO DEL PROCESO SHARON DE NITRITACIÓN PARCIAL	95
4.1.1	<i>Puesta en marcha y seguimiento de la evolución del proceso</i>	<i>95</i>
4.1.1.1	Puesta en marcha I: incremento progresivo de la concentración de N-amoniaco	96
4.1.1.2	Puesta en marcha II: arranque del proceso con alta concentración de N-amoniaco	100
4.1.2	<i>Efecto de los factores ambientales y de operación sobre la actividad de los organismos AOB y las características del efluente del proceso.....</i>	<i>103</i>
4.1.2.1	Efecto de la concentración de amonio y amoníaco sobre la actividad de los organismos AOB	105
4.1.2.2	Efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB.....	109
4.1.2.3	Efecto de la concentración de nitrito y ácido nitroso sobre la actividad de los organismos AOB ..	115
4.1.2.4	Efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB	118
4.1.2.5	Efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB.....	122
4.1.2.6	Efecto del tiempo de retención hidráulico sobre las características del efluente del proceso	127
4.1.3	<i>Criterios y recomendaciones para la puesta en marcha y operación estable de un proceso de nitrificación parcial</i>	<i>134</i>
4.2	ESTUDIO DEL PROCESO SHARON DE NITRITACIÓN Y DESNITRITACIÓN.....	139
4.2.1	<i>Puesta en marcha y seguimiento de la evolución del proceso</i>	<i>139</i>
4.2.1.1	Puesta en marcha I: temperatura 30°C e inóculo procedente de un proceso de nitrificación parcial.....	139
4.2.1.2	Puesta en marcha II: temperatura 30°C e inóculo procedente de un proceso de fangos activados	142

4.2.1.3 Puesta en marcha III: temperatura 35°C e inóculo procedente de un proceso de fangos activados	144
4.2.2 <i>Monitorización del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito</i>	145
4.2.2.1 Análisis de la información proporcionada por las sondas instaladas	146
4.2.2.2 Desarrollo de una estrategia de monitorización del proceso	158
4.2.3 <i>Control del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito</i>	167
4.2.3.1 Control automático de la duración de las etapas aerobia y anóxica	167
4.2.3.2 Control automático de la dosificación de materia orgánica	170
4.2.3.3 Implementación de la estrategia de control.....	183
4.2.3.4 Validación del sistema de control.....	188
5 CONCLUSIONES	203
6 DESARROLLOS FUTUROS	211
7 BIBLIOGRAFÍA.....	215

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Procesos naturales y antropogénicos involucrados en el ciclo del nitrógeno	4
Figura 1.2 Formas en las que se encuentra el nitrógeno en las aguas residuales.	7
Figura 1.3. Transformaciones del nitrógeno mediante los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato.....	15
Figura 1.4. Configuraciones de procesos de fangos activados comúnmente empleadas para la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales.	21
Figura 1.5. Ciclo de operación de un reactor secuencial (SBR) con eliminación de N-amoniaco. Durante la segunda fase anóxica el nitrato producido en la primera fase aerobia es reducido mediante la adición de una fuente de carbono externa. La última fase aerobia permite desabsorber el N ₂ antes de la fase de sedimentación.	22
Figura 1.6. Configuración de procesos de fangos activados de cultivo múltiple para la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales.	23
Figura 1.7. Transformaciones del nitrógeno amoniacal vía nitrito y vía nitrato en el agua residual.	26
Figura 1.8. Diagrama de flujo de una EDAR con digestión anaerobia de fangos en el que se incluye la representación porcentual del flujo de nitrógeno sobre la línea de agua y la línea de fango	30
Figura 1.9 Esquemas del proceso SHARON con desnitrificación heterotrófica: a) operación en un único reactor mediante ciclos de aireación intermitente, y b) operación en dos reactores independientes, el primero en condiciones aerobias y el segundo en condiciones anóxicas.	33
Figura 1.10. Posibles rutas metabólicas para el proceso de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX)..	34
Figura 1.11. Combinación de los procesos de nitrificación parcial y oxidación anaerobia de amonio en reactores independientes: SHARON y ANAMMOX.	36
Figura 1.12. Esquema del perfil de dos flóculos microbianos de diferente tamaño en donde se indica la diferenciación entre la zona aerobia y la zona anóxica de acuerdo con la difusión del oxígeno disuelto a través del flóculo.	37
Figura 1.13. Diagrama de flujo de una EDAR con potenciación de organismos nitrificantes en un reactor BABE.	40
Figura 1.14. Árbol filogenético de los tres dominios de la vida. Cuanto más cerca se encuentran las ramas de dos organismos, más próximos se encuentran en términos de evolución.	40
Figura 1.15. Árbol filogenético hasta ahora conocido de los organismos amonioxidantes basado en la secuencia 16S rRNA (Seviour y Nielsen, 2010).	43
Figura 1.16. Árbol filogenético hasta ahora conocido de los organismos nitritoxidantes basado en la secuencia 16S rRNA.....	44
Figura 1.17 Secuencia de reducción desde nitrato hasta nitrógeno gaseoso.....	45
Figura 1.18. Procedimiento general para el diseño de sistemas de control en EDAR (Olsson et al., 2005). ...	49
Figura 1.19. Estructura de un sistema de control por retroalimentación.....	50
Figura 1.20. Estructura de un sistema de control anticipativo	50
Figura 1.21. Estructura de un sistema de control mixto (anticipativo + retroalimentación).....	50
Figura 1.22. Estructura básica de un algoritmo de control basado en lógica difusa.....	53
Figura 1.23. Fuzzificación de la variable de entrada “apertura de válvula”.....	54
Figura 1.24. Etapas de calibración y validación de un sistema de control basado en lógica difusa.	58
Figura 3.1. a) Esquema y b) fotografía del montaje experimental para el proceso SHARON.	72
Figura 3.2. a) Esquema y b) fotografía del montaje experimental para los experimentos puntuales.	74
Figura 3.3. Esquema general del procedimiento experimental.	75

Figura 3.4. Diagrama de la secuencia seguida para la preparación de la muestra.	78
Figura 3.5. Árbol de clasificación filogenético para las especies de organismos AOB (a) y NOB (b) relacionadas principalmente con la depuración de aguas residuales.....	90
Figura 4.1. Microfotografía FISH mostrando la presencia de organismos amonioxidantes β -proteobacteria (color rosa) usando la sonda NSO190, frente al total de bacterias (sonda EUB mix), en (a) el inóculo utilizado para la puesta en marcha I, y (b) el inóculo empleado en la puesta en marcha II. Imágenes tomadas a 63x.	96
Figura 4.2. Evolución de las concentraciones de los compuestos nitrogenados (a), alcalinidad y pH (b) en las corrientes afluente y efluente al proceso de nitrificación parcial (SHARON) durante la puesta en marcha I	98
Figura 4.3. Microfotografía FISH mostrando la presencia de organismos AOB β -proteobacteria (color rosa) usando la sonda NSO190, frente al total de bacterias (sonda EUB mix) para el día 57 de la puesta en marcha I. Imágenes tomadas a 63x.....	99
Figura 4.4. Evolución de las concentraciones de los compuestos nitrogenados (a), alcalinidad y pH (b) en las corrientes afluente y efluente al proceso de nitrificación parcial, durante la puesta en marcha II.	101
Figura 4.5. Evolución de los compuestos nitrogenados en la corriente efluente del proceso SHARON de nitrificación parcial R1.	104
Figura 4.6. Microfotografía FISH mostrando la presencia de organismos AOB β -proteobacteria (color rosa) usando la sonda NSO190, frente al total de bacterias (sonda EUB mix) para el día 650 de operación. ...	104
Figura 4.7. Evolución de la OUR para cada concentración de amonio empleada en el experimento 3 realizado a pH 7.0.....	106
Figura 4.8. Evolución de la OUR y la concentración de amonio en los experimentos realizados para evaluar el efecto de la concentración de amonio y amoniaco sobre la actividad de los organismos AOB.	107
Figura 4.9. Actividad de los organismos AOB expresada como %OUR máxima frente a la concentración de amonio(a y c) y amoniaco (b y d).	109
Figura 4.10. Resultados del experimento 1 en donde se evaluó el efecto de la concentración molar de cloruro de sodio (NaCl) sobre la actividad bacteriana (medida como OUR) a pH 7 y 30°C	111
Figura 4.11. Resultados del experimento 3 en donde se evaluó el efecto de la concentración molar de nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃) sobre la actividad bacteriana (medida como OUR) a pH 7 y 30°C.....	111
Figura 4.12. Evolución de la OUR y la salinidad (M) en los experimentos realizados para evaluar el efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB.....	112
Figura 4.13. Actividad de los organismos AOB expresada como % OUR frente a la salinidad.....	113
Figura 4.14. Evolución de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) para cada concentración de nitrito empleada en los experimentos realizados a pH 6.25, 6.50 y 7.00.	116
Figura 4.15. Actividad de los organismos AOB medida como porcentaje de OUR frente a la concentración de: (a) nitrito (N-NO ₂ -) y (b) ácido nitroso (N-HNO ₂).	117
Figura 4.16. Resultados del experimento 9: a) Evolución de la OUR en cada nivel de pH evaluado a lo largo del experimento, b) OUR normalizada respecto de su valor máximo frente al pH en este experimento.	119
Figura 4.17. Evolución de la OUR normalizada respecto de su valor máximo (%OUR) frente al pH en los experimentos realizados para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB	120
Figura 4.18. Actividad de los organismos AOB normalizada (%OUR) frente al pH para todos los experimentos.....	121
Figura 4.19. Efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB	123
Figura 4.20. Actividad de los organismos AOB, normalizada y expresada como %OUR, frente a la temperatura. Experimentos 1 y 2 realizados con fango aclimatado a 30°C, y experimentos 3 y 4 realizados con fango aclimatado a 35°C.	124

Figura 4.21. Resultados de los ajustes de los modelos a los resultados experimentales obtenidos en los experimentos de barrido de temperatura: a) Arrhenius y b) Ratkowsky.....	125
Figura 4.22. Actividad de los organismos AOB, normalizada y expresada como %OUR, frente a la temperatura. Experimentos: a) 30°C; b) 35°C; c) 40°C y d) 45°C.	126
Figura 4.23. Viabilidad celular determinada en el experimento realizado a 40°C. Porcentaje de bacterias no viables: a) al inicio del experimento (12±5%) y (b) al final del experimento (23±6%). Imágenes tomadas a 63x.	127
Figura 4.24. Evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados (a); Sólidos Suspendidos Totales, SST y Sólidos Suspendidos Volátiles, SSV (b); alcalinidad y pH (c) durante la operación del proceso de nitrificación parcial R2.....	131
Figura 4.25. Relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ obtenida en la corriente efluente del proceso SHARON de nitrificación parcial a diferentes valores de TRH, TRC y temperatura.....	133
Figura 4.26. Evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados durante la puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito empleando como inóculo fango activado procedente de un reactor SHARON de nitrificación parcial.	139
Figura 4.27. Evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados durante la puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito empleando como inóculo fango activado procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia). Temperatura de operación 30°C.....	142
Figura 4.28. Evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados durante la puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito empleando como inóculo fango activado procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia). Temperatura de operación 35°C.....	144
Figura 4.29. Perfiles típicos de la concentración de los compuestos nitrogenados y los registros on-line de pH y potencial redox en un ciclo operación.	148
Figura 4.30. Evolución de los perfiles de pH y potencial redox en dos ciclos de operación en los que el nitrito se agotó cuando el pH se estabilizó, pero no se observó el punto de inflexión en el perfil del potencial redox.....	149
Figura 4.31. Evolución de un perfil de pH durante las etapas aerobia y anóxica de un ciclo de operación en el que se muestra la forma de calcular las variables ΔpHAE y ΔpHAX	150
Figura 4.32. a) Relación entre el descenso de pH durante la etapa aerobia (ΔpHAe) y la concentración de nitrógeno amoniacal en el afluente del proceso; b) Relación entre el descenso de pH durante la etapa aerobia (ΔpHAe) y el correspondiente incremento de pH durante la siguiente etapa anóxica (ΔpHAX) en cada ciclo de operación.	150
Figura 4.33 a) Evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante dos ciclos de operación en los que se adicionó exceso de metanol al inicio de las etapas anóxicas de cada ciclo (C1 y C2); b) Evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante la primera hora de operación del ciclo 2.	153
Figura 4.34. Evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante un ciclo de operación en el que hubo un déficit de materia orgánica tras la primera adición de metanol.	155
Figura 4.35. Evolución de los perfiles de potencial redox y oxígeno disuelto (OD) durante un ciclo de operación en el que se produjo un fallo en la medida de oxígeno disuelto en el reactor.	156
Figure 4.36. Evolución de los perfiles de pH y potencial redox en un ciclo de operación con adición de metanol durante la etapa aerobia.....	157
Figura 4.37. Evolución de los perfiles de pH, potencial redox y oxígeno disuelto en un ciclo de operación con excesiva agitación.....	158
Figura 4.38. Monitorización del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación a partir de la evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante las etapas aerobia y anóxica.....	160
Figura 4.39. Evolución del pH a lo largo de un ciclo de operación junto con: (a) la evolución de las concentraciones de los compuestos nitrogenados y (b) pendiente móvil de pH (pHMS) y promedio de la pendiente móvil de pH (pHAMS) durante las etapas aerobia y anóxica de un ciclo de operación.....	169

Figura 4.40 Etapas que integran el sistema de control basado en lógica difusa desarrollado para optimizar la dosificación de materia orgánica.....	172
Figura 4.41. Variables de entrada al sistema de control.....	172
Figura 4.42. Evolución del perfil de potencial redox frente a: (a) perfil de la pendiente móvil del potencial redox (ORPMS) y (b) perfil del cociente entre ORPMS del instante actual (t) y ORPMS anterior (t-1). ...	174
Figura 4.43. Relación entre la concentración de nitrito y el potencial redox medidos al final de la etapa anóxica en múltiples ciclos de operación del proceso SHARON.	176
Figura 4.44. Funciones de pertenencia para las variables de entrada al sistema de control: a) t_{bpORP} ; b) Δt_{bpORP} ; c) ΔpH ; d) ORP_{pendAx}	178
Figura 4.45. Centros (C) de las etiquetas lingüísticas de desfuzzificación.....	182
Figura 4.46. Esquema de la estrategia de control para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.	185
Figura 4.47. Interfaz del sistema de control desarrollado a partir de la cual se introducen y modifican los valores de los parámetros del sistema de control desarrollado para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.....	186
Figura 4.48. Interfaz del sistema de control desarrollado a partir de la cual se introducen y modifican los valores de los parámetros difusos del control de la dosificación de materia orgánica en el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.	187
Figura 4.49. Evolución de las concentraciones de los compuestos nitrogenados medidos en las corrientes afluente y efluente del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito durante la validación del sistema de control.....	190
Figura 4.50. Evolución del proceso con sistema de control (día 110 de operación): a) perfil de pH y materia orgánica dosificada, b) perfiles de potencial redox y oxígeno disuelto (OD) y t_{bpORP}	194
Figura 4.51. Evolución del proceso sin sistema de control (día 140 de operación): a) perfil de pH y materia orgánica dosificada, b) perfiles de potencial redox y oxígeno disuelto (OD).	196
Figura 4.52. Evolución de los perfiles de pH y potencial redox y materia orgánica dosificada durante los ciclos realizados en los días 264 y 265 de operación (Período IX).....	200

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Compuestos nitrogenados inorgánicos en ecosistemas terrestres y acuáticos.	5
Tabla 1.2. Efectos ecológicos y toxicológicos de la eutrofización de los ecosistemas acuáticos.	8
Tabla 1.3. Efectos adversos de la acidificación de los ecosistemas acuáticos	9
Tabla 1.4. Requisitos para el vertido de nitrógeno a zonas sensibles procedente de instalaciones de tratamiento de agua residual urbana (Directiva 91/271/CEE).	12
Tabla 1.5. Coeficientes de consumo de oxígeno y alcalinidad en el proceso de nitrificación.	17
Tabla 1.6. Comparación teórica entre la eliminación biológica de nitrógeno vía nitrito y vía nitrato.	27
Tabla 1.7. Estrategias de control diseñadas para la eliminación biológica de nitrógeno vía nitrato de las aguas residuales.	62
Tabla 3.1. Características de los reactores utilizados para el proceso SHARON.	71
Tabla 3.2. Características del afluente al proceso de nitrificación parcial.	76
Tabla 3.3. Puestas en marcha del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.	83
Tabla 3.4. Características del afluente al proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en las puestas en marcha II y III.	84
Tabla 3.5. Características del sobrenadante deshidratado de la digestión anaerobia de fangos de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia) que fue utilizado como afluente al proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para la validación del sistema de control.	85
Tabla 3.6. Sondas de hibridación empleadas en la identificación de AOB, NOB y desnitrificantes.	88
Tabla 4.1. Condiciones de operación del proceso de nitrificación parcial SHARON: puesta en marcha I.	97
Tabla 4.2. Condiciones de operación del proceso de nitrificación parcial SHARON: puesta en marcha II.	100
Tabla 4.3. Concentraciones de amonio empleadas en la evaluación del efecto del amonio y amoniaco sobre la actividad de los organismos AOB.	105
Tabla 4.4. Concentraciones de sales empleadas en el estudio del efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB.	110
Tabla 4.5. Concentraciones de nitrito empleadas en el estudio del efecto del nitrito y ácido nitroso sobre la actividad de los organismos AOB.	115
Tabla 4.6. Concentraciones iniciales de amonio y nitrito empleadas en cada uno de los experimentos realizados para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB.	118
Tabla 4.7. Constantes de inhibición y pH óptimo obtenido del ajuste de la ecuación 4.6 a los resultados experimentales mostrados en la Figura 4.18.	122
Tabla 4.8. Parámetros empleados en el ajuste de los modelos de Arrhenius y Ratkowsky a los datos experimentales obtenidos en los ensayos de barrido de temperatura.	125
Tabla 4.9. Características de operación del reactor SHARON de nitrificación parcial R_2 para estudiar el efecto del TRH sobre el rendimiento y estabilidad del proceso.	128
Tabla 4.10. Monitorización del estado y la evolución con el tiempo de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en un reactor SHARON a partir del seguimiento de los perfiles de pH y potencial redox.	159
Tabla 4.11. Parámetros de centro (c) y ancho (σ) que definen las funciones de pertenencia de cada variable física de entrada (p).	177
Tabla 4.12. Etiquetas lingüísticas definidas para las variables de entrada al sistema de control.	177
Tabla 4.13. Reglas lingüísticas definidas para el sistema de control de la dosificación de materia orgánica externa.	180
Tabla 4.14. Valores de los parámetros de seguridad y de cálculo interno empleados en el sistema de control del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.	184

Tabla 4.15. Valores de los parámetros de fuzzificación del sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.....	187
Tabla 4.16. Valores de los parámetros de desfuzzificación del sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.....	187
Tabla 4.17. Condiciones experimentales evaluadas en la validación del sistema de control para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.	189
Tabla 4.18. Características de las corrientes de agua residual empleadas en la validación del sistema de control para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.	189
Tabla 4.19. Valores de los parámetros de fuzzificación de la variable de entrada ORPfinalAX para la optimización de la dosificación de materia orgánica.	191
Tabla 4.20. Valores de los parámetros de desfuzzificación del sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.....	193
Tabla 4.21. Valores promedio de las concentraciones de los compuestos nitrogenados determinadas en la corriente efluente del reactor SHARON en los ciclos estables de operación de los períodos V al VIII en los que se alcanzó un porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito en torno al 98%.	197
Tabla 4.22. Valores promedio de la duración de las etapas aerobia y anóxica, y dosis de metanol en los ciclos estables de operación de los períodos V al VIII en los que se alcanzó un porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito en torno al 98%.....	197
Tabla 4.23. Valores de los parámetros de desfuzzificación del sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.....	199

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural esencial para la supervivencia de todas las formas de vida conocidas. La calidad de este recurso está cada día más degradada debido principalmente a acciones de origen antropogénico, derivadas de actividades de tipo doméstico, agrícola e industrial. La problemática ambiental que representa el vertido incontrolado de residuos líquidos y sólidos sobre medios acuáticos naturales como acuíferos, ríos y lagos, ha ocasionado que el tratamiento de las aguas residuales suscite especial interés debido a la necesidad cada vez más urgente de gestionar este foco de contaminación ambiental.

La depuración de las aguas residuales se centró inicialmente en reducir el contenido de sólidos suspendidos y de materia orgánica antes de su vertido al medio acuático receptor. Retirar los sólidos en suspensión de las aguas residuales es una práctica que mejora la estética del agua y favorece una mayor entrada de la luz a los ecosistemas acuáticos, factor ambiental indispensable para que se realicen los procesos fotosintéticos. Por otro lado, eliminar la materia orgánica presente en el agua residual antes de su vertido al medio receptor reviste importancia debido a que la oxidación biológica de la materia orgánica por parte de los microorganismos consume el oxígeno disuelto de estos ecosistemas, causando en la mayoría de los casos su agotamiento. Esta situación ocasiona pérdida de biodiversidad debido a que las características del ecosistema se alteran, por lo que las especies habitualmente presentes en él no pueden sobrevivir.

La mayoría de los contaminantes que al ser degradados biológicamente consumen el oxígeno disuelto de los cuerpos de agua receptores son compuestos orgánicos. Sin embargo, el nitrógeno amoniacal, compuesto inorgánico cada vez más abundante debido a su utilización en procesos industriales y actividades agrícolas, también es oxidado por vía biológica con consumo de oxígeno, lo que ha llevado a incluir procesos especializados que permitan su eliminación en las estaciones de depuración de agua residual.

El vertido de agua residual con alto contenido de nutrientes, principalmente nitrógeno en forma de nitrato, nitrito o amonio y fósforo en forma de ortofosfato, en ecosistemas acuáticos ha originado un problema concreto de contaminación de las aguas denominado *eutrofización*. Conforme aumenta la disponibilidad de nutrientes, se aumenta la producción fotosintética primaria, la cual se encuentra representada principalmente por la proliferación de microalgas. Este fenómeno causa un desequilibrio en el nivel de fertilidad acuática debido a que la velocidad de producción de los niveles tróficos inferiores es superior a la velocidad de consumo de los

niveles tróficos superiores, ocasionando trastornos en el equilibrio entre la biodiversidad, los niveles tróficos y los ciclos de nutrientes en los ecosistemas acuáticos afectados.

El establecimiento de leyes y normativas ambientales cada vez más restrictivas en cuanto a la calidad del agua residual tratada, contribuye a desarrollar e implementar tecnologías de tratamiento cada vez más especializadas, obligando a una mejora continua de los procesos de depuración de las aguas residuales.

1.1 El Nitrógeno

El nitrógeno es un elemento químico que existe en la naturaleza en forma orgánica e inorgánica, y se encuentra mayoritariamente disponible en la atmósfera principalmente en su forma diatómica (N_2), representando cerca del 78% (v/v) de la atmósfera terrestre. El nitrógeno forma parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) y de las proteínas, moléculas esenciales para el desarrollo de la vida. No obstante, su aprovechamiento por parte de la gran mayoría de los seres vivos depende de su disponibilidad en la naturaleza en formas asimilables, principalmente nitrógeno orgánico, amoníaco y nitrato.

1.1.1 El ciclo del Nitrógeno

En la Figura 1.1 se encuentran esquematizados los procesos naturales y antropogénicos implicados en el ciclo del nitrógeno. Las transformaciones de los compuestos nitrogenados en la biosfera dependen de las interrelaciones entre los componentes bióticos (microorganismos, plantas, animales y seres humanos) y abióticos (temperatura, pH, precipitación, características del suelo, y luz solar, entre otros) que integran cada uno de los ecosistemas involucrados, y posibilitan que estas transformaciones puedan ocurrir a través de varios mecanismos.

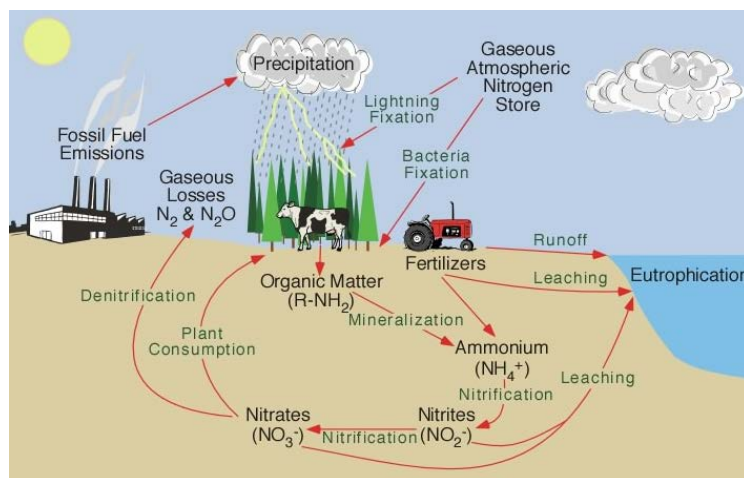


Figura 1.1 Procesos naturales y antropogénicos involucrados en el ciclo del nitrógeno (Pidwirny, 2006).

En su forma diatómica (N_2) el nitrógeno es un gas inerte, asimilable por un grupo reducido de microorganismos en consorcio con ciertas legumbres, los cuales se encargan de fijar este compuesto desde la atmósfera e incorporarlo en la cadena alimentaria de los seres humanos. Precisamente esta producción biológica fue catalogada como insuficiente a principios del siglo XX, e hizo necesaria la síntesis química del amoníaco mediante el proceso *Haber-Bosch*, que sumado al cultivo a gran escala de legumbres ocasionó que la cantidad de nitrógeno fijado anualmente desde la atmósfera de manera antropogénica superara en más de un 10% a la cantidad de nitrógeno fijado por los ecosistemas terrestres antes de la intensificación de la agricultura y la aplicación de los fertilizantes nitrogenados (U.S. EPA, 1993).

En las capas superficiales del suelo el nitrógeno suele estar presente en forma orgánica como consecuencia de la descomposición de residuos de animales y plantas, y mediante el proceso de mineralización éste es transformado biológicamente a nitrógeno amoniacal. El nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos y terrestres puede estar en diferentes formas de acuerdo a su estado de oxidación (Tabla 1.1), y son los procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación ocurridos en estos ecosistemas los principales responsables de los cambios de un estado de oxidación a otro. La forma ionizada y no ionizada de estos compuestos dependerá del pH y la temperatura.

Tabla 1.1. Compuestos nitrogenados inorgánicos en ecosistemas terrestres y acuáticos.

Forma no ionizada		Forma ionizada		Estado de oxidación
Amonio	NH_4^+	Amoníaco	NH_3	-3
Nitrito	NO_2^-	Ácido Nitroso	HNO_2	+3
Nitrato	NO_3^-	Ácido Nítrico	HNO_3	+5

La aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados sobre el suelo ha ocasionado un aumento significativo de la presencia de nitrógeno inorgánico en las capas inferiores del suelo y en cuerpos de agua superficiales, como consecuencia de los fenómenos de percolación y escorrentía, respectivamente. Esta situación ocasiona problemas de contaminación en las aguas de abastecimiento. Además, el vertido de aguas residuales urbanas e industriales, sin tratar o con tratamiento deficiente, sobre cuerpos de agua receptores contribuye a favorecer el proceso de eutrofización.

Las emisiones de nitrógeno a la atmósfera causada por el proceso de desnitrificación se han visto significativamente incrementadas por la combustión de fuentes fósiles de energía, alterando significativamente el ciclo global del nitrógeno. La producción de nitrógeno fue de 15 toneladas

en el año 1860, y se incrementó a 187 toneladas de nitrógeno en el año 2005 debido a la agricultura y el empleo de combustibles fósiles (Cervantes, 2009).

1.1.2 La contaminación de las aguas por compuestos nitrogenados

En los ecosistemas acuáticos el nitrógeno suele estar en forma inorgánica: amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Estos iones pueden estar presentes de manera natural en el agua como resultado de su movimiento y transformación a lo largo del ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Sin embargo, durante los dos últimos siglos el aporte de nitrógeno derivado de la actividad antropogénica ha incrementado su concentración en las corrientes de agua de manera considerable.

Las principales fuentes de contaminación antropogénica de las aguas por compuestos nitrogenados proceden de actividades de tipo agrícola, industrial y urbano. El uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados sobre terrenos de cultivo se ha constituido como una de las fuentes más importantes de aporte de nitrógeno inorgánico (NH_4^+ y NO_3^-) a las corrientes de agua superficial y subterránea, siendo los fenómenos de escorrentía y percolación los responsables de su movimiento a través del suelo. Tan sólo un 10-15% de la cantidad de fertilizante aplicada al suelo es empleada por las plantas e incorporado a la cadena alimentaria (Gijzen y Mulder, 2001).

Ciertas actividades de tipo industrial requieren compuestos nitrogenados como el amoníaco (NH_3) para la producción de materiales como el nailon, el plástico, las resinas, los explosivos y algunos complementos para la industria alimentaria. Los compuestos orgánicos nitrogenados como las aminas aromáticas suelen emplearse para la producción de colorantes, pesticidas y productos farmacéuticos. En el año 2005 cerca de 23 toneladas de nitrógeno fueron empleadas como materia prima para la industria, de las cuales muy poca información se tiene aún acerca del destino de los compuestos nitrogenados derivados de estas actividades (Cervantes, 2009). El vertido de aguas residuales industriales constituye un foco importante de contaminación de los cuerpos de agua receptores debido a las altas concentraciones de nitrógeno presentes en los efluentes industriales, que al no ser tratadas adecuadamente antes de su vertido, generan un impacto muy severo sobre los ecosistemas acuáticos receptores. Teniendo en cuenta el potencial tóxico de los compuestos nitrogenados procedentes de los efluentes industriales, el tratamiento por vía biológica se dificulta. En algunos casos estos contaminantes pueden ser de tipo recalcitrante, dificultando aún más la problemática de los ecosistemas acuáticos receptores debido a que la naturaleza hidrofóbica de algunos de estos compuestos les hace susceptibles de bioacumularse en organismos vivos, de forma que éstos alcanzan concentraciones más elevadas que las concentraciones en el medio ambiente.

El nitrógeno de las aguas residuales urbanas procede principalmente del metabolismo de las proteínas en el cuerpo humano, que constituyen un grupo numeroso de compuestos nitrogenados naturales. Casi todas las proteínas del organismo están en una constante dinámica de síntesis a partir de aminoácidos y de degradación a nuevos aminoácidos. Esta actividad ocasiona una pérdida diaria neta de nitrógeno, en forma de urea, eliminada del organismo mediante la orina.

El nitrógeno en las aguas residuales se puede encontrar en diferentes formas (N orgánico, NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-) y en concentraciones variables, siendo las formas orgánica y amoniacal las que predominan en la mayoría de los casos en las aguas residuales urbanas. A la suma del nitrógeno asociado a los compuestos orgánicos y el que se encuentra en forma amoniacal se le denomina *N-Kjeldahl*, y las formas de nitrito y nitrato se les conocen como *N-Nítrico*. Aproximadamente el 60% del nitrógeno presente en las aguas residuales urbanas se encuentra en forma orgánica, constituido principalmente por aminoácidos, proteínas y urea; mientras que el 40% restante se encuentra en forma inorgánica como amonio. En la Figura 1.2 se encuentra esquematizado las diversas formas en las que se encuentra el nitrógeno en las aguas residuales.

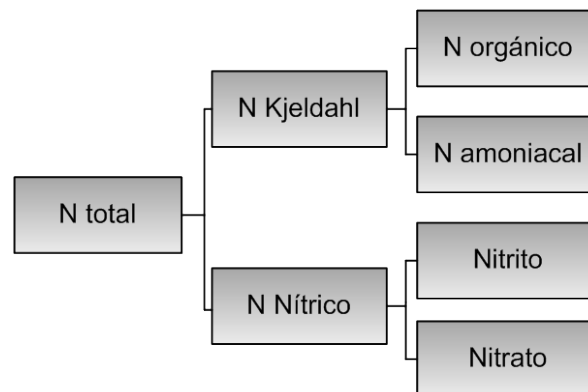


Figura 1.2 Formas en las que se encuentra el nitrógeno en las aguas residuales.

A continuación se describen los problemas ambientales más relevantes relacionados con la contaminación de las aguas por compuestos nitrogenados:

1.1.2.1 Disminución de los niveles de oxígeno disuelto

Los ecosistemas acuáticos receptores de vertidos de compuestos nitrogenados, principalmente nitrógeno orgánico biodegradable y nitrógeno amoniacal, experimentan una reducción de la concentración del oxígeno disuelto del medio como consecuencia de la oxidación biológica de dichos compuestos por parte de microorganismos. Esta reducción del oxígeno disuelto afecta

negativamente a los ecosistemas acuáticos convirtiéndolos en la mayoría de los casos en hábitats inhóspitos para el desarrollo y la supervivencia de los organismos aerobios.

1.1.2.2 Eutrofización

El proceso de eutrofización se define como la secuencia de cambios en los ecosistemas acuáticos causados por un incremento en el suministro de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. Altos niveles de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) en los ecosistemas acuáticos pueden estimular el desarrollo, el mantenimiento y la proliferación de los productores primarios, tales como fitoplancton, algas bentónicas y macrófitos, que contribuyen a la eutrofización. El fenómeno de la eutrofización puede causar efectos ecológicos y toxicológicos sobre el medio acuático y los organismos que habitan en él (Tabla 1.2), los cuales están relacionados de manera directa o indirecta con la proliferación de los productores primarios.

Tabla 1.2. Efectos ecológicos y toxicológicos de la eutrofización de los ecosistemas acuáticos (Camargo y Alonso, 2006).

-
- Reducción de la disponibilidad de luz debido a la disminución de la transparencia en la columna de agua.
 - Incremento de la cantidad de materia orgánica que sedimenta.
 - Reducción de la concentración de oxígeno en capas inferiores de la columna de agua.
 - Producción y acumulación de compuestos reducidos como el sulfuro de hidrógeno (H_2S) en aguas profundas y sedimentos.
 - Disponibilidad de fósforo por la degradación de la materia orgánica acumulada en los sedimentos.
 - Incremento de la biomasa y actividad del fitoplancton. Cambios en la composición del fitoplancton que pueden promover el desarrollo de especies tóxicas.
 - Incremento de la biomasa y cambios en la composición de especies macrófitas.
 - Incremento de la biomasa, productividad y cambios en la composición de comunidades de macroalgas marinas.
 - Pérdida de biodiversidad en especies y comunidades de fitoplancton, perifiton, macrófitas y macroalgas.
 - Incremento de la biomasa, productividad y composición de especies de zooplancton. Pérdida de biodiversidad debido al desarrollo de especies dominantes.
 - Incremento de la biomasa, productividad y composición de invertebrados benthicos y peces. Pérdida de la biodiversidad debido al desarrollo de especies dominantes. Degradación de las condiciones del hábitat para la reproducción.
 - Reducción de la biodiversidad y del tamaño de las poblaciones de coral marino.
 - Alteraciones de la cadena alimentaria que afectan todos los niveles tróficos.
-

1.1.2.3 Acidificación

El nitrógeno amoniacal puede contribuir a la acidificación como consecuencia del proceso biológico de nitrificación. Por otro lado, a nivel atmosférico, el óxido nitroso (N_2O) y el óxido nítrico (NO), comúnmente denominados NO_x , pueden contribuir a la acidificación de cuerpos de agua superficiales. Estos compuestos gaseosos experimentan reacciones químicas a nivel

atmosférico que llevan a la generación de lluvia ácida debido a la formación de ácido nitroso (HNO_2) y ácido nítrico (HNO_3), que al depositarse ocasionan la acidificación de ecosistemas acuáticos con baja capacidad de neutralización de ácidos. En la Tabla 1.3 se encuentran descritos los efectos adversos de la acidificación de los cuerpos de agua, intensificados a partir de la actividad humana.

Tabla 1.3. Efectos adversos de la acidificación de los ecosistemas acuáticos (Camargo y Alonso, 2006).

-
- Reducción de la capacidad fotosintética de las algas.
 - Se favorece la bioacumulación de aluminio (Al^{3+}) y otros metales traza en macrófitos acuáticos, insectos, crustáceos, peces y anfibios.
 - Proliferación de algas filamentosas verdes.
 - Reducción de la biodiversidad de especies y comunidades de fitoplancton y perifiton.
 - Desequilibrio en la regulación de iones que ocasiona pérdida de sodio (Na^+) y déficit para la asimilación de calcio (Ca^{2+}) en moluscos, insectos, crustáceos, peces y anfibios.
 - Perturbaciones respiratorias y metabólicas en moluscos, insectos, crustáceos y anfibios.
 - Desarrollo anómalo de embriones de peces y anfibios.
 - Retraso de la incubación de huevos de peces y anfibios.
 - Reducción del desarrollo de peces, anfibios y cladóceros.
 - Incremento de la migración de insectos acuáticos.
 - Deterioro de las zonas de desove de insectos, peces y anfibios.
 - Descenso de la biodiversidad de comunidades de zooplancton, macrobénticos, peces y anfibios.
 - Alteración de los procesos microbiológicos de nitrificación y desnitrificación implicados en el ciclo del nitrógeno.
-

1.1.2.4 Toxicidad de los compuestos nitrogenados

Elevadas concentraciones de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) son tóxicas para los organismos acuáticos debido a que perjudican su capacidad de sobrevivir, crecer y reproducirse. Asimismo, la exposición directa de los seres humanos a compuestos nitrogenados a través del agua o alimentos contaminados puede producir un deterioro de la salud e incluso la muerte. A continuación se encuentran descritos los efectos tóxicos más relevantes derivados de la presencia de compuestos de nitrógeno sobre los organismos acuáticos y sobre los seres humanos:

Efecto sobre los organismos acuáticos y animales:

Amoníaco. La forma no ionizada del amonio, el amoníaco (NH_3), es muy tóxica en organismos acuáticos, particularmente en peces, mientras que la forma ionizada (NH_4^+) parece ser menos nociva.

Algunos efectos toxicológicos de la contaminación por amoníaco son: asfixia debida a la destrucción del epitelio braquial; acidosis y reducción de la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre causada por la supresión del ciclo de Krebs y la estimulación de la glucólisis; inhibición

de la producción de ATP y descenso del ATP en el cerebro debido al desacople del proceso de fosforilación oxidativa; alteración de la actividad osmorreguladora del hígado y riñones; y alteración del sistema inmunológico.

Nitrito. Tanto la forma ionizada (nitrito, NO_2^-) como la no ionizada (ácido nitroso, HNO_2) son consideradas bastante tóxicas. Sin embargo, debido a que la concentración de nitrito suele ser mayor que la concentración de ácido nitroso en los ecosistemas acuáticos, los iones nitrito son considerados como los mayores responsables de esta toxicidad en organismos acuáticos y animales.

El efecto toxicológico de la presencia de nitrito puede ocasionar hipoxia y muerte de organismos acuáticos debido al desequilibrio de la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre. La incorporación de nitrito en las células sanguíneas promueve la conversión de la hemoglobina en metahemoglobina, molécula incapaz de transferir el oxígeno a los tejidos del cuerpo debido a su alta constante de disociación.

En ciertas especies acuáticas el nitrito puede causar el descenso de los niveles de cloruros (Cl^-) causando un desequilibrio electrolítico, y además contribuir en el descenso del potasio (K^+) intracelular que afecta al potencial de la membrana. La exposición al nitrito puede llevar a la formación de compuestos orgánicos mutagénicos y cancerígenos, y además puede llegar a ocasionar un desequilibrio del sistema inmunológico (Camargo y Alonso, 2006).

Nitrato. El nitrato es el segundo compuesto nitrogenado más abundante en los ecosistemas acuáticos después del amonio. Sus mecanismos de toxicidad son equivalentes a los del nitrito, debido fundamentalmente a que el nitrato es reducido a nitrito en el interior de los organismos vivos (Cheng y Chen, 2002). El nitrato presenta una menor toxicidad que el nitrito y el amoníaco como resultado de su baja permeabilidad, lo cual hace que su absorción a través de las branquias sea más limitada (Camargo y Alonso, 2006). A pesar de que tradicionalmente se ha considerado su toxicidad irrelevante (Camargo *et al.*, 2005), debido al uso de los fertilizantes nitrogenados en la agricultura se ha detectado cierta sensibilidad a la toxicidad por nitrato en especies de anfibios, peces e invertebrados. En los anfibios esta toxicidad está representada principalmente en la reducción de la habilidad para nadar, descenso del tamaño corporal, y reducción de la fecundidad y supervivencia de ciertas especies (Birge *et al.*, 2000).

Efecto sobre los seres humanos:

La ingestión directa de aguas contaminadas por nitrito y/o nitrato puede provocar metahemoglobinemia en los seres humanos, siendo los niños menores de cuatro meses los más

susceptibles a este tipo de enfermedad conocida como “*baby blue syndrome*”. Esta patología se caracteriza por la pérdida de la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre debido a que la hemoglobina se encuentra en su forma oxidada metahemoglobina, la cual tiene baja afinidad por el oxígeno. Mas de 3000 casos de metahemoglobinemia han sido reportados alrededor del mundo desde 1945, los cuales siempre han estado asociados con el consumo de agua proveniente de pozos con niveles de concentración de nitrato superior a 10 mg N L^{-1} (Wolfe y Patz, 2002).

El consumo de nitrito y nitrato puede favorecer la formación de compuestos nitrogenados como las nitrosaminas en el interior del cuerpo humano. Estos compuestos químicos resultantes de la reacción entre una amina secundaria y el nitrito en un medio ácido, generalmente en el estómago, tienen un alto potencial cancerígeno y mutagénico (U.S. EPA, 1993; Fwetrell, 2004). El nitrito y el nitrato están relacionados con casos de deformaciones en recién nacidos, infecciones en el tracto respiratorio y enfermedades coronarias, entre otras (Gupta *et al.*, 2000; Cerhan *et al.*, 2001).

De manera indirecta, la acumulación de nutrientes en los ecosistemas acuáticos y la proliferación de algas tóxicas pueden dar lugar a diferentes efectos adversos. La ingestión de agua o alimentos con contenidos de toxinas algales puede dar lugar a trastornos fisiológicos como náuseas, vómitos, diarrea, gastroenteritis, neumonía, dolores musculares, entre otros y diversos síntomas de intoxicación (Busse *et al.*, 2006). Además, la eutrofización de las aguas puede favorecer el desarrollo de organismos transmisores o causantes de enfermedades infecciosas como la malaria, encefalitis y cólera.

1.1.3 Legislación Ambiental

A nivel Europeo se han formulado varias directivas y normas para la protección y el control de la contaminación de los ecosistemas acuáticos naturales, derivadas principalmente de acuerdos internacionales de actuación en materia ambiental, y que se resumen a continuación:

- La Directiva 2000/60/EC establece el marco de actuación comunitario en el ámbito de la política de aguas entre los estados miembros de la Comunidad Europea. Esta directiva tiene como objetivo principal proteger el buen estado ecológico de las masas de agua continentales, aguas de transición, aguas costeras y aguas subterráneas.
- La Directiva 91/271/CEE de aguas residuales urbanas, modificada por la Directiva 98/15/CE en el cuadro II del Anexo I, establece la obligatoriedad de disponer de sistemas de colectores y realizar el tratamiento de las aguas residuales urbanas y las procedentes de determinadas

industrias. Dichas obligaciones dependen de la cantidad de carga orgánica del vertido y de las características del ecosistema acuático receptor del vertido. El tipo de ecosistema acuático receptor hace referencia a la sensibilidad de éste a la “eutrofización”, catalogándolo como “zona sensible” o “zona menos sensible”. Las zonas sensibles requieren una mayor reducción de la carga contaminante del agua residual y por tanto los vertidos realizados en ellas deben cumplir requisitos más exigentes.

Se considera que un medio acuático es “zona sensible” cuando puede incluirse en uno de los siguientes grupos: I) Lagos de agua dulce naturales, otros medios de agua dulce, estuarios y aguas costeras que sean eutróficos o que podrían llegar a ser eutróficos en un futuro próximo si no se adoptan medidas de protección; II) aguas superficiales destinadas a la obtención de agua potable, que podrían contener una concentración de nitratos superior a la que establecen las disposiciones pertinentes de la Directiva 75/440/CEE, relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros, si no se toman medidas de protección; III) Zonas en las que sea necesario un tratamiento adicional para cumplir las directivas europeas.

En la Tabla 1.4 se encuentran recogidos los límites de vertido de nitrógeno sobre zonas sensibles. Según la situación local se podrá aplicar el valor de concentración o el porcentaje de reducción.

Tabla 1.4. Requisitos para el vertido de nitrógeno a zonas sensibles procedente de instalaciones de tratamiento de agua residual urbana (Directiva 91/271/CEE).

	Concentración según Habitante equivalente (he)		Porcentaje mínimo de reducción ¹
	10.000 a 100.000 (he)	> 100.000 (he)	
Nitrógeno total ²	15 (mg N L ⁻¹) ³	10 (mg N L ⁻¹) ³	70-80

¹ Reducción relacionada con la carga de caudal de entrada.

² Nitrógeno total equivalente es la suma del nitrógeno *Kjeldahl* total (orgánico y amoniacal) y el nitrógeno nítrico (formas inorgánicas de nitrito y nitrato), tal y como se mostró en la Figura 1.2.

³ Estos valores de concentración constituyen medias anuales. No obstante los requisitos de vertido de nitrógeno pueden comprobarse mediante medias diarias. En este caso, la media diaria no deberá superar los 20 mg N L⁻¹ de concentración para todas las muestras cuando la temperatura del reactor biológico sea superior o igual a 12°C. En sustitución al requisito de la temperatura, se podrá aplicar una limitación del tiempo de funcionamiento que tenga en cuentas las condiciones climáticas regionales.

En España, el Real Decreto-Ley 11/1995 tiene por objeto la transposición al ordenamiento interno de las disposiciones establecidas en la Directiva 91/271/CEE. En él se impone la aplicación de tratamientos a las aguas residuales antes de su vertido a las aguas continentales y marítimas. Se definen los criterios de “zona sensible” y “zona menos sensible”, por lo que la rigurosidad del tratamiento aplicado al agua residual dependerá de la clasificación del punto

de vertido en una de estas dos categorías. El desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995 quedó establecido en el Real Decreto 509/1996, modificado por el Real Decreto 2116/1998, sobre las normas aplicables al tratamiento de aguas residuales urbanas.

- La Directiva 91/676/CEE relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrícolas, tiene por objetivo reducir la contaminación causada o provocada por los nitratos de origen agrario, y actuar preventivamente contra nuevas contaminaciones de esta clase.

Estas medidas legislativas incentivan y justifican el estudio de los procesos implicados en la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales, no sólo en términos del cumplimiento de estándares de calidad para la prevención de la contaminación y el aprovechamiento del agua, sino en su cada vez más importante contribución al balance global del nitrógeno.

1.2 Eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales

Existe una variedad de tecnologías de eliminación de nitrógeno de las aguas residuales que implican procesos físicos y químicos tales como el arrastre con aire del amoníaco (*stripping* de amoníaco), el intercambio iónico y la cloración al *breakpoint*. Sin embargo, debido su elevado coste, el funcionamiento irregular y los problemas de explotación y mantenimiento, la aplicación de este tipo de tecnologías se ha centrado en situaciones concretas, principalmente sobre efluentes de agua residual de tipo industrial, en donde su baja biodegradabilidad y/o toxicidad hacen inviable el uso de procesos biológicos. También existen tecnologías que fomentan la recuperación del nitrógeno presente en las aguas residuales como es el caso de la precipitación en forma de estruvita ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$). Este tipo de tecnología fomenta además la recuperación del fósforo de las aguas residuales, el cual constituye junto al nitrógeno, los principales nutrientes responsables de la eutrofización de ecosistemas acuáticos. Para llevar a cabo el proceso de cristalización de la estruvita se requieren altos valores de pH y ratios equimolares entre amonio, fósforo y magnesio.

La eliminación de nitrógeno de las aguas residuales en una estación depuradora (EDAR) se lleva a cabo generalmente mediante procesos biológicos. Entre un 10-30% del nitrógeno total es empleado para satisfacer las necesidades nutricionales de la biomasa en un sistema de fangos activados convencional. Se estima que el contenido de nitrógeno en la biomasa formada se encuentra entre un 12 y un 13% de su peso (Sedlak, 1991). Además, en los casos en que la EDAR cuenta con decantación primaria, entre un 5-10% del nitrógeno total contenido en la corriente afluente es eliminado en forma de nitrógeno orgánico particulado. De acuerdo con las exigencias

legislativas actuales esta eliminación de nitrógeno no es suficiente, por lo que se requiere un mayor grado de depuración mediante la aplicación de tecnologías avanzadas de tratamiento. En este sentido, la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales tiene un coste energético asociado, por lo que es cada vez más interesante optimizar el proceso de eliminación de nitrógeno mediante el desarrollo y la aplicación de tecnologías que permitan alcanzar un alto grado de depuración a un mínimo coste.

El conocimiento cada vez más amplio de los microorganismos involucrados en los procesos de eliminación de nitrógeno ha llevado a la generación de una variedad de opciones de tratamiento en los últimos años. La tecnología aplicada en cada caso dependerá principalmente de las características de la corriente de agua residual, los límites de vertido y el espacio disponible para su emplazamiento.

Los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato son los más comúnmente utilizados para la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales. Sin embargo, se han desarrollado tecnologías basadas en la ruta del nitrito (Hellings *et al.*, 1998) que permiten optimizar la explotación de las EDAR, obteniendo un elevado rendimiento de eliminación a bajo coste. A continuación se describen los procesos biológicos que se encuentran consolidados, así como aquellos que están en fase de investigación e implementación.

1.2.1 Procesos convencionales de eliminación de nitrógeno

1.2.1.1 Nitrificación y desnitrificación vía nitrato

La Figura 1.3 muestra las transformaciones del nitrógeno en las aguas residuales a partir de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato. En esta figura se puede observar que el proceso de nitrificación tiene lugar en dos etapas en las que el nitrógeno amoniacal es oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato, y que en el proceso de desnitrificación el nitrato es reducido a compuestos nitrogenados gaseosos. Además, se encuentran representados los procesos de hidrólisis del nitrógeno orgánico, y los procesos de asimilación, crecimiento y lisis bacteriana a partir de nitrógeno inorgánico en forma amoniacal.

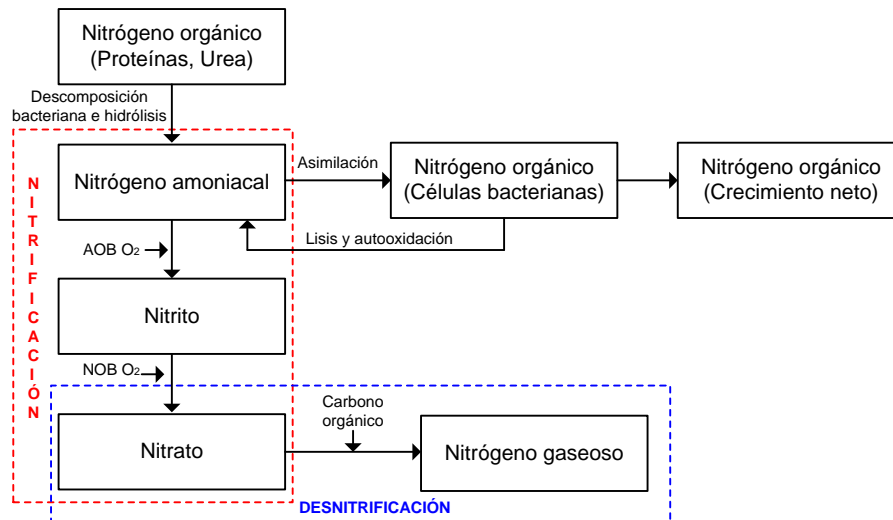
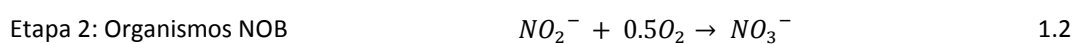
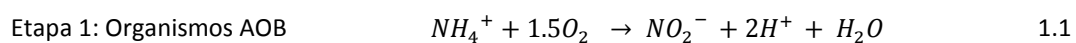


Figura 1.3. Transformaciones del nitrógeno mediante los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato (Metcalf y Eddy, 1995).

Nitrificación

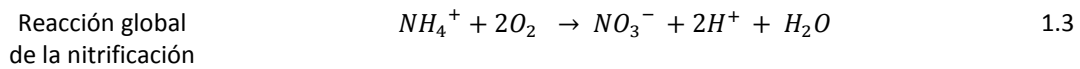
El proceso de nitrificación es generalmente realizado por bacterias quimiolitautótrofas que emplean el carbono inorgánico como fuente de carbono para la síntesis celular, y el nitrógeno inorgánico para obtener energía. Los microorganismos involucrados en este proceso se dividen en dos grupos bien diferenciados, las bacterias amonioxidantes (AOB) que se encargan de la conversión del nitrógeno amoniacal a nitrito formando hidroxilamina como producto intermediario, y las bacterias nitritoxidantes (NOB) que se encargan de la transformación del nitrito a nitrato.

En las Ecuaciones 1.1 y 1.2 se encuentra representada la estequiometría de las reacciones bioquímicas de oxidación de amonio y oxidación de nitrito, respectivamente. En cada una de estas etapas se produce energía que es utilizada por los microorganismos para el crecimiento y mantenimiento celular.

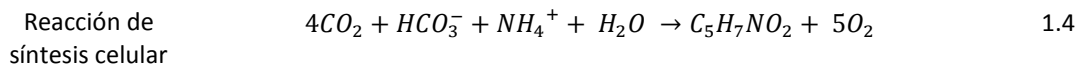


Para las condiciones habituales de operación de una EDAR (tiempos de retención celular inferiores a 25 días y temperaturas del agua en el reactor inferiores a 25°C), la etapa 1 corresponde con la etapa limitante del proceso de nitrificación debido a que el nitrito producido es rápidamente oxidado a nitrato. A temperaturas por debajo de 25°C la velocidad de crecimiento de los organismos NOB es superior a la velocidad de crecimiento de los organismos AOB. La

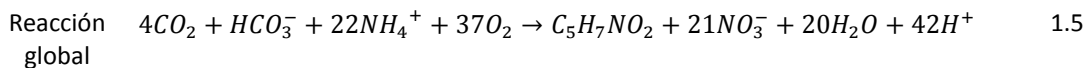
reacción global de oxidación de amonio para ambos grupos de bacterias se encuentra representada en la Ecuación 1.3.



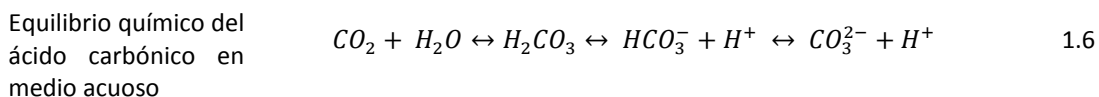
La reacción de síntesis de los microorganismos implicados se encuentra representada en la Ecuación 1.4. en la que se asume como fórmula química de la biomasa $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$. La biomasa asimila una fracción del amonio contenida en el agua residual para la formación de tejido celular.



La reacción global que representa los procesos anabólicos y catabólicos de la nitrificación se recoge en la Ecuación 1.5.



Los coeficientes estequiométricos de la reacción de nitrificación global muestran que por cada mol de amonio (NH_4^+) oxidada el proceso de nitrificación se consume una cantidad significativa de oxígeno, produce una pequeña cantidad de biomasa, y consume una cantidad considerable de alcalinidad debido a la producción de iones hidrógeno (H^+). Esta producción de ácido (H^+) junto con el consumo de dióxido de carbono (CO_2) tienen un impacto sobre el equilibrio del ácido carbónico en disolución acuosa, que se representa en la Ecuación 1.6, por lo que el pH puede variar considerablemente. Esta variación puede afectar al crecimiento de los microorganismos implicados en el proceso de nitrificación en las EDARs, y generar un impacto adverso sobre ecosistemas acuáticos receptores de los efluentes de estas instalaciones de tratamiento.



En la Tabla 1.5 se encuentran recogidos los valores de los coeficientes de consumo de oxígeno y alcalinidad generalmente empleados para el diseño y simulación de sistemas de nitrificación (U.S. EPA, 1993; Henze *et al.*, 1999).

Tabla 1.5. Coeficientes de consumo de oxígeno y alcalinidad en el proceso de nitrificación.

Parámetro	Coefficiente
Oxígeno	$\frac{4.57 \text{ g } O_2}{\text{g } N - NH_4^+}$
Alcalinidad	$\frac{7.14 \text{ g Alcalinidad (CaCO}_3\text{)}}{\text{g } N - NH_4^+}$

Desnitrificación

El proceso de desnitrificación consiste en la reducción del nitrato a nitrito y, posteriormente, a compuestos de nitrógeno gaseoso (óxido nítrico NO, óxido nitroso N₂O y nitrógeno diatómico N₂) en presencia de una fuente de carbono orgánica. El nitrato y el nitrito reemplazan al oxígeno en la cadena de transporte de electrones (respiración microbiana), por lo que la desnitrificación suele producirse en ambientes denominados anóxicos, carentes de oxígeno y con disponibilidad de nitrito y nitrato como aceptores de electrones.

Existe una variedad muy alta de microorganismos involucrados en las reacciones de desnitrificación, lo que les proporciona el potencial de ubicuidad en la mayoría de ambientes naturales. Esta abundancia es debida en parte al hecho de que la mayoría de las especies de organismos desnitrificantes son facultativas, con posibilidad de emplear oxígeno o nitrato y nitrito como aceptor final de electrones.

La producción energética (ATP) a partir de nitrito y nitrato es menor que la obtenida a partir de oxígeno, y mayor que la obtenida a partir de la reducción de sulfato, situación que determina la preferencia por parte de los microorganismos de emplear un aceptor de electrones u otro (Brock, 1994). Cuando hay oxígeno, los microorganismos tendrán preferencia hacia éste frente al nitrito y nitrato, mientras que en ausencia de oxígeno los microorganismos tendrán preferencia sobre el nitrito y el nitrato antes que sobre el sulfato disponible.

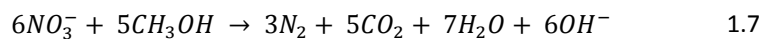
La utilización de los aceptores de electrones está condicionada a los cambios metabólicos ocurridos en la bacteria, generalmente a nivel de síntesis enzimática. En sistemas de cultivo puro se ha encontrado que el oxígeno es responsable de la supresión de la síntesis de enzimas para el proceso de desnitrificación. Sin embargo, ciertas investigaciones han sugerido que incluso en condiciones aerobias o anaerobias las enzimas del proceso de desnitrificación pueden estar presentes en la bacteria (Cervantes, 2009).

Las fuentes de carbono orgánico que pueden servir como sustrato para el proceso de desnitrificación de aguas residuales incluyen compuestos orgánicos presentes en las aguas

residuales urbanas e industriales, y compuestos adicionados durante la etapa anóxica como metanol (CH₃OH), etanol (C₂H₅OH) y ácido acético (CH₃-COOH), entre otros. La selección de la fuente de carbono orgánico dependerá principalmente de la disponibilidad local y el coste económico.

La reacción general de desnitrificación utilizando metanol como fuente de carbono orgánico se representa en la Ecuación 1.7. De acuerdo a esta reacción, 1.9 g de CH₃OH (2.86 g cuando es expresado como Demanda Química de Oxígeno - DQO) se consumen para reducir 1 g de N-NO₃⁻.

Desnitrificación con metanol como fuente de carbono orgánico



El proceso de desnitrificación contribuye a incrementar el pH debido a que la concentración de la alcalinidad se incrementa y la concentración de ácido carbónico disminuye. Cada mg de N-NO₃⁻ reducido genera 3.57 mg de alcalinidad, expresada como carbonato de calcio (CaCO₃). Por este motivo, en el tratamiento de corrientes de agua residual de baja alcalinidad el proceso de desnitrificación resulta muy atractivo debido a que compensa el descenso del pH ocurrido durante el proceso de nitrificación.

1.2.1.2 Esquemas de tratamiento y características de aplicación

Los esquemas de tratamiento utilizados para la eliminación biológica de nitrógeno vía nitrato alternan etapas aerobias y anóxicas bajo distintas condiciones de operación, tanto en medios de cultivo en donde la biomasa se encuentra suspendida como en medios de cultivo donde la biomasa está adherida a un medio de soporte. La selección del tipo de proceso y su configuración dependerá de las características del agua residual tales como el tipo de compuesto nitrogenado a tratar (nitrógeno orgánico, amoniacal, nítrico), la biodegradabilidad de la materia orgánica y, la relación materia orgánica y nitrógeno amoniacal (DQO/N-NH₄), además de los requisitos de vertido y el caudal de tratamiento. La ruta del nitrato es comúnmente aplicada en corrientes de agua residual urbana que presenta concentraciones de nitrógeno amoniacal de hasta 100 mg N L⁻¹. A continuación se describen las principales características de los sistemas de cultivo en suspensión y de soporte sólido empleados en la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales urbanas.

Sistemas de cultivo en suspensión

En un sistema de fangos activados los procesos de nitrificación y desnitrificación son generalmente diseñados y operados mediante cultivos mixtos de bacterias autótrofas y heterótrofas, denominados Sistemas de Cultivo Simple. Bajo estas condiciones de operación la biomasa necesita de la alternancia de condiciones aerobias y anóxicas, en un reactor o varios reactores en serie. Además, atendiendo a la posición relativa de las etapas aerobias y anóxicas se pueden clasificar en sistemas de predesnitrificación y postdesnitrificación.

Los sistemas de predesnitrificación son aquellos en los que el agua residual es tratada primero en una zona anóxica y posteriormente en una zona aerobia. Los nitratos llegan al reactor anóxico por medio de una corriente de recirculación, aprovechándose para el proceso de desnitrificación la materia orgánica contenida en el agua residual afluyente. Por otro lado, en los sistemas de postdesnitrificación el agua residual es tratada primero en una etapa aerobia y posteriormente en una etapa anóxica. En estos sistemas prácticamente toda la materia orgánica contenida en el agua residual se consume en la etapa aerobia y se hace, por tanto, necesaria la adición de una fuente de carbono orgánico externa.

La Figura 1.4 muestra los esquemas de fangos activados del tipo cultivo simple, más ampliamente difundidos para la eliminación biológica de nitrógeno. Consisten básicamente en la disposición en serie de una etapa anóxica en la que se realiza el proceso de desnitrificación, y una etapa aerobia para la nitrificación. Además, contienen corrientes de recirculación de fango y/o agua dependiendo del esquema.

a) La configuración **Wuhrmann** corresponde con un proceso de tipo postdesnitrificación. Para que se pueda realizar el proceso de desnitrificación se requiere de la adición de una fuente de carbono orgánico externa sobre el reactor anóxico. Esta configuración no cuenta con recirculación interna debido a que los nitratos pasan directamente desde el reactor aerobio hacia el reactor anóxico, en donde se lleva a cabo la desnitrificación. Para ajustar el tiempo de retención celular (TRC) parte del fango procedente del decantador secundario se purga del sistema, y el resto del fango se recircula hacia el reactor aerobio para mantener una concentración elevada y constante de biomasa en los reactores biológicos.

b) La configuración **Ludzack-Ettinger modificada** es un esquema sencillo de tipo predesnitrificación que dispone de dos reactores en serie. En el primer reactor se realiza la desnitrificación empleando como fuente de carbono orgánico el agua residual afluyente al proceso de fangos activados. El reactor anóxico recibe una corriente de recirculación interna procedente

del reactor aerobio para llevar a cabo el proceso de desnitrificación. Una parte del fango procedente del decantador secundario se recircula al reactor anóxico, y la otra parte de este fango se purga del sistema para ajustar el TRC. El licor mezcla efluente del reactor anóxico se traslada al reactor aerobio con el objetivo de degradar simultáneamente la materia orgánica y oxidar el nitrógeno amoniacal a nitrato.

c) La configuración **Bardenpho** incorpora cuatro etapas en donde se alternan zonas anóxicas y aerobias. Representa una variación del esquema Ludzack-Ettinger modificado, añadiendo dos etapas más al proceso. Existe una corriente de recirculación interna desde el primer reactor aerobio (situado en la segunda posición) hacia el reactor anóxico inicial. En el tercer reactor, también anóxico, se reducen los nitratos producidos en el segundo reactor (aerobio), completando el proceso de desnitrificación. Esta etapa se utiliza como fuente de carbono la materia orgánica resultante del proceso endógeno de los microorganismos (postdesnitrificación). El último de los reactores es aerobio, y permite la desabsorción del nitrógeno gaseoso producido anteriormente, para facilitar la sedimentación de los fangos en el decantador secundario. Hay una corriente de recirculación de fangos hacia el reactor anóxico situado en la primera posición, y una corriente de purga de fango para ajustar el TRC.

d) Los **Canales de oxidación** son reactores circulares u ovalados a través de los cuales circula el agua residual impulsada por aireadores mecánicos de eje horizontal. Aguas abajo del sistema de aireación se sitúa la zona aerobia que se extiende hasta que los niveles de oxígeno disminuyen a cero, y a partir de ese punto se inicia la zona anóxica. Al final de la zona aerobia se sitúa el punto de descarga del sistema al decantador secundario. La recirculación de fangos desde el decantador secundario hacia el canal de oxidación se ubica al principio de la zona anóxica, al igual que la entrada del agua residual al sistema de fangos activados.

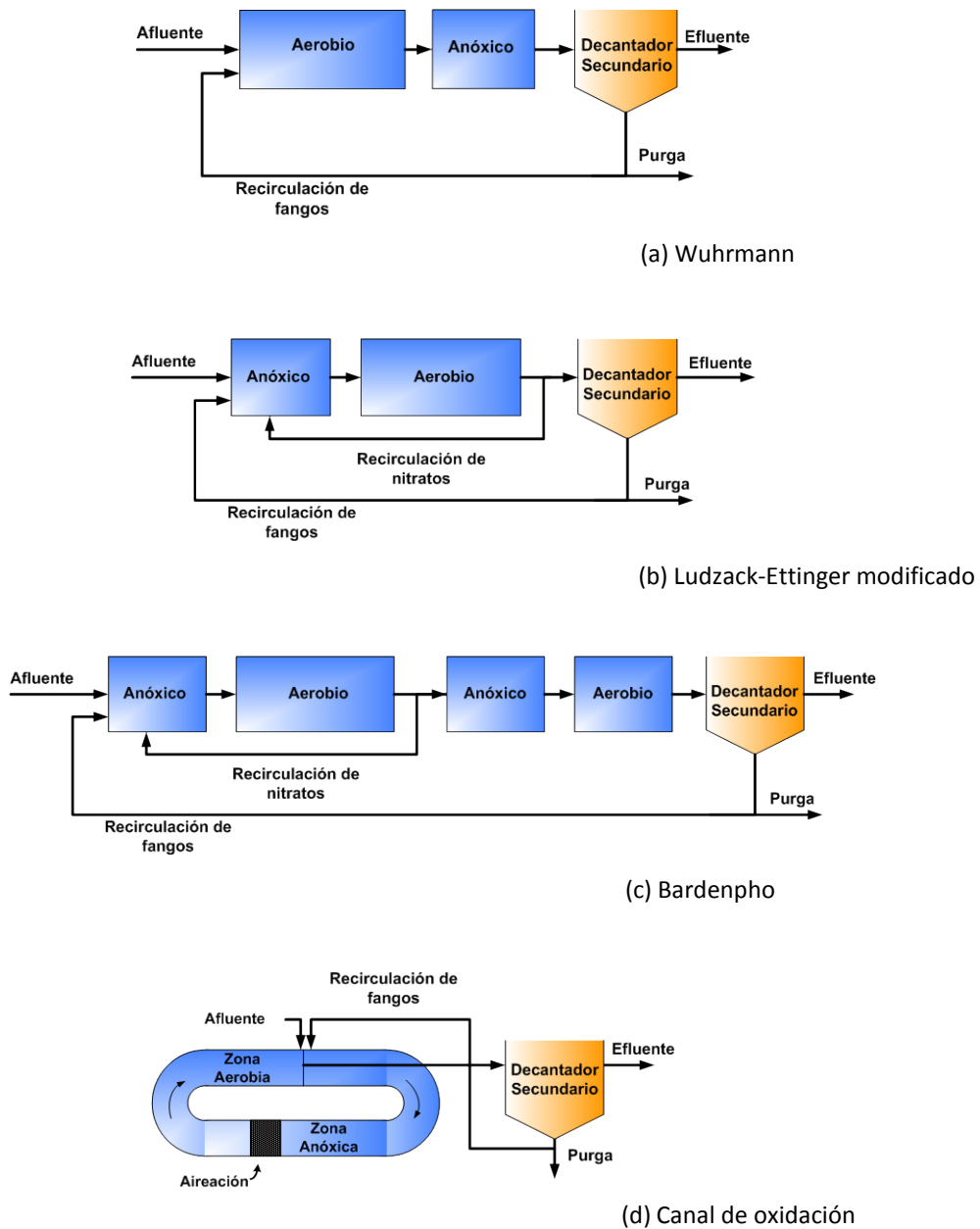


Figura 1.4. Configuraciones de procesos de fangos activados comúnmente empleadas para la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales.

e) El **Reactor secuencial (Sequential Batch Reactor - SBR)** es otra tecnología de tratamiento de agua residual de cultivo en suspensión que se ha utilizado satisfactoriamente tanto sobre corrientes de agua residual urbana (Lee *et al.*, 2004; Puig *et al.*, 2005) como industrial (Vives *et al.*, 2003; Cassidy y Belia, 2005). La operación de este reactor se realiza mediante ciclos que integran las siguientes etapas: llenado, reacción, sedimentación y vaciado. Durante la etapa de reacción se alternan condiciones aerobias y anóxicas para llevar a cabo los procesos de nitrificación y desnitrificación, respectivamente.

La ventaja más destacada de la aplicación de esta tecnología para la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales sobre los esquemas de tratamiento que se acaban de explicar es su simplicidad en el diseño y operación debido a la ausencia del decantador secundario en su configuración. Esta tecnología generalmente permite alcanzar concentraciones muy bajas de nitrógeno en el efluente, y además se caracteriza por producir un fango con unas adecuadas características de sedimentabilidad (Cervantes, 2009). Como desventaja se puede citar la descarga discontinua del efluente que conllevan a trabajar con volúmenes de reactor relativamente altos (Grady *et al.*, 1999).

En la Figura 1.5 se encuentra representado un ciclo de operación de un reactor SBR con eliminación de nitrógeno. Este ciclo está conformado por las siguientes fases: llenado o alimentación del sistema con agua residual, seguidamente la fase de reacción que comprende una etapa anóxica y una etapa aerobia en las que ocurren los procesos de desnitrificación y nitrificación, respectivamente. Para completar la eliminación de nitrógeno, en la fase de reacción se puede adicionar una segunda etapa anóxica mediante la cual se logrará eliminar completamente el nitrato producido durante la primera etapa aerobia, y una segunda etapa aerobia que permitirá mejorar la sedimentabilidad del fango mediante la desabsorción del nitrógeno gaseoso (N_2). Finalmente se encuentran las fases de sedimentación y vaciado. La duración total de un ciclo de operación es variable, y depende del tiempo de retención hidráulico establecido, la concentración de nitrógeno en la corriente afluyente y la sedimentabilidad del fango.

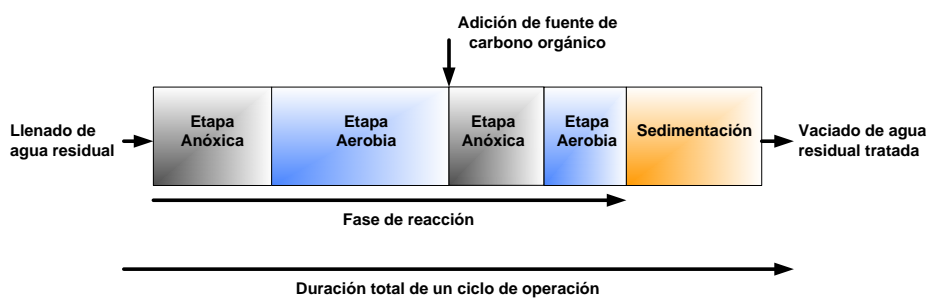


Figura 1.5. Ciclo de operación de un reactor secuencial (SBR) con eliminación de N-amoniaco. Durante la segunda fase anóxica el nitrato producido en la primera fase aerobia es reducido mediante la adición de una fuente de carbono externa. La última fase aerobia permite desabsorber el N_2 antes de la fase de sedimentación.

Por otro lado, los procesos de nitrificación y desnitrificación se pueden llevar a cabo en sistemas de cultivo biológico independiente con separación de la biomasa nitrificante y desnitrificante, denominados Sistemas de Cultivo Múltiple (Figura 1.6). En estos sistemas un cultivo realiza el proceso de nitrificación y otro cultivo distinto realiza el proceso de desnitrificación.

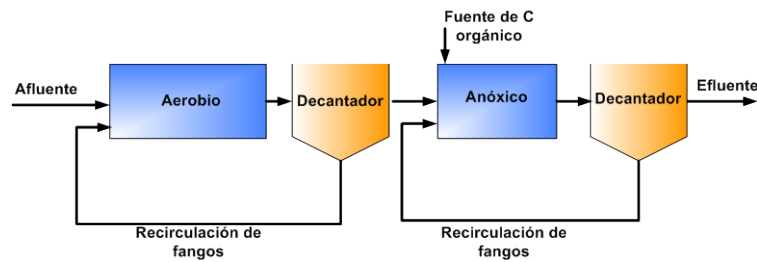


Figura 1.6. Configuración de procesos de fangos activados de cultivo múltiple para la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales.

Sistemas de soporte sólido

En los procesos de soporte sólido la biomasa no se encuentra suspendida en el agua sino fija sobre algún medio de soporte formando una película. Las ventajas de este tipo de tecnología comparada con la tecnología de cultivos en suspensión se encuentran representadas en el menor espacio requerido para la construcción del sistema de tratamiento y la adecuada separación de la biomasa del agua tratada.

Dentro de las tecnologías de tratamiento de aguas residuales mediante soporte sólido se encuentran los filtros percoladores, los contactores biológicos rotativos (RBC), filtros aireados biológicos (BAF), reactores de lecho móvil (MBBR), y como resultado de la combinación de un sistema de fangos activos y un sistema de soporte sólido se encuentran los llamados procesos híbridos.

A continuación se describe de manera general el principio de funcionamiento y la aplicación de los sistemas desarrollados mediante soporte sólido sobre la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales:

a) Los **filtros percoladores** constan de un medio poroso a través del cual se hace pasar el agua residual a depurar. La corriente de agua residual ingresa al sistema por la parte superior del filtro, debido al régimen de trabajo no saturado es posible el paso del aire en contracorriente con el agua. Finalmente el agua tratada es recogida por la parte inferior del filtro.

Esta tecnología constituye un tratamiento secundario aplicable a las aguas residuales susceptibles de ser depuradas mediante procesos biológicos aerobios de degradación de materia orgánica y nitrificación. Para obtener una nitrificación completa en este sistema se hace necesaria la recirculación del efluente y/o la utilización de dos filtros percoladores en serie (Pearce, 2004); mientras que para alcanzar la eliminación completa del nitrógeno del agua residual se hace indispensable la recirculación del efluente del sistema hacia una etapa de desnitrificación.

b) Los **contactores biológicos rotativos (RBC)** consisten en un conjunto de discos ensamblados sobre un eje horizontal. Los discos se encuentran parcialmente inmersos (40%) en el reactor por el que fluye continuamente el agua residual. La biomasa crece sobre el disco, y se encuentra expuesta al aire y a la transferencia del oxígeno debido a la rotación de los discos sobre el eje horizontal que los soporta. Los RBC han sido diseñados para la oxidación de la materia orgánica principalmente, aunque es posible obtener un efluente completamente nitrificado.

c) Los **filtros aireados biológicos (BAF)** son filtros donde el medio de soporte se encuentra empacado y sumergido en el agua residual. Estos sistemas involucran la filtración con la degradación de la materia orgánica, y la nitrificación o desnitrificación. Muchas de las aplicaciones industriales operan en flujo ascendente y se destinan a la nitrificación del efluente de un sistema de fangos activados, y a la postdesnitrificación mediante la adición de carbono orgánico (Rother *et al.*, 2002).

d) En los **reactores de lecho móvil (MBBR)** la biomasa se desarrolla sobre soportes que se mueven libremente en el reactor. En estos sistemas la eliminación de nitrógeno puede ser alcanzada mediante configuraciones de predesnitrificación y postdesnitrificación.

e) Los **sistemas híbridos** combinan en un mismo reactor la biomasa suspendida con la biomasa adherida a un medio de soporte. Bajo estas condiciones, el proceso de nitrificación es llevado a cabo por la biopelícula formada en el medio de soporte, mientras que la degradación de la materia orgánica es realizada principalmente por la biomasa en suspensión. El alto tiempo de retención celular necesario para la nitrificación es alcanzado en la biopelícula, lo que hace factible obtener altos rendimientos de eliminación de nitrógeno en reactores de menor volumen, incluso trabajando a baja temperatura.

1.2.2 Procesos no convencionales de eliminación de nitrógeno

Los procesos biológicos de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito han sido considerados como alternativas interesantes, desde el punto de vista de eficiencia energética y de producción de fangos, para alcanzar elevados rendimientos de eliminación de nitrógeno. Estas tecnologías fueron desarrolladas inicialmente para tratar la corriente de sobrenadante de la deshidratación de fangos sometidos a un proceso de digestión anaerobia, evitando así su retorno a la línea de aguas. Sin embargo, la aplicación de estas tecnologías se ha extendido de manera general al tratamiento de corrientes con elevada concentración de nitrógeno amoniacal, como es el caso de

los lixiviados procedentes de los vertederos de residuos sólidos (Ganigué *et al.*, 2007), y corrientes de agua residual de origen agropecuario (Hwang *et al.*, 2005).

En la Figura 1.7 se encuentran representados los procesos biológicos involucrados en la eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito y vía nitrato. Como se ha comentado previamente, las tecnologías que se fundamentan en la oxidación de amonio hasta nitrito y en la posterior reducción de nitrito a nitrógeno gaseoso, bien sea por desnitrificación heterotrófica o por oxidación anaerobia de amonio utilizando nitrito como aceptor de electrones (ANAMMOX), constituyen una alternativa viable de tratamiento. Estas tecnologías son consideradas como un avance en la optimización de la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales, representando un ahorro económico considerable en la explotación de una EDAR, que se refleja principalmente en los siguientes aspectos:

- **Reducción del consumo energético** en la aireación durante el proceso de nitrificación. Como se puede observar en la Figura 1.7 el consumo de oxígeno durante la oxidación del amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) corresponde al 75% del total demandado por el proceso de nitrificación, y el 25% del oxígeno restante es consumido durante la oxidación del nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-). Por tanto, cuando el proceso de nitrificación sólo se realiza hasta nitrito (nitritación) se requiere un 25% menos de oxígeno, y esto se traduce en un ahorro energético en términos de aireación. Además, este ahorro energético se incrementa cuando se combina el proceso de nitritación con el proceso de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX), debido a que sólo es necesario oxidar el 50% del amonio a nitrito (nitritación parcial).
- **Reducción de las necesidades de materia orgánica** durante el proceso de desnitrificación. Tal y como se muestra en la Figura 1.7, la desnitrificación a partir de nitrito (NO_2^-) representa un ahorro del 40% del consumo de materia orgánica externa en comparación con la desnitrificación realizada a partir de nitrato (NO_3^-). Por otra parte, es posible reducir completamente las necesidades de materia orgánica cuando la oxidación de amonio se realiza empleando el nitrito (NO_2^-) como aceptor de electrones (proceso ANAMMOX). En este último caso se hace necesario, como paso previo al proceso ANAMMOX, la oxidación del 50% de amonio a nitrito, lo cual se puede conseguir mediante un proceso de nitritación parcial, comúnmente realizado en un sistema SHARON. Las características generales del proceso ANAMMOX, así como su acople con el proceso SHARON se describen en los apartados 1.2.2.2. y 1.2.2.3.

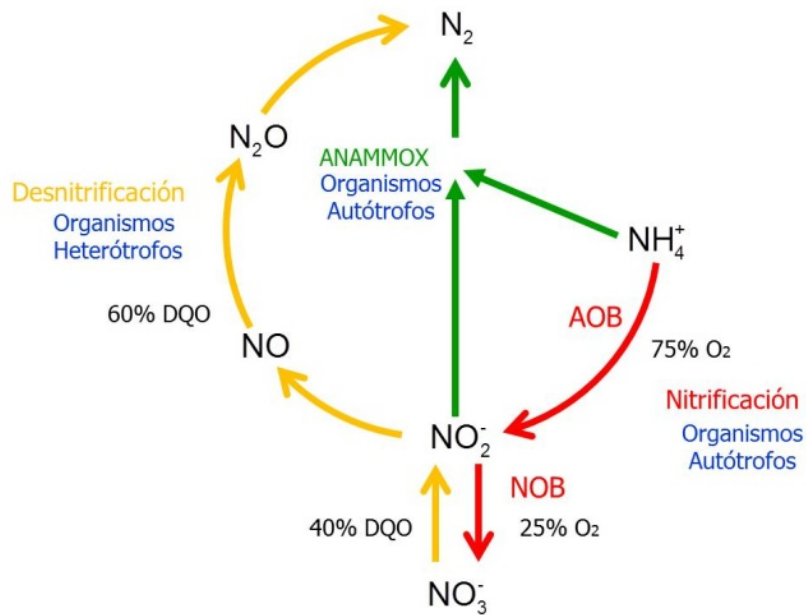
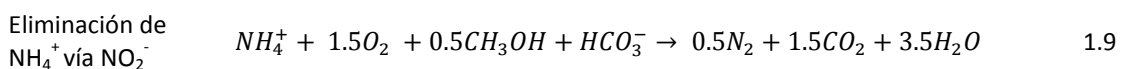
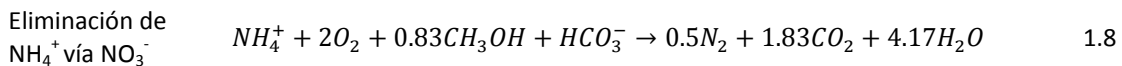


Figura 1.7. Transformaciones del nitrógeno amoniacal vía nitrito y vía nitrato en el agua residual.

Al igual que en el proceso de desnitrificación a partir de nitrato, la mitad de los protones (H^+) producidos durante la nitrificación pueden ser neutralizados mediante la desnitrificación a partir de nitrito. Las Ecuaciones 1.8 y 1.9 representan las reacciones de eliminación total del nitrógeno amoniacal mediante los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrato y vía nitrito, respectivamente (empleando metanol como fuente de carbono orgánico).



En estas reacciones químicas se puede observar la menor emisión de dióxido de carbono (CO_2) al seguir la ruta del nitrito. Además, mediante esta ruta se produce menos fango (Mulder, 2003). En la Tabla 1.6 se encuentra recogido un análisis comparativo entre la eliminación biológica de nitrógeno vía nitrito y vía nitrato, que incluye el consumo de oxígeno, la demanda de materia orgánica, las emisiones de dióxido de carbono y la producción de fango. Esta información se basa en la estequiometría de las Ecuaciones 1.8 y 1.9, y ha sido obtenida asumiendo una corriente de agua residual con concentración equimolar entre el amonio y el bicarbonato.

Tabla 1.6. Comparación teórica entre la eliminación biológica de nitrógeno vía nitrito y vía nitrato (Volcke, 2006).

Parámetro	Oxígeno	Materia Orgánica ¹	Emisión de CO ₂	Producción de Fango (Mulder, 2003)
	$\frac{kg O_2}{kg N - NH_4^+}$	$\frac{kg DQO}{kg N - NH_4^+}$	$\frac{kg CO_2}{kg N - NH_4^+}$	$\frac{kg peso seco}{kg N - NH_4^+}$
Nitrificación y desnitrificación vía nitrato	4.57	2.86	5.76	1-1.2
Nitrificación y desnitrificación vía nitrito	3.43	1.71	4.72	0.8-0.9

¹ 1 g CH₃OH equivale a 1.5 g DQO

Aplicación de la ruta del nitrito sobre corrientes de agua residual con alta concentración de nitrógeno amoniacal

Las tecnologías desarrolladas para la eliminación biológica de nitrógeno amoniacal siguiendo la ruta del nitrito han sido aplicadas principalmente sobre corrientes de agua residual con elevada concentración de nitrógeno amoniacal, que en la mayoría de los casos provienen de procesos que operan a alta temperatura. Estas dos características, entre otras que se describen posteriormente, hacen que este tipo de corrientes sean adecuadas para su tratamiento vía nitrito.

A continuación se describen las características de las principales corrientes de agua residual en las que se ha empleado el tratamiento de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito. Se hace especial énfasis en la descripción de las características de la corriente de sobrenadante procedente de la deshidratación de fangos digeridos anaeróbicamente, debido a que es la corriente sobre la que versa este trabajo de tesis doctoral.

a) Sobrenadante procedente de la deshidratación de fangos digeridos anaeróbicamente

Como resultado del tratamiento de las aguas residuales, se genera un fango que debe ser estabilizado para su disposición final. La estabilización o tratamiento del fango se desarrolla por digestión aerobia o anaerobia.

El nitrógeno contenido en la materia orgánica, principalmente en las proteínas, es liberado cuando los compuestos orgánicos son degradados. En condiciones aerobias, una fracción considerablemente alta de la materia orgánica es empleada como sustrato para el crecimiento bacteriano, por lo que el nitrógeno disponible es nuevamente incorporado en las proteínas celulares. Por este motivo, no se obtienen concentraciones de nitrógeno significativamente altas en la corriente del sobrenadante de la digestión aerobia de fangos. Por el contrario, en los procesos de digestión anaerobia de fangos sólo una pequeña fracción de la materia orgánica es

empleada por los microorganismos para el crecimiento celular, predominando la formación de productos como el metano (CH_4), el dióxido de carbono (CO_2), el hidrógeno (H_2) y el ácido sulfhídrico (H_2S), y la suelta de una cantidad considerablemente elevada de nitrógeno en forma amoniacal.

Durante el proceso de digestión anaerobia se produce la muerte de las bacterias procedentes de la línea de aguas (heterótrofas, autótrofas y acumuladoras de polifosfatos) y la hidrólisis de la materia orgánica particulada. El nitrógeno contenido en el tejido celular y en los compuestos orgánicos pasa a encontrarse en forma de nitrógeno amoniacal (NH_4^+). Debido a estos procesos la concentración de nitrógeno amoniacal en el fango digerido anaerobiamente suele encontrarse entre 500 y 2000 mg N L^{-1} . Posterior al proceso de digestión se lleva a cabo una deshidratación que permite separar la fase sólida de la fase líquida. Al ser el amonio un compuesto soluble estas concentraciones persisten en la corriente acuosa que se obtiene tras la deshidratación de los fangos.

El agua de la deshidratación es recirculada a la primera etapa del proceso en la línea de aguas, es decir, a cabeza de planta. Esta corriente representa sólo un 1% del caudal afluente a la EDAR (Fux, 2003), pero contribuye entre un 15 y un 20% al total de la carga de nitrógeno a tratar en la línea de agua de la EDAR (Cervantes, 2009). Esta recirculación de las corrientes de sobrenadantes presenta importantes inconvenientes ya que este nitrógeno debe eliminarse en la propia línea de aguas mediante los procesos de nitrificación y desnitrificación comentados anteriormente, por lo que un aumento de la concentración de nitrógeno en el afluente, supone un incremento en los costes energéticos y de operación asociados a dichos procesos.

Otras características peculiares de esta corriente son:

- Un bajo contenido en materia orgánica biodegradable: La materia orgánica biodegradable es transformada en el proceso de digestión anaerobia en metano y dióxido de carbono. Para poder llevar a cabo la eliminación de nitrógeno vía nitrificación-desnitrificación sería necesaria la adición de materia orgánica.
- Una elevada temperatura: La digestión anaerobia suele tener lugar a una temperatura próxima a 35°C (en condiciones mesofílicas). Aunque el fango se enfría durante su paso por el digestor secundario y el proceso de deshidratación, la temperatura en la corriente recirculada suele estar próxima a 30°C. La velocidad de crecimiento de los distintos microorganismos a esta temperatura es muy superior a la velocidad de crecimiento que tienen en la línea de aguas.

- Una elevada concentración de fósforo: Durante la digestión anaerobia también se hidroliza el fósforo contenido en las bacterias y en la materia orgánica biodegradable. La cantidad de fósforo liberada será muy superior en aquellas plantas con eliminación biológica de fósforo, dado que el fósforo que forma parte del polifosfato almacenado por las PAO (Polyphosphate Accumulating Organisms) también se libera al medio. En función de las condiciones de operación del digestor (pH y concentración de iones calcio y magnesio, fundamentalmente) se puede producir la precipitación de parte del fósforo liberado en el interior del digestor o en las conducciones posteriores en forma de estruvita (MgNH_4PO_4). Este proceso también elimina parte del amonio, aunque su concentración en el efluente sigue siendo elevada porque se libera mayor cantidad de nitrógeno que de fósforo durante la digestión anaerobia y porque la relación másica en el precipitado es de 31 mg P- PO_4 por cada 14 mg N- NH_4 .

La Figura 1.8 muestra un diagrama de flujo de una estación depuradora de agua residual (EDAR) con digestión anaerobia de fangos. En esta figura se pueden observar las interacciones entre la línea de agua y la línea de fango, y el rango de variación porcentual de nitrógeno contenido en estas corrientes. Tal y como se comentó anteriormente, la degradación de la materia orgánica durante la digestión del fango produce iones amonio (NH_4^+), con iones bicarbonato (HCO_3^-) como contraión, por lo que el ratio molar entre el amonio y el bicarbonato se encuentra generalmente en torno a 1. Por otro lado, esta corriente tiene un ratio DQO/N- $\text{NH}_4 < 1$ debido a la degradación de la materia orgánica y a la liberación del nitrógeno amoniacal en los digestores. Es importante considerar que cuando el sobrenadante de la digestión anaerobia es obtenido mediante el secado térmico del fango, el contraión del ión amonio (NH_4^+) podría ser el acetato (CH_3COO^-) y no el bicarbonato (HCO_3^-), por lo que los ratios $\text{HCO}_3^- / \text{N-NH}_4$ y $\text{DQO} / \text{N-NH}_4$ se verían modificados (Van Loosdrecht y Salem, 2006).

La aplicación de procesos de eliminación de nitrógeno vía nitrito sobre la corriente de sobrenadante procedente de la deshidratación de fangos digeridos anaeróbicamente permite obtener un mejor rendimiento de eliminación de nitrógeno en la EDAR, así como una mejora en la calidad de su efluente (Mulder *et al.*, 2006). El tratamiento de esta corriente de forma independiente es especialmente interesante cuando una EDAR se encuentra en alguna de las siguientes situaciones: capacidad de aireación limitada; capacidad de desnitrificación limitada; y capacidad de nitrificación limitada al operar el proceso de fangos activos con bajos TRC (tamaño de reactores limitado) y baja temperatura, especialmente en época de invierno en donde la temperatura del proceso biológico se encuentra generalmente por debajo de 20°C.

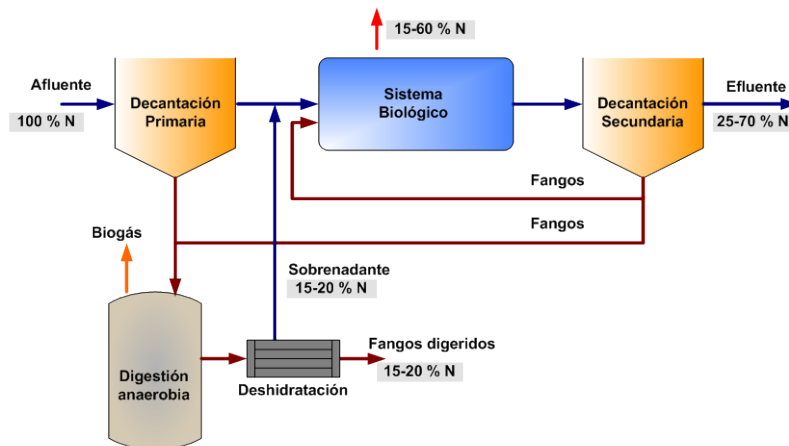


Figura 1.8. Diagrama de flujo de una EDAR con digestión anaerobia de fangos en el que se incluye la representación porcentual del flujo de nitrógeno sobre la línea de agua y la línea de fango (adaptado de Fux, 2003).

Existen otro tipo de corrientes de sobrenadante en una EDAR, como es el caso de las corrientes procedentes de los espesadores de fango, para las cuales la aplicación de tecnologías de eliminación de nitrógeno vía nitrito no es interesante debido a su baja temperatura y baja concentración de nitrógeno amoniacal.

b) Lixiviados de vertederos de residuos sólidos urbanos

Los lixiviados son mezclas complejas de agua y compuestos orgánicos e inorgánicos generados por la descomposición de los residuos depositados en los vertederos y el agua de lluvia percolada a través de éstos. El volumen y la calidad del lixiviado generado son función de la disponibilidad de agua, las características del residuo y las condiciones de la superficie. De manera general, los lixiviados contienen altas concentraciones de sustancias orgánicas e inorgánicas, disueltas y particuladas, que en magnitud representan entre 100 y 200 veces más concentración de contaminante que el encontrado en las aguas residuales urbanas.

Las concentraciones de nitrógeno determinadas en los lixiviados de vertederos de residuos sólidos urbanos suelen oscilar en un rango comprendido entre 50-5000 mg N L⁻¹ (Cervantes, 2009). La forma en la que el nitrógeno puede estar presente en el lixiviado depende de las etapas de estabilización a la que éste es sometido, predominando en la mayoría de los casos la forma amoniacal.

El lixiviado es una corriente agua residual que no es fácilmente tratada mediante procesos convencionales de eliminación biológica de nitrógeno, debido principalmente a su alto contenido en nitrógeno amoniacal y materia orgánica lentamente biodegradable (Ganigué *et al.*, 2007).

Estas características hacen que a esta corriente sea adecuada para ser tratada mediante la vía del nitrito.

c) Efluentes agroindustriales. Purines e industria pesquera.

La composición de los efluentes agroindustriales, como purines e industria pesquera, es muy variable y se caracteriza por las elevadas concentraciones de materia orgánica y nitrógeno. La materia orgánica contenida presenta poca biodegradabilidad, mientras que el nitrógeno amoniacal representa aproximadamente el 75% del nitrógeno total *Kjeldahl*, características que hacen a este tipo de corrientes susceptibles de tratamiento mediante la vía del nitrito.

1.2.2.1 Nitrificación y desnitrificación vía nitrito. Características del proceso SHARON

El proceso SHARON es uno de los métodos desarrollados para tratar biológicamente corrientes de agua residual con altas concentraciones de nitrógeno amoniacal siguiendo la ruta del nitrito (Hellings *et al.*, 1998). Este proceso se fundamenta en la mayor velocidad de crecimiento que tienen los organismos amonioxidantes (AOB) frente a los organismos nitritoxidantes (NOB) a altas temperaturas (>25°C), lo que permite que operando el proceso con un tiempo de retención celular (TRC) relativamente bajo los organismos NOB sean eliminados del sistema.

La tecnología SHARON se desarrolla en un reactor de flujo continuo y mezcla completa (RCTA), con temperatura de operación entre 30-40°C, pH entre 7-8, y sin recirculación de fangos (Hellings *et al.*, 1998). Debido a que no hay recirculación de fangos en el reactor, el tiempo de retención celular (TRC) es igual al tiempo de retención hidráulico (TRH). Con estas condiciones de operación y un tiempo de retención hidráulico próximo a 1 día es posible evitar la producción de nitrato al ser los organismos NOB eliminados del reactor (Mulder *et al.*, 2001; Van Loosdrecht y Salem. 2006).

La operación del proceso SHARON a bajos TRC potencia el desarrollo de organismos AOB específicos, principalmente las especies *Nitrosomonas europaea* y *Nitrosomonas eutropha*, las cuales poseen baja afinidad por el nitrógeno amoniacal (Claros *et al.*, 2010). Esta situación hace que la aplicación del proceso sea apropiada para corrientes con elevada concentración de N-amoniacal, como es el caso del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos de una EDAR, en las cuales sea más importante reducir considerablemente el elevado contenido de nitrógeno, que conseguir una concentración de nitrógeno muy baja para cumplir con el límite de vertido impuesto para el nitrógeno en la legislación. Debido a que este sobrenadante es una corriente de retorno a cabeza de planta (Figura 1.8), que representa menos del 1% del caudal afluente, pero supone entre un 15 y un 20% del nitrógeno amoniacal que ingresa a la planta, su tratamiento

mediante la tecnología SHARON resulta apropiado, y contribuye a descargar los procesos de eliminación de nitrógeno en la línea principal de agua de la EDAR al reducir considerablemente la concentración de nitrógeno a tratar en dicha línea (Van Kempen *et al.*, 2001).

La nitrificación de elevadas concentraciones de N-amoniaco hace que el pH del proceso descienda significativamente. Por cada mol de amonio (NH_4^+) oxidado se producen 2 moles de protones (H^+), de acuerdo con la Ecuación 1.1 (apartado 1.2.1.1.1). La mitad de los protones producidos pueden ser neutralizados siempre que la alcalinidad disponible en la corriente afluyente al proceso SHARON presente una relación equimolar entre el bicarbonato y el amonio ($\text{HCO}_3^-/\text{N-NH}_4=1$). La neutralización del mol de protones (H^+) restante se puede realizar, bien con la adición de una base (p. ej. hidróxido de sodio: NaOH), o bien mediante el proceso de desnitrificación. Para llevar a cabo el proceso de desnitrificación es necesario la adición de materia orgánica como fuente de carbono externa para los organismos heterótrofos desnitrificantes. La selección de una u otra alternativa para compensar el descenso del pH dependerá de las necesidades específicas de la EDAR, y el coste económico de la fuente de carbono orgánico a emplear para el proceso de desnitrificación, concibiendo esta última alternativa como la más adecuada debido al elevado coste económico que supone el control del pH mediante la adición de una base. Según Hellinga *et al.* (1998) los costes económicos derivados de emplear metanol (CH_3OH) como fuente de carbono orgánico son entre un 40 y un 50% menores de lo que supone emplear hidróxido de sodio (NaOH) para ajustar el pH. Además, el proceso de desnitrificación no sólo permite recuperar alcalinidad para amortiguar el descenso del pH, sino que completa la eliminación del nitrógeno vía nitrito de la corriente de agua residual.

El proceso de nitrificación y desnitrificación en un sistema SHARON se puede realizar en un único reactor alternando etapas aerobias y anóxicas, o en un sistema de reactores independientes, tal y como se muestra en la Figura 1.9. En la Figura 1.9a se puede observar la operación del proceso SHARON mediante ciclos de aireación intermitente que dan lugar a la alternancia de etapas aerobias y anóxicas en un único reactor; mientras que en la Figura 1.9b se muestra la operación del proceso SHARON mediante el acople de dos reactores en serie, el primero en condiciones aerobias y el segundo reactor en condiciones anóxicas. La adición de materia orgánica para llevar a cabo la desnitrificación se realiza en condiciones anóxicas en ambos esquemas de operación.

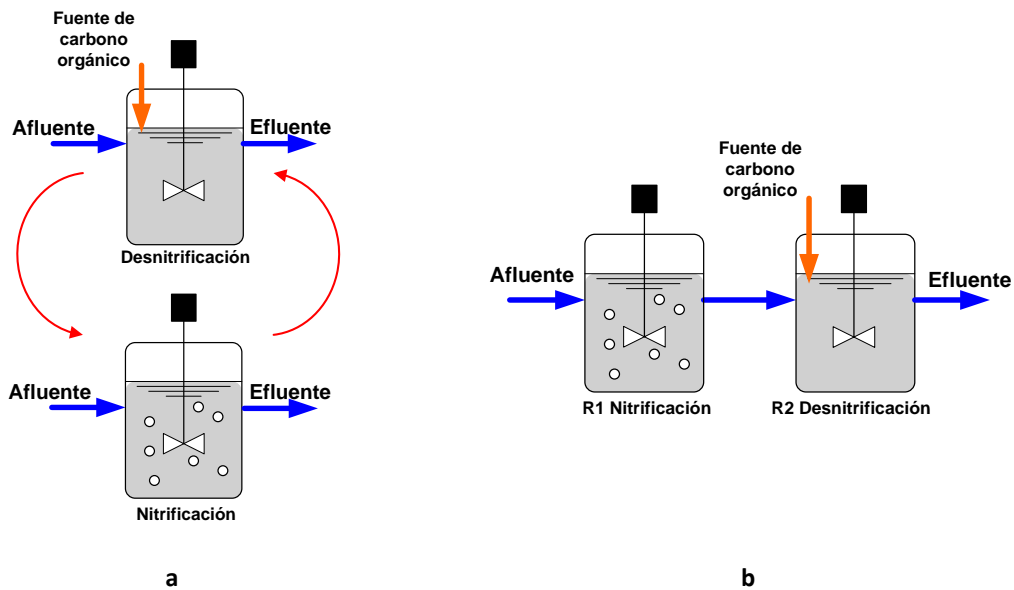


Figura 1.9 Esquemas del proceso SHARON con desnitrificación heterotrófica: a) operación en un único reactor mediante ciclos de aireación intermitente, y b) operación en dos reactores independientes, el primero en condiciones aerobias y el segundo en condiciones anóxicas.

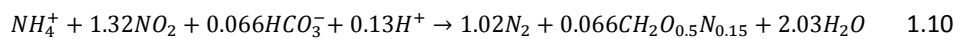
1.2.2.2 Oxidación anaerobia de amonio. Características del proceso ANAMMOX

El ANAMMOX (*Anaerobic Ammonia Oxidation*) es un proceso biológico en el que ciertos microorganismos bajo condiciones anóxicas convierten el amonio en nitrógeno gaseoso, empleando el nitrito como aceptor de electrones. La presencia de nitrito resulta imprescindible debido a que los organismos ANAMMOX presentan gran afinidad para emplearlo como aceptor de electrones. Caso contrario ocurre con el nitrato, el cual no puede ser empleado por estos microorganismos (Van Loosdrecht y Salem, 2006).

Las bacterias involucradas en el proceso ANAMMOX son organismos autótrofos, principalmente de los géneros "*Candidatus Brocadia*" y "*Candidatus Kuenenia*", que emplean el dióxido de carbono (CO_2) como fuente de carbono inorgánico. No es necesario disponer de materia orgánica externa, por lo que resulta ser un proceso de bajo coste para la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales (Van de Graaf *et al.*, 1995). No obstante, debido a las bajas velocidades de crecimiento de las bacterias involucradas en este proceso se requieren altos tiempos de retención celular (TRC) para obtener concentraciones adecuadas de biomasa. De manera generalizada se ha propuesto el desarrollo de esta tecnología mediante cultivos de soporte sólido debido a su potencial para el enriquecimiento de la biomasa (Cema *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008). Algunas alternativas de cultivos en suspensión como el reactor secuencial o SBR (Strous *et al.*, 1998; Dapena-Mora *et al.*, 2004a) y el reactor biológico de membrana (MBR) se perfilan como opciones adecuadas para la aplicación del proceso a escala industrial (Wyffels *et al.*, 2004a).

En la Ecuación 1.10 se encuentra representada la reacción bioquímica del proceso ANAMMOX, que incluye la síntesis bacteriana. La aplicación del proceso de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX) requiere de un proceso de nitrificación parcial previo, comúnmente realizado en un sistema SHARON, el cual permita obtener una relación molar entre el amonio y el nitrito ligeramente inferior a 1. La combinación de estos procesos puede realizarse mediante el acople de dos reactores en serie independientes o en un único reactor.

Oxidación
anaerobia de
amonio.
ANAMMOX



En la Figura 1.10 se encuentran representadas dos posibles rutas metabólicas del proceso ANAMMOX. Como se puede observar en esta figura, estas rutas contemplan a la hidracina (N_2H_4) y la hidroxilamina (NH_2OH) (Van de Graaf *et al.*, 1997; Schalk *et al.*, 1998), así como al óxido nítrico (NO) (Strous *et al.*, 2006) como intermediarios del proceso de oxidación anaerobia de amonio.

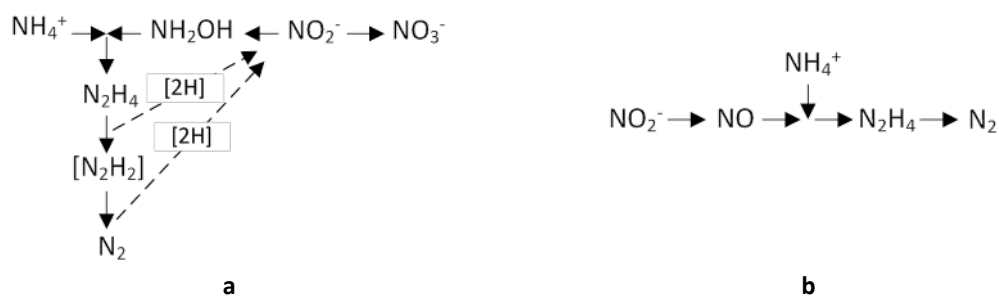


Figura 1.10. Posibles rutas metabólicas para el proceso de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX). a) Ruta metabólica propuesta por Van de Graaf *et al.*, (1997) que involucra a la hidracina (N_2H_4) y la Hidroxilamina (NH_2OH) como intermediarios. b) Ruta metabólica propuesta por Strous *et al.*, (2006) que involucra al óxido nítrico (NO) como intermediario.

Entre los factores que se han identificado como los más relevantes para alcanzar el desarrollo de los organismos ANAMMOX que permitan la operación estable en su aplicación industrial se encuentran: la temperatura, el pH, concentraciones de nitrito y amonio, ciertos componentes inhibidores y el oxígeno.

La temperatura óptima de operación se ha establecido en 40°C (Strous *et al.*, 1999), y para temperaturas menores o iguales a 10°C no se ha detectado actividad en estos organismos. El rango de pH óptimo se encuentra entre 6.7-8.3, aunque se ha llegado a detectar actividad incluso a valores de pH de 9.0 (Egli *et al.*, 2001). Las formas no ionizadas de amonio (amoníaco, NH_3) y nitrito (ácido nitroso, HNO_2) han sido identificadas como posibles inhibidores de los organismos ANAMMOX (Fux, *et al.*, 2002; Dapena-Mora *et al.*, 2007). El efecto de la inhibición depende de las

especies de microorganismos involucrados, el período de exposición y la aclimatación. Asimismo, la presencia y concentración de ciertos antibióticos, sulfuros y materia orgánica pueden ocasionar la pérdida de la actividad bacteriana (Cervantes, 2009).

Según Van de Graaf *et al.*, (1997) el oxígeno inhibe completamente la actividad de los organismos ANAMMOX, aunque esta inhibición resultó ser reversible. No obstante, Sliekers *et al.* (2002; 2003) demostraron que aunque la actividad de los organismos ANAMMOX desciende en presencia del oxígeno es posible alcanzar la eliminación completa del nitrógeno de las aguas residuales mediante el desarrollo de los organismos AOB y los organismos ANAMMOX. En este caso, el desarrollo de los organismos ANAMMOX se debe al gradiente de oxígeno en la biopelícula o el flóculo formado, que permite la existencia de zonas anóxicas en el interior de éstos.

1.2.2.3 Nitritación parcial combinada con oxidación anaerobia de amonio

Como se comentó anteriormente, la aplicación del proceso de oxidación anaerobia de amonio o ANAMMOX requiere de un proceso de nitritación parcial previo. La combinación de estos procesos puede realizarse mediante el acople de dos reactores independientes en serie o un único reactor. La disposición del sistema en reactores independientes permite una mayor flexibilidad de operación debido a que cada proceso puede ser controlado de manera independiente, obteniendo así una mayor estabilidad de operación y calidad del efluente (Van Dongen *et al.*, 2001). Por otro lado, mediante la operación combinada del proceso en un único reactor se obtienen altas velocidades de eliminación de nitrógeno por unidad de volumen (Wyffels *et al.*, 2004a), por lo que se requiere menos espacio para su construcción.

A continuación se describen las características de la combinación del proceso de nitritación parcial con el proceso ANAMMOX en dos reactores independientes y en un único reactor:

Combinación de los procesos de nitritación parcial y ANAMMOX en dos reactores independientes

La combinación de los procesos de nitritación parcial y ANAMMOX consiste en que sólo el 50% del amonio (nitritación parcial) que contiene el agua residual sea oxidado a nitrito. Este primer paso suele llevarse a cabo mediante la aplicación de la tecnología SHARON. Posteriormente, el efluente del reactor SHARON es dirigido hacia el segundo reactor para llevar a cabo la oxidación anaerobia del amonio restante, mediante la acción de los microorganismos ANAMMOX (Van Dongen *et al.*, 2001). En la Figura 1.11 se encuentra representada la combinación de los procesos SHARON y ANAMMOX en reactores independientes en serie.

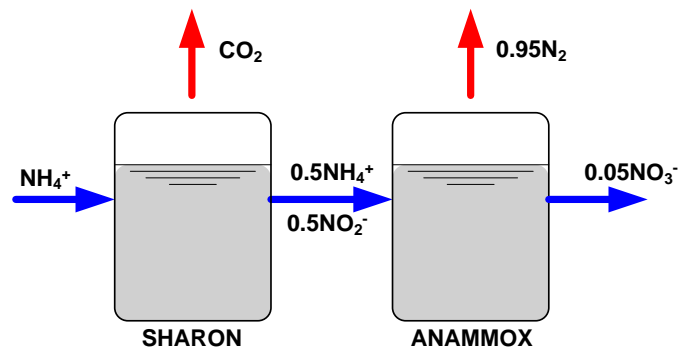


Figura 1.11. Combinación de los procesos de nitrificación parcial y oxidación anaerobia de amonio en reactores independientes: SHARON y ANAMMOX.

Combinación de los procesos de nitrificación parcial y ANAMMOX en un único reactor

Cuando la operación se lleva a cabo en un único reactor, el funcionamiento del proceso consiste en airear de manera continua el reactor, asegurando concentraciones bajas de oxígeno disuelto; de esta manera se consigue que los organismos amonioxidantes (AOB) se sitúen en la parte externa de la biopelícula. Conforme los microorganismos crecen, el espesor de la biopelícula aumenta, ocasionando que el oxígeno se consuma antes de que pueda penetrar en el interior de la misma. Por tanto, si la biopelícula permanece estable, las condiciones anóxicas en las zonas próximas a la superficie del medio de soporte o interior del flóculo permitirán el desarrollo de los organismos ANAMMOX (Sliemers *et al.*, 2002; Van Loosdrecht y Salem, 2006).

Tal y como se acaba de indicar, conseguir mantener concentraciones de oxígeno bajas es totalmente necesario para el desarrollo de ambos grupos de microorganismos. La ruta del nitrito en este tipo de sistemas se ve favorecida como consecuencia de la mayor afinidad por el oxígeno que tienen los organismos AOB frente a los organismos NOB. Además, el crecimiento de los organismos NOB se ve limitado como consecuencia de la competencia por el sustrato (NO_2^-) entre éstos y los organismos ANAMMOX bajo condiciones limitantes de oxígeno disuelto (Cervantes, 2009). Como ejemplos de esta aplicación tecnológica se encuentran el proceso CANON (Sliemers *et al.*, 2002) y el proceso OLAND (Pynaert *et al.*, 2003), que se diferencian entre sí básicamente en la configuración del reactor.

La eliminación de nitrógeno de las aguas residuales por oxidación anaerobia de amonio (combinación SHARON-ANAMMOX) es una alternativa eficiente frente a la eliminación convencional del nitrógeno vía nitrato, debido a que supone un ahorro de costes, especialmente para el tratamiento de aguas residuales que contienen altas concentraciones de nitrógeno amoniacal y carecen de materia orgánica. Este proceso es realizado por organismos autótrofos que requieren de pequeñas cantidades de oxígeno, lo que supone un ahorro de energía (menos

costes de aireación) y, dependiendo del tipo de sistema empleado y su configuración, puede llegar a suponer un ahorro de espacio debido a lo compacto que resulta este tipo de tecnologías. El consumo de oxígeno es un 63% menor y la necesidad de una fuente de carbono orgánico es inexistente (ahorro del 100%) en comparación con un proceso convencional de eliminación de nitrógeno vía nitrato (Kuai y Verstraete, 1998; Grady *et al.*, 2011).

1.2.2.4 Nitrificación y desnitrificación simultánea. Características del proceso SND

En el proceso de nitrificación y desnitrificación simultánea (SND), la eliminación biológica del nitrógeno amoniacal y nítrico se está llevando a cabo al mismo tiempo en un único reactor (Keller *et al.*, 1997; Helmer y Kunst, 1998). Se han propuesto dos mecanismos que dan respuesta a este proceso, uno de carácter físico y otro de carácter biológico (Robertson y Kuenen, 1984; Hibiya *et al.*, 2003).

El mecanismo físico se encuentra gobernado por los gradientes de concentración de oxígeno disuelto (OD) dentro de los flóculos del proceso de fangos activados o dentro de las biopelículas debido a la dificultad para su difusión a través del flóculo. En la Figura 1.12 se encuentra representado un esquema del perfil de dos flóculos de diferente tamaño. En esta figura se puede observar que el tamaño del flóculo influye en la difusión del oxígeno a través de él, lo que condiciona la existencia de zonas aerobias y anóxicas dentro del mismo flóculo. En este tipo de flóculos con zonas claramente diferenciadas, las bacterias autótrofas se distribuyen sobre la periferia del flóculo, en donde las concentraciones de oxígeno se encuentran por encima de $1-2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, mientras que las bacterias desnitrificantes se ubican en el interior del flóculo, en donde la concentración de oxígeno es muy baja (Zhu *et al.*, 2008).

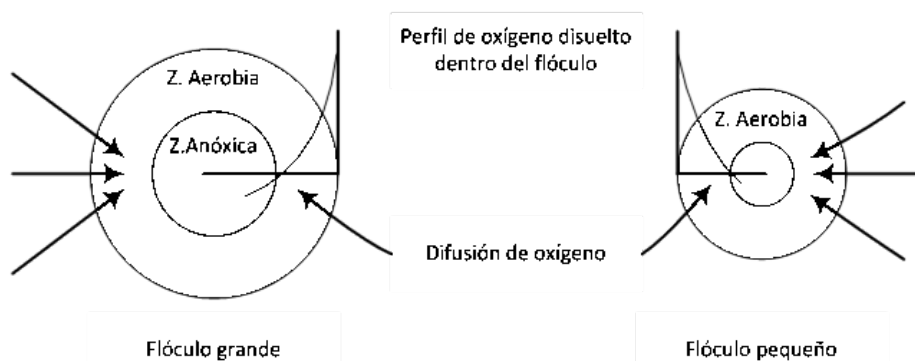


Figura 1.12. Esquema del perfil de dos flóculos microbianos de diferente tamaño en donde se indica la diferenciación entre la zona aerobia y la zona anóxica de acuerdo con la difusión del oxígeno disuelto a través del flóculo (Pochana y Keller, 1999).

Por otro lado, el mecanismo biológico responde a los procesos de oxidación de amonio por parte de microorganismos heterótrofos nitrificantes, y reducción de nitrito y nitrato por parte de organismos desnitrificantes en condiciones aerobias (Robertson *et al.*, 1988, 1995; Wyffels *et al.*, 2003). En aguas y suelos se han identificado ciertas especies de microorganismos heterótrofos nitrificantes y aerobios desnitrificantes (Patureau *et al.*, 1998; Hu y Kung, 2002; Kim *et al.*, 2005).

Dentro de los factores que condicionan la operación de un proceso de nitrificación y desnitrificación simultánea (SND) se encuentran:

- **Carbono orgánico.** Es considerado un parámetro crítico del proceso debido a que una concentración alta de materia orgánica provoca la inhibición de las bacterias autótrofas nitrificantes mientras que una concentración baja conduce al déficit de dador de electrones para las bacterias desnitrificantes (Tam *et al.*, 1992).
- **Oxígeno disuelto.** La concentración de oxígeno disuelto tiene un efecto doble sobre el rendimiento del proceso SND. Por una parte, la baja concentración de oxígeno disuelto suprime el proceso de nitrificación, mientras que altas concentraciones de oxígeno disuelto inhiben el proceso de desnitrificación (Pochana y Keller, 1999; Hu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Münch *et al.* (1996) determinaron que a concentraciones de oxígeno disuelto en torno a $0.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ las velocidades de nitrificación y desnitrificación eran iguales.
- **Tamaño del flóculo.** Desde el punto de vista físico el proceso SND tiene lugar en flóculos de tamaño grande ($>125\mu\text{m}$) debido a las limitaciones en la difusión del oxígeno disuelto (Li y Ganczarczyk, 1990, 1993; Pochana y Keller, 1999).

1.2.2.5 Potenciación de organismos nitrificantes. Características del proceso BABE

Los procesos de potenciación de organismos nitrificantes se basan en el desarrollo de la biomasa nitrificante "*in situ*" a partir de la combinación de las corrientes de sobrenadante de la digestión de fangos y de la corriente de recirculación de fangos en un reactor o sistema de reactores independientes. De esta manera, se favorece el crecimiento y la agregación de las bacterias nitrificantes en flóculos, lo que previene que sean depredadas por protozoos y favorece su permanencia en el sistema una vez el fango es decantado y recirculado nuevamente (Salem *et al.*, 2003). Mediante la utilización de corrientes secundarias generadas en la propia EDAR se potencia el crecimiento de organismos nitrificantes afines a las características del agua residual afluyente al proceso. Inicialmente se planteó la idea de alimentar el sistema de fangos activados con una corriente enriquecida con organismos nitrificantes cultivados externamente. Sin embargo, el

crecimiento de bacterias en cultivos en suspensión puede no tener los resultados deseados debido a la depredación por parte de protozoos una vez la corriente se integre en la línea de aguas de la EDAR (Van Loosdrecht y Salem, 2006), además las bacterias introducidas podrían no ser de las especies de organismos nitrificantes óptimos para la EDAR específica.

Es importante destacar que este tipo de tecnologías no se enfocan sólo a potenciar el crecimiento de organismos AOB, sino que buscan obtener la oxidación de amonio a nitrato. El potencial tóxico del nitrito y el ácido nitroso para el resto de microorganismos involucrados en la depuración de aguas, así como para las especies presentes en los ecosistemas receptores de agua residual, hacen que la acumulación de nitrito en la línea principal de agua de la EDAR no sea conveniente (Van Loosdrecht y Salem, 2006).

La aplicación de este tipo de tecnología es especialmente interesante en estaciones depuradoras construidas que se encuentran al límite de su capacidad, y requieran optimizar su funcionamiento en términos de eliminación de nitrógeno. Se aplica cuando el tiempo de retención celular aerobio es insuficiente para llevar a cabo el proceso de nitrificación, y además, se puede utilizar también para mejorar el proceso de desnitrificación mediante el incremento del tiempo de retención celular anóxico a expensas de la reducción del tiempo de retención celular aerobio. Asimismo, la introducción de un proceso de potenciación de organismos nitrificantes en el diseño de una nueva estación depuradora permite el dimensionamiento de sistemas de menor tamaño. Dentro de las aplicaciones desarrolladas que siguen el principio de potenciación de biomasa nitrificante se encuentran: **InNitri** (Kos, 1998), **ScanDeNi** (Rosén y Huijbregsen, 2003) y **BABE** (Salem *et al.*, 2002, 2003).

A modo de ejemplo, en la Figura 1.13 se encuentra representado el diagrama de flujo de una EDAR con potenciación de organismos nitrificantes en el sistema BABE (*Bio-Augmentation Batch Enhanced*). Los resultados prácticos de la implementación a escala industrial de la tecnología BABE plantean que el efecto de la acumulación de bacterias nitrificantes mejora el rendimiento de eliminación biológica de nitrógeno en un sistema de fangos activados hasta en un 60% (Van Loosdrecht y Salem, 2006), y se reduce en un 50% la superficie necesaria en comparación con sistemas convencionales de nitrificación y desnitrificación (Salem *et al.*, 2003).

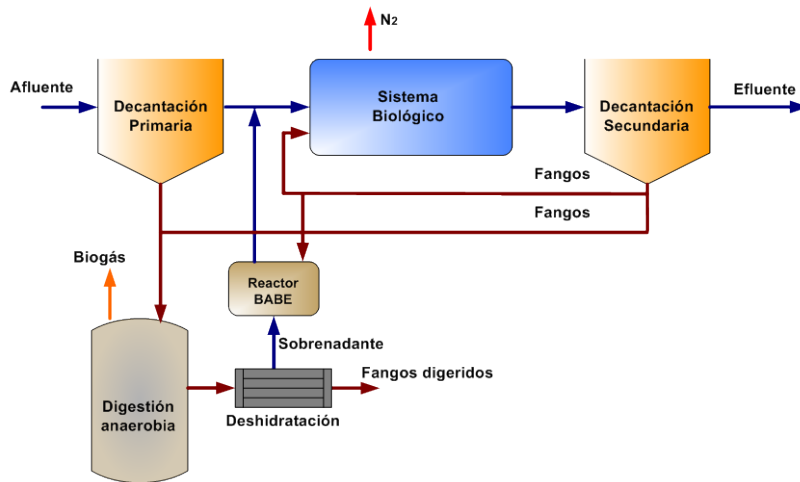


Figura 1.13. Diagrama de flujo de una EDAR con potenciación de organismos nitrificantes en un reactor BABE.

1.2.3 Microbiología asociada a la eliminación biológica del nitrógeno

Las especies microbianas involucradas en los procesos biológicos de depuración dependerán principalmente de las características del agua residual y del diseño y operación del proceso biológico. La mayoría de los microorganismos que se pueden encontrar en los fangos de un proceso de depuración pertenecen al dominio *Eubacteria*. Esto quiere decir que de los tres dominios de la vida, *Eukarya*, *Archaea* y *Bacteria* (*Eubacteria*), representados en la Figura 1.14, los organismos responsables del tratamiento biológico de las aguas residuales se encuentran principalmente en este último grupo, con algunas excepciones en cuanto a la eliminación de nitrógeno se refiere.

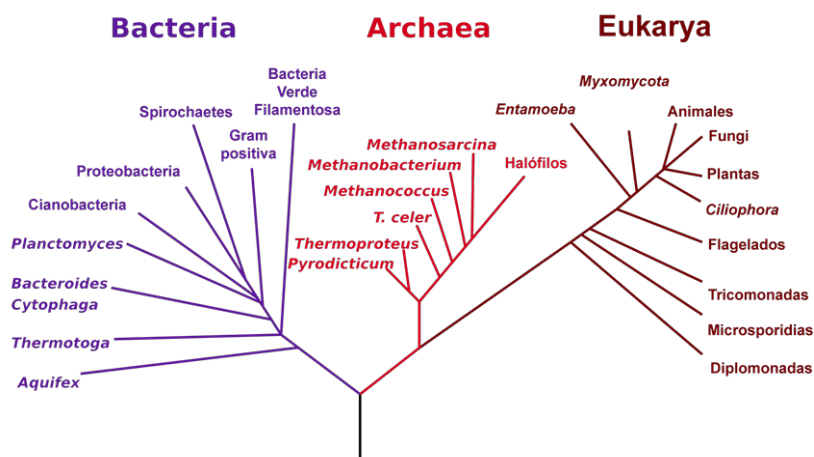


Figura 1.14. Árbol filogenético de los tres dominios de la vida. Cuanto más cerca se encuentran las ramas de dos organismos, más próximos se encuentran en términos de evolución.

En la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales participan diversos grupos de microorganismos encargados de llevar a cabo los procesos de nitrificación y desnitrificación bajo distintas condiciones de operación. Como se comentó anteriormente, el proceso de nitrificación involucra la oxidación secuencial del amonio a nitrito y posteriormente a nitrato. En los sistemas de depuración de agua residual se asume de manera general que estos dos pasos son realizados por bacterias amonioxidantes (AOB) y bacterias nitritoxidantes (NOB), respectivamente. No se tiene conocimiento de la existencia de organismos capaces de realizar la oxidación completa del amonio hasta nitrato (Nielsen *et al.*, 2009).

Recientemente se ha descubierto que algunos organismos del dominio *Archaea* son capaces de llevar a cabo el proceso de oxidación de amonio (*Archaea* amonioxidantes, AOA) en océanos y suelos bajo ciertas condiciones ambientales extremas, asociadas principalmente a ecosistemas que presentan elevada salinidad y temperatura, y muy baja disponibilidad de nutrientes (Seviour y Nielsen, 2010). La aplicación de la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en algunos sistemas de depuración de agua residual ha permitido detectar genes *amoA* que codifican la síntesis de la enzima *amonio monooxigenasa* (*Amo*), previamente aislada y estudiada en ciertos organismos AOA. El gen *amoA* de los organismos AOA difiere considerablemente del gen *amoA* presente en los organismos AOB (Schleper *et al.*, 2005). Sin embargo, la detección de este gen puede ser consecuencia de la proliferación de los organismos AOA en suelos, y no necesariamente tiene que estar ligada a la actividad nitrificante en la depuración del agua residual. Por otro lado, algunas bacterias y ciertos organismos pertenecientes al dominio *Eukarya*, principalmente del reino de los *Hongos*, pueden ser responsables de la denominada *nitrificación heterotrófica* (Ward *et al.*, 2011).

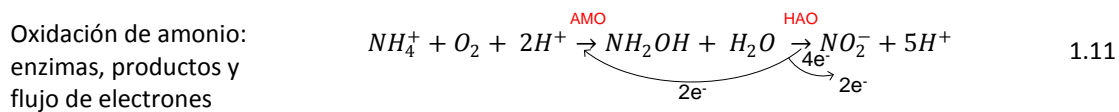
En los procesos de nitrificación y desnitrificación llevados a cabo en los sistemas de depuración de agua residual participan activamente los organismos ANAMMOX, encargados del proceso de oxidación anaerobia de amonio empleando nitrito como aceptor de electrones. Estos organismos autótrofos pertenecientes al reino *Planctomycetes* han sido detectados además en diferentes ecosistemas acuáticos y terrestres (Egli *et al.*, 2001).

En el proceso de desnitrificación participan principalmente organismos heterótrofos facultativos que llevan a cabo la reducción del nitrato o nitrito a compuestos nitrogenados gaseosos tales como óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) y nitrógeno gaseoso (N₂).

A continuación se describen las características más importantes de las especies de microorganismos involucrados en la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales.

1.2.3.1 Características de los organismos amonioxidantes (AOB)

Los organismos amonioxidantes (AOB) son responsables de la conversión del amonio a nitrito, primer paso de la reacción de nitrificación. El proceso de oxidación del amonio a nitrito se compone de dos reacciones catalizadas por dos enzimas diferentes. La enzima *amonio monooxigenasa* (AMO), ubicada en la membrana bacteriana, cataliza la transformación del amonio (NH_4^+) a hidroxilamina (NH_2OH), mientras que la enzima *hidroxilamina oxidoreductasa* (HAO), ubicada en el periplasma celular, cataliza la conversión de la hidroxilamina (NH_2OH) a nitrito (NO_2^-). En la Ecuación 1.11 se encuentran representadas las dos etapas que componen la reacción de oxidación de amonio a nitrito, con las enzimas involucradas y el flujo de electrones.



Los organismos AOB son procariotas quimioautótrofos pertenecientes a la familia *Proteobacteria*. La mayoría de estos organismos son de la clase *Betaproteobacteria*, aunque dos especies, *Nitrosococcus halophilus* y *Nitrosococcus oceanii* pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*.

Los organismos AOB de la clase *Betaproteobacteria* se dividen en cuatro géneros: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* y *Nitrosolobus*. A pesar de las diferencias morfológicas encontradas entre los últimos tres géneros, el estudio filogenético realizado por Head *et al.* (1993) y basado en el 16 rRNA planteó la posibilidad de agruparlos en el género *Nitrospira*. Por su parte, el género *Nitrosomonas* se encuentra dividido en varios linajes, de acuerdo con la Figura 1.15.

Los organismos AOB *Betaproteobacteria* se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes naturales y ecosistemas antropogénicos. Los organismos AOB pertenecientes al género *Nitrosomonas* se encuentran en hábitats acuáticos y terrestres, y ampliamente difundidos sobre sistemas de tratamiento de agua residual; mientras que los pertenecientes al género *Nitrospira* se encuentran más frecuentemente en suelos, y prácticamente ausentes en reactores de EDARs destinados a la nitrificación (Schramm *et al.*, 1998). Algunas especies de organismos AOB, como *Nitrosomonas europaea*, participan en el proceso de desnitrificación reduciendo nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O) en condiciones aerobias y microaerobias (Jetten *et al.*, 1997b).

Los organismos AOB de la clase *Gammaproteobacteria* son halófilos que se encuentran principalmente en ecosistemas marinos y salobres (Koop *et al.*, 1990). No se ha observado ni atribuido un papel significativo a estos organismos en el proceso de nitrificación que tiene lugar en el tratamiento de aguas residuales.

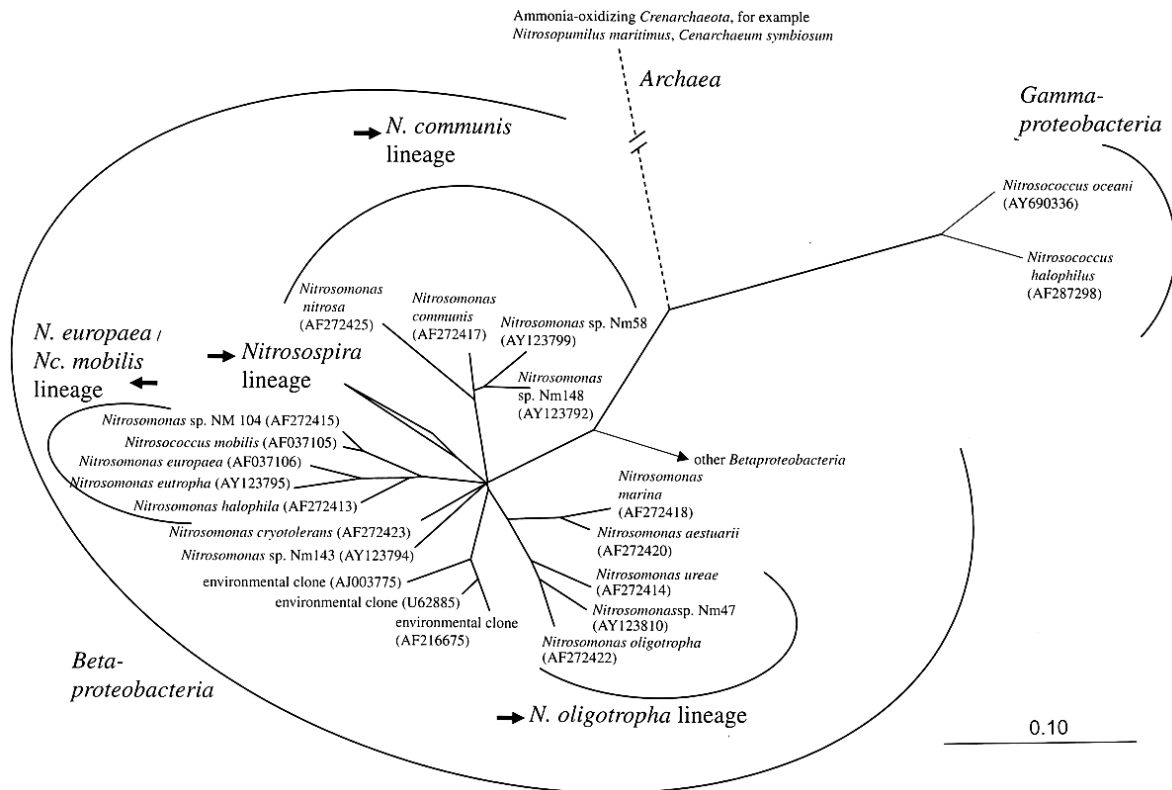


Figura 1.15. Árbol filogenético hasta ahora conocido de los organismos amonioxidantes basado en la secuencia 16S rRNA (Seviour y Nielsen, 2010).

1.2.3.2 Características de los organismos nitritoxidantes (NOB)

Los organismos nitritoxidantes (NOB) son los responsables de la conversión del nitrito a nitrato, segundo paso de la reacción de nitrificación. Esta reacción es catalizada por la enzima *nitrito oxidoreductasa* (*Nxr*).

Desde el punto de vista filogenético los organismos NOB son un grupo más heterogéneo que las bacterias AOB. En la Figura 1.16 se encuentra el árbol filogenético de los organismos NOB. Estos microorganismos son procariontes quimioautótrofos, divididos en cuatro géneros *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* y *Nitrospina*.

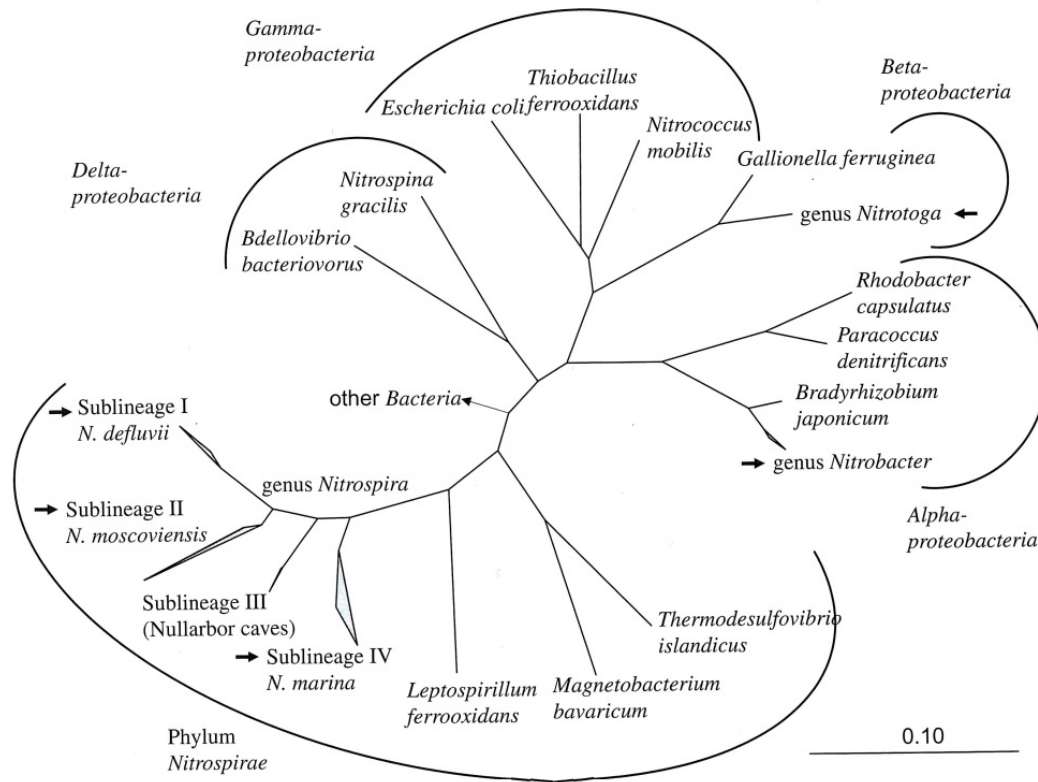


Figura 1.16. Árbol filogenético hasta ahora conocido de los organismos nitróxidos basados en la secuencia 16S rRNA (Seviour y Nielsen, 2010).

El género *Nitrobacter* perteneciente a la clase *Alphaproteobacteria* contiene las especies *N. winogradskyi*, *N. hamburgensis*, *N. vulgaris* y *N. alkalicus* (Seviour y Nielsen, 2010). Estas especies se han encontrado en diferentes ecosistemas acuáticos y terrestres, incluyendo sedimentos de lagos de alta alcalinidad (Sorokin *et al.*, 1998). Las especies *Nitrosococcus mobilis* (*Gammaproteobacteria*) y *Nitrospina gracilis* (*Deltaproteobacteria*) se encuentran relacionadas con ecosistemas marinos.

Por otro lado, el género *Nitrospira* constituye el grupo más diverso de organismos NOB conocido. Este grupo sólo contiene dos especies descritas *N. marina* (Watson *et al.*, 1986) y *N. moscoviensis* (Ehrlich *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha encontrado gran diversidad de secuencias de 16 rRNA de organismos pertenecientes al género *Nitrospira* aún no caracterizada en diversas muestras de suelo, sedimento, agua dulce y agua de mar (Daims *et al.*, 2001a). Dentro de la familia *Nitrospirae*, el género *Nitrospira* ha sido dividido en cuatro subgrupos filogenéticos I-IV (Daims *et al.*, 2001a).

Las especies del género *Nitrobacter* pueden ser enriquecidas y desarrolladas mediante incubación en sistemas de fangos activados y de soporte sólido. De hecho, estas especies fueron consideradas como los organismos NOB dominantes en los sistemas de tratamiento de agua residual. No obstante, la aplicación de técnicas más específicas para la detección microbiológica,

como es el caso de la técnica de hibridación *in situ* FISH, permitió identificar a las bacterias del género *Nitrospira* como los organismos NOB dominantes en las plantas de tratamiento de agua residual (Daims *et al.*, 2001a). Aunque los géneros de NOB *Nitrobacter* y *Nitrospira* comparten una característica fisiológica común, ambos son organismos quimiolitotrofos que pueden crecer empleando nitrito como fuente de energía, pertenecen a grupos filogenéticos completamente diferentes, que representan una diversidad ecofisiológica de importante aplicación industrial.

1.2.3.3 Características de los organismos desnitrificantes

Los microorganismos desnitrificantes pueden utilizar compuestos nitrogenados como el nitrato (NO_3^-), el nitrito (NO_2^-) y gases como el óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso (N_2O) como aceptores de electrones en su metabolismo respiratorio. El proceso de desnitrificación es generalmente considerado como un proceso anóxico, aunque hay indicios de que éste puede ocurrir en condiciones aerobias (Robertson y Kuenen, 1984). La desnitrificación a partir de nitrato integra cuatro procesos de reducción secuenciales, catalizados por diversas enzimas tal y como se muestra en la Figura 1.17.

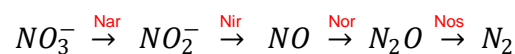


Figura 1.17 Secuencia de reducción desde nitrato hasta nitrógeno gaseoso.

La reacción bioquímica de reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) es generalmente catalizada por la enzima *nitrato reductasa* (*Nar*) localizada en la membrana celular. Existe otra clase de enzima periplasmática denominada *nitrato reductasa* (*Nap*) de diferente estructura y localización cuya actividad no es suprimida por el oxígeno (Philippot, 2002), por lo que se sugiere que está involucrada en el proceso de desnitrificación en condiciones aerobias. La reducción del nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO) se encuentra catalizada por dos enzimas *nitrito reductasas* denominadas *NirS* y *NirK*, presentes en organismos desnitrificantes. Por otro lado, la reacción de reducción del óxido nítrico (NO) a óxido nitroso (N_2O) se encuentra catalizada por la enzima *óxido nítrico reductasa* (*Nor*), localizada en la membrana celular. Esta enzima juega un papel muy importante en la prevención de la acumulación de NO, debido a que éste es tóxico para las bacterias. Finalmente, la reacción de reducción de óxido nitroso (N_2O) a nitrógeno diatómico (N_2) es catalizada por la enzima periplasmática *óxido nitroso reductasa* (*Nos*). Este paso constituye un proceso respiratorio independiente que puede darse también en algunas bacterias que no son desnitrificantes.

El proceso de desnitrificación no siempre lleva a una completa reducción hasta nitrógeno diatómico (N_2). Existen microorganismos involucrados en todas las reacciones del proceso de desnitrificación, así como microorganismos implicados en una o varias reacciones (Kampschreur, 2010). La composición bacteriana y las condiciones ambientales, así como la presencia de inhibidores y la acumulación de ciertos sustratos pueden favorecer la emisión a la atmósfera de intermediarios gaseosos del proceso de desnitrificación, como el óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O). A escala global, los microorganismos desnitrificantes no sólo juegan un papel crucial en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno y la química de la atmósfera, éstos también se encuentran implicados en la problemática del calentamiento global debido a las emisiones de intermediarios gaseosos como el óxido nitroso (N_2O), el cual tiene un impacto en el calentamiento global 300 veces mayor que el dióxido de carbono (CO_2) (Kampschreur, 2010).

Los grupos de bacterias involucradas en el proceso de desnitrificación se componen principalmente de los géneros: *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Spirillum* (Metcalf y Eddy, 1995). En algunos organismos del dominio *Arquea* y ciertos hongos también se ha identificado potencial de desnitrificación (Thorndycroft *et al.*, 2007).

1.2.3.4 Identificación y cuantificación bacteriana mediante la técnica de hibridación *in situ* FISH

La técnica de hibridación FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) es utilizada para detectar y localizar determinadas secuencias de ADN o ARN. Mediante esta técnica es posible identificar “*in situ*” organismos que pertenecen a un grupo taxonómico específico (especie, género, clase, etc.) empleando tiempos relativamente cortos. La técnica FISH utiliza secuencias de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos, denominadas sondas, que se unen a la fracción 16S del ARNr de la bacteria diana, produciendo una fluorescencia en las bacterias con la fracción de ARNr homóloga (Serafim *et al.*, 2002). La observación de los microorganismos hibridados con la sonda se realiza mediante el empleo de un microscopio específico.

Esta técnica se basa en la aplicación del proceso de hibridación que se produce entre secuencias complementarias de material genético. La doble hélice de ADN puede ser desnaturalizada, es decir, se desenrolla y se separa de las hebras que la forman mediante la aplicación de una elevada temperatura. Cuando la temperatura disminuye, las hebras se vuelven a unir por sus bases complementarias. Por tanto, una secuencia de ADN se puede unir a otra de ADN o también a una secuencia de ARN complementaria generando un híbrido: ADN-ADN o ADN-ARN. De esta manera, una secuencia de ADN o ARN de cadena simple y complementaria de la secuencia de interés (sonda) puede utilizarse para identificar, con gran precisión, la presencia de la secuencia en

preparaciones de ADN o ARN. La secuencia de bases escogida para la preparación de la sonda hace que los híbridos formados sean fácilmente detectables. Los principales obstáculos asociados con la aplicación de esta técnica están relacionados con la permeabilidad de la célula para la entrada de la sonda en su interior, y el contenido de ribosomas debido a que la sonda hibrida con el ARN ribosómico.

Las sondas pueden ser diseñadas en el propio laboratorio, o adquiridas a través de centros que se dedican a ello, y en los que se pueden adquirir las sondas marcadas con un fluorocromo específico, o incluso sin marcar. La especificidad de la sonda para hibridar con su objetivo está dada por la secuencia de nucleótidos empleada para su fabricación. Es posible ajustar la especificidad de la técnica FISH a distintos niveles filogenéticos mediante la variación de la extensión de la cadena y las condiciones de hibridación.

Para la cuantificación de las distintas especies microbianas presentes en la muestra se emplean métodos basados en el análisis de imagen (Borrás, 2008). Estos métodos consisten en la toma de un número de imágenes de campos representativos de la muestra hibridada. Posteriormente, mediante el empleo de programas de análisis de imagen se obtiene un número que representa el porcentaje de área de una especie bacteriana en la muestra.

1.3 Monitorización y control de los procesos de tratamiento de aguas residuales

Las tecnologías de instrumentación, control y automatización (ICA) permiten mejorar las condiciones de operación de los procesos a los que se aplican, y en el caso particular de una EDAR la aplicación de este tipo de tecnologías pretende conseguir una operación eficiente de la misma en lo que respecta al cumplimiento de los requisitos de vertido, minimizando los costes de operación. Por tanto, el diseño de un sistema de control se establece en base a los siguientes factores (Olsson *et al.*, 2005):

- Los **requisitos de vertido** que vendrán impuestos por la legislación vigente y las características del medio acuático receptor (sensible o no) donde la EDAR vierta su efluente.
- **Costes económicos** representados principalmente por: consumo energético derivado del sistema de aireación y los equipos de bombeo en planta; consumo de reactivos en procesos tales como *coagulación-floculación*, eliminación de fósforo por vía química; tratamiento y disposición de fangos.

El control de procesos tiene como objetivo el diseño de algoritmos de control que consigan que el proceso sobre el que se aplican se comporte según unas pautas prefijadas. Para diseñar los algoritmos de control es necesario conocer el estado del proceso a controlar, esta información es obtenida a través de los instrumentos y técnicas de medida, que permitirán monitorizar el estado del proceso en cada instante de operación. La tecnología que se encarga de investigar y desarrollar estos equipos de medición es la instrumentación. A su vez, el tipo de estructura de control que se puede aplicar sobre un proceso estará determinado por la instrumentación disponible. Finalmente, a través de la automatización, que consigue reducir la intervención humana, se diseñan los equipamientos necesarios para que las mediciones y las acciones de control sean realizadas por medio de sistemas electrónicos e informáticos.

Para el diseño de un sistema de control en una EDAR se han de tener en cuenta las siguientes características inherentes a los procesos biológicos (Rodrigo, 1997):

- ***Elevados retrasos de transporte con elevados tiempos de respuesta.*** Los retrasos de transporte son ocasionados principalmente por la extensión temporal en la que tienen lugar los procesos biológicos, la cual va a depender de la velocidad de crecimiento de los microorganismos involucrados. Este hecho se encuentra potenciado por el gran número de procesos implicados en el tratamiento, parte de los cuales tienen lugar de forma secuencial, retrasando aún más la respuesta del sistema.
- ***Dependencia histórica.*** Este factor hace referencia a que los procesos biológicos ante idénticas condiciones operativas (caudales de operación, calidad del afluente, temperatura, etc) pueden presentar comportamientos diferentes. Este fenómeno es consecuencia de la variedad de microorganismos presentes en el proceso de tratamiento de las aguas residuales.
- ***Multiparametricidad.*** Los procesos biológicos se caracterizan por un considerable número de variables y procesos que se interrelacionan entre sí.

El procedimiento general a seguir para el diseño de un sistema de control se encuentra representado en la Figura 1.18. Inicialmente, es necesario definir el objetivo específico del sistema de control a implementar en la EDAR. Posteriormente, se desarrolla la estrategia de control que permita cumplir el objetivo con el mínimo coste operacional. Para el desarrollo de la estrategia de control es necesario seleccionar las variables a controlar y manipular. Las variables manipulables son aquellas que permiten su ajuste dentro de un intervalo prefijado, ya sea mediante una acción de control manual por parte del operario de la planta o mediante la acción de un sistema de control automático, y las variables a controlar son aquellas variables medibles cuyo valor puede

ser conocido directamente a través de un instrumento de medida *on-line*. El siguiente paso corresponde con la selección de una estructura para desarrollar el sistema de control y diseñar los algoritmos que la integran. La estructura del sistema de control puede ser por retroalimentación, anticipativo y una mezcla de éstas denominada mixta. Finalmente, se calibra el sistema de control mediante el ajuste de los parámetros que definen el mismo, y tras su implementación en la EDAR se lleva a cabo la validación.

Un sistema de control se puede clasificar en función del número de variables a controlar (variables de entrada) y variables a manipular (variables de salida) en:

- SISO: una única entrada y una única salida
- SIMO: una única entrada y múltiples salidas
- MISO: múltiples entradas y una única salida
- MIMO: múltiples entradas y múltiples salidas

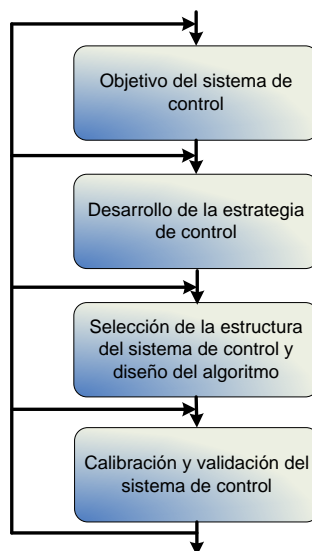


Figura 1.18. Procedimiento general para el diseño de sistemas de control en EDAR (Olsson et al., 2005).

Tal y como se comentó, la estructura del sistema de control se puede clasificar de manera general de la siguiente forma:

Sistemas de control por retroalimentación. Estos sistemas ejercen la acción de control en función de los cambios en el valor de la variable que se pretende controlar. Por tanto, el sistema actúa a posteriori, una vez se ha producido la perturbación en el proceso. La Figura 1.19 muestra un esquema donde se representa esta estructura de control, la cual suele ser la más empleada en los procesos de tratamiento de aguas residuales.

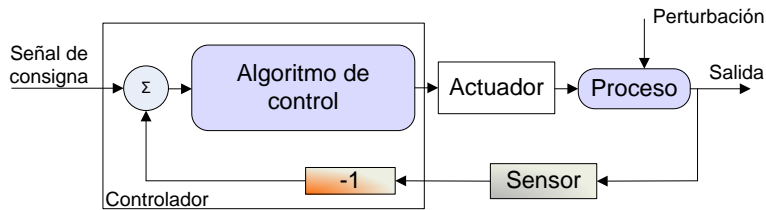


Figura 1.19. Estructura de un sistema de control por retroalimentación.

Sistemas de control anticipativo. Estos controladores ejercen la acción de control en función del valor de las perturbaciones. Actúan antes de que las perturbaciones tengan efecto sobre las variables a controlar. La Figura 1.20 muestra un esquema donde se representa esta estructura de control. El control anticipativo actúa antes de que la variable controlada se desvíe del valor de referencia. No obstante, este tipo de control precisa del conocimiento de un modelo representativo del proceso, y de la medida de las perturbaciones.

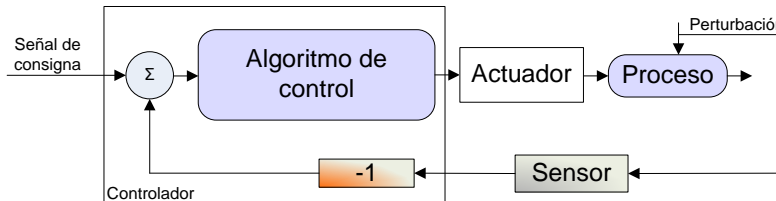


Figura 1.20. Estructura de un sistema de control anticipativo

Sistemas de control mixto (anticipativo + retroalimentación). Es un controlador donde actúan de forma conjunta un controlador anticipativo con otro de retroalimentación, de esta manera se aprovechan las ventajas que presentan ambos tipos de control (Figura 1.21).

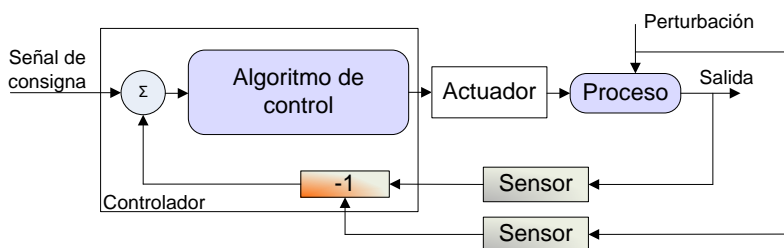


Figura 1.21. Estructura de un sistema de control mixto (anticipativo + retroalimentación)

Una vez seleccionada la estructura del sistema de control, se diseña el algoritmo de control específico. Existe una gran diversidad de algoritmos de control utilizados en procesos biológicos de tratamientos de aguas residuales. Desde controladores sencillos todo-nada, pasando por controladores PID hasta algoritmos de control avanzados basados en modelos dinámicos, redes neuronales o lógica difusa.

La complejidad del control de los procesos de tratamiento de aguas residuales, impone limitaciones severas a la aplicación de algoritmos de control convencionales, ya que en la mayoría de los casos requieren de información cualitativa y razonamiento heurístico para su resolución. El hecho de describir fenómenos cualitativos o juzgar las circunstancias que necesitarían un cambio en la acción de control, requieren de métodos de razonamiento humano. Por estas razones, el diseño de algoritmos de control basados en la lógica difusa en el campo del tratamiento de aguas residuales, ha supuesto una alternativa satisfactoria para solucionar este tipo de problemas. Son numerosas las aplicaciones de la lógica difusa al control de EDARs: Hunt *et al.*, 1992; Ferrer *et al.*, 1998; Huan y Wang., 1999; Puñal *et al.*, 2003; Chanona *et al.*, 2005; Ruano *et al.*, 2012.

1.3.1 Sistema de control basado en la lógica difusa

Las bases teóricas de la lógica difusa (*Fuzzy Logic*) fueron establecidas en 1965 por el profesor Lofti A. Zadeh de la Universidad de California en Berkeley. La lógica difusa se apoya en una rama de la inteligencia artificial que intenta reproducir la forma de pensar de los seres humanos y, por tanto, admite problemas en los que hay incertidumbre e imprecisión, al contrario de lo que sucede con la lógica clásica (*Booleana*). El aspecto central de los sistemas basados en la teoría de la lógica difusa es su capacidad de reproducir aceptablemente los modos usuales del razonamiento, considerando que la certeza de una proposición es cuestión de grado, lo cual permite manejar información de difícil especificación. Es decir, por medio de la lógica difusa pueden formularse matemáticamente expresiones imprecisas tales como “poco caliente” o “muy caliente”. De este modo, es posible representar el modo de pensar de una persona mediante un lenguaje de programación, permitiendo cuantificar aquellas descripciones imprecisas que se usan en el lenguaje cotidiano.

La lógica difusa permite representar el conocimiento común, que es mayoritariamente del tipo lingüístico cualitativo y no necesariamente cuantitativo, en un lenguaje matemático a través de la teoría de conjuntos difusos y funciones características asociadas a ellos. Los términos lingüísticos son inherentemente menos precisos que los datos numéricos, pero en muchas ocasiones aportan información más útil para el razonamiento humano. La lógica difusa proporciona un medio efectivo para interpretar la naturaleza inexacta del mundo real.

Se puede considerar a la lógica difusa como una generalización de la teoría clásica de conjuntos. En la lógica booleana sólo es posible que un objeto concreto forme parte de un conjunto (Valor 1) o que no lo forme (Valor 0) y no admite situaciones intermedias. Por el contrario, la lógica difusa hace uso del grado de pertenencia (μ) de un objeto a un conjunto y cuyo valor puede encontrarse en el rango $[0,1]$. De esta manera es posible considerar un gran número de situaciones que van

desde un valor de pertenencia 0 donde el objeto no pertenece en absoluto a un conjunto, hasta un valor de pertenencia 1 donde el objeto pertenece por completo a dicho conjunto.

Un conjunto difuso se define matemáticamente a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Conjunto difuso} \quad A = \{(x, \mu_A(x)) / x \in X\} \quad 1.11$$

donde:

- X es el dominio de la aplicación
- A es el conjunto difuso
- x es el valor de la variable física que pertenece al dominio X
- $\mu_A(x)$ es la función de pertenencia al conjunto A

La función de pertenencia representa el grado de pertenencia dentro del intervalo [0,1] del elemento x al conjunto difuso A, por lo que la pertenencia a un conjunto difuso no es absoluta sino gradual. La representación matemática de las funciones de pertenencia suelen ser funciones de tipo triangular, rectangular, trapezoidal, gaussiana o sigmoideal (Pedrycz, 1993).

Una variable lingüística es una variable cuyos valores no son numéricos, sino etiquetas lingüísticas que definen el dominio de los posibles valores de la variable lingüística. Las etiquetas lingüísticas vienen representadas por conjuntos difusos. Las expresiones lingüísticas de un sistema de control difuso, tales como “muy abierta” o “poco abierta”, se denominan etiquetas lingüísticas de una variable lingüística tal como “apertura de la válvula”.

Los sistemas de control basados en la teoría clásica de conjuntos, ya sea el control clásico o el control robusto, requieren de modelos matemáticos de los procesos a los que se pretende aplicar. En procesos complejos o cuyo comportamiento es difícil de caracterizar debido a comportamientos no lineales y/o a la incertidumbre inherente a estos, resulta muy complicado obtener un modelo matemático representativo que permita la implementación de cualquiera de estos sistemas de control.

Los sistemas de control de procesos requieren en ciertas ocasiones que operadores tomen acciones de supervisión y/o acciones correctivas. Estas acciones basadas en la experiencia y heurística acumuladas sobre el proceso permiten corregir problemas y otorgan estabilidad a los sistemas de control. El desarrollo de la teoría de conjuntos difusos ha permitido diseñar sistemas de control con capacidades semejantes a la interacción del hombre con el entorno sobre el que actúa.

El control basado en lógica difusa presenta ventajas frente a otros sistemas de control, entre las que destacan:

- No requiere de un modelo preciso del proceso a controlar.
- Facilitan la implementación de soluciones simples pero robustas que cubren un amplio rango de parámetros del proceso, lo que les otorga estabilidad ante posibles perturbaciones.
- En muchas situaciones de operación transitoria los sistemas de control basados en lógica difusa alcanzan más rápido la estabilidad en comparación con sistemas de control no difusos.
- La calibración de un sistema de control basado en lógica difusa suele resultar más robusta debido a que se puede trabajar con un elevado grado de redundancia. Además, estos sistemas de control pueden ser fácilmente reconfigurables, añadiendo y eliminando reglas.

1.3.1.1 Estructura y diseño de un sistema de control basado en lógica difusa

La teoría de la lógica difusa ha permitido la generación de modelos de representación de conocimiento que se han utilizado principalmente durante las últimas dos décadas en el diseño de algoritmos para el control de procesos.

La estructura básica de un algoritmo de control basado en lógica difusa se muestra en la Figura 1.22. En el diseño del controlador, las reglas de control, las etiquetas lingüísticas y las acciones de control, se obtienen a partir de la experiencia humana, por ejemplo las acciones que realizaría un operador cualificado.

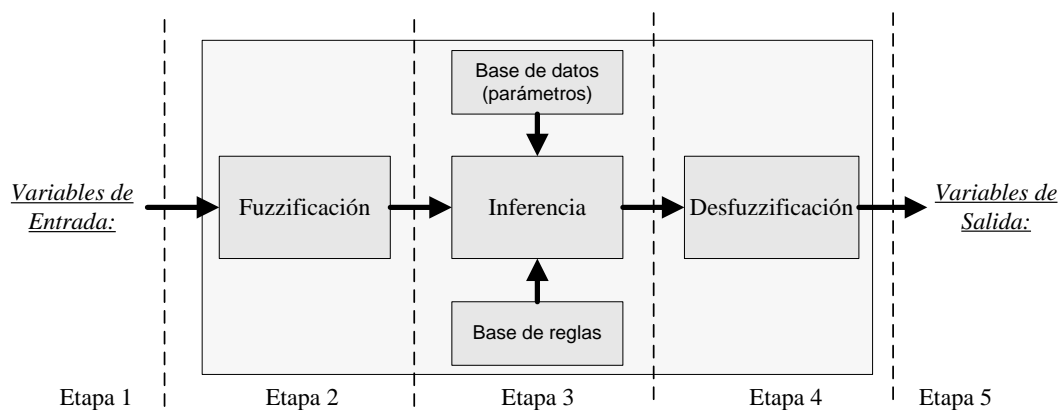


Figura 1.22. Estructura básica de un algoritmo de control basado en lógica difusa.

Tal y como muestra la Figura 1.22 el algoritmo de control basado en lógica difusa se encuentra compuesto por cinco etapas que se describen a continuación:

I. Entrada de datos físicos al controlador.

Esta etapa es análoga a cualquier algoritmo de control. Corresponde con la entrada al controlador de las variables medidas en el proceso mediante los instrumentos *on-line*.

II. Fuzzificación.

Durante esta etapa se realiza la conversión de los valores de las variables de entrada en los correspondientes valores lingüísticos asociados a cada uno de los conjuntos difusos. De esta manera se obtiene el grado de pertenencia de cada variable de entrada a cada una de las variables lingüísticas del sistema de control.

El procedimiento establecido para esta etapa consiste en especificar las etiquetas lingüísticas que definen cada variable lingüística de entrada. Cada etiqueta lingüística se representará mediante la correspondiente función de pertenencia. Las funciones de pertenencia de las etiquetas lingüísticas tienen que cubrir el rango de variación numérico de la variable de entrada. De este modo, se establecerá el grado de pertenencia de la variable de entrada en cada una de las etiquetas lingüísticas definidas.

A modo de ejemplo, en la Figura 1.23 se representa como variable de entrada la “apertura de la válvula”, donde su posición puede variar entre cero (válvula cerrada) y 100 (válvula abierta por completo), y además se encuentran definidas las etiquetas lingüísticas como: “poca”, “moderada” y “bastante”. Para la Fuzzificación de esta variable se han utilizado funciones de pertenencia de tipo gaussianas.

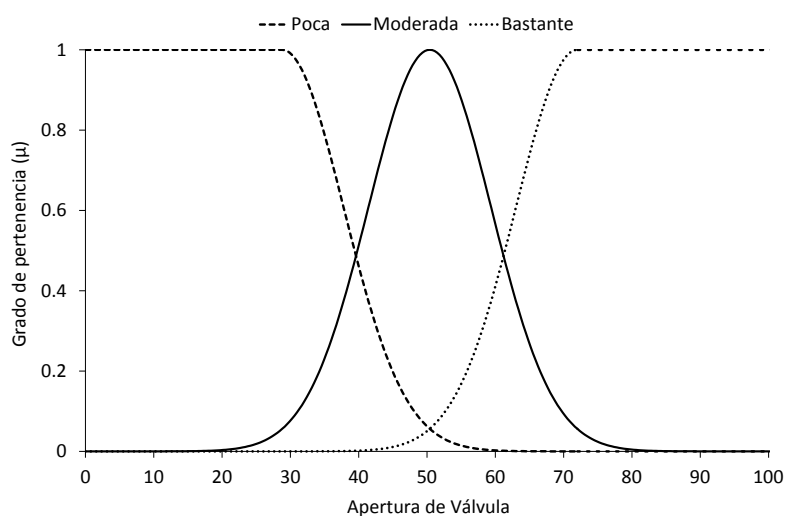


Figura 1.23. Fuzzificación de la variable de entrada “apertura de válvula”.

III. Inferencia.

Una vez obtenidos los grados de pertenencia de las variables lingüísticas de entrada a sus respectivas etiquetas, se procede al mecanismo de inferencia. Los mecanismos de inferencia se basan en relacionar los grados de pertenencia de la variable lingüística de entrada, obtenidos en la etapa de fuzzificación, con los grados de pertenencia a las etiquetas lingüísticas definidas para la variable lingüística de salida. Esta etapa hace uso de la base de conocimiento de que se dispone, la cual se estructura de la siguiente manera:

- **Base de datos:** contiene la información del número de etiquetas lingüísticas definidas para cada variable física de entrada y salida del sistema de control, junto con los parámetros que definen la función de pertenencia característica de cada etiqueta. Por tanto, en esta etapa se definirán las etiquetas de la variable de salida del sistema de control, con sus respectivas funciones de pertenencia cubriendo el rango de variación de la variable física de salida.
- **Base de reglas:** contiene el conjunto de reglas lingüísticas de control que caracterizan los objetivos y la estrategia de control definida en base al conocimiento de los expertos. Este conocimiento se expresan con sentencias del tipo: “**SI** condición de entrada **ENTONCES** acción a ejecutar”.

La inferencia difusa se lleva a cabo mediante la determinación del grado de cumplimiento de cada una de las reglas definidas en la base de reglas. Este grado de cumplimiento corresponde con el grado de pertenencia del valor numérico de la variable de entrada x a la etiqueta lingüística considerada. Si existe más de una premisa en la regla, se utilizan operadores lógicos “y” y “o” entre los grados de pertenencia de las premisas.

Los procedimientos de inferencia más empleados son la inferencia según Mandami (Max-Min), (1974) y la inferencia según Larsen (Max-Prod) (1980). De modo que, para las siguientes reglas difusas:

Regla 1: “Si x_1 es A_1 y x_2 es A_2 entonces y es B ”

Regla 2: “Si x_1 es A_2 y x_3 es A_3 entonces y es B ”

El mecanismo de inferencia, según Mandami, para el operador lógico “y” entre dos variables difusas implicadas en una misma regla, por ejemplo la Regla 1, corresponde con la siguiente expresión:

$$\mu_B(y) = \min[\mu_{A1}(x1), \mu_{A2}(x2)] \quad 1.12$$

En el mecanismo de inferencia propuesto por Larsen, para el operador lógico “y” entre dos variables difusas implicadas en una misma regla, corresponde la siguiente expresión, aplicada a manera de ejemplo sobre la Regla 1:

$$\mu_B(y) = \mu_{A1}(x1) \cdot \mu_{A2}(x2) \quad 1.13$$

Si se definen dos reglas que producen un mismo consecuente, tales como la Regla 1 y 2, se emplea el operador lógico “o”. Los dos métodos de inferencia emplean este operador para la unión de dos reglas afines aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu_B(y) = \text{Max}(\mu_B(y)_{\text{Regla 1}}, \mu_B(y)_{\text{Regla 2}}) \quad 1.14$$

donde: $\mu_B(y)_{\text{Regla 1}}$ es el grado de pertenencia de la variable y al conjunto difuso B obtenido por la Regla 1 a partir de las ecuaciones 1.12 o 1.13

Tras la evaluación de todo el conjunto de reglas difusas definida en la base de reglas, mediante uno de los mecanismos de inferencia mencionados, se obtienen los grados de pertenencia de cada una de las etiquetas lingüísticas definidas para las variables de salida.

IV. Desfuzzificación.

En esta etapa se realiza el procedimiento inverso a la etapa de fuzzificación, pero en este caso, con la variable de salida del sistema de control. A partir de los valores difusos de cada etiqueta lingüística definida para la variable de salida difusa, obtenidos en la etapa de inferencia, se determina un valor numérico de la variable de salida física. Para obtener este valor escalar de la variable de salida se aplican, generalmente, uno de los siguientes métodos matemáticos (Mendel, 1995):

- **Método del centro de gravedad:** utiliza como salida del sistema de control el centro de gravedad de la función característica de la salida. La ecuación que describe este método corresponde con:

$$\hat{y} = \frac{\int y \cdot \mu(y) \cdot dy}{\int \mu(y) \cdot dy} \quad 1.15$$

donde:

\hat{y} es la variable de salida

- **Método de la media difusa:** utiliza como salida del sistema de control el valor asignado a la función característica de salida. Mediante la aplicación de este método se reduce el número de parámetros del sistema de control a calibrar al compararlo con lo que supondría aplicar el método del centro de gravedad. Este método utiliza la siguiente ecuación:

$$\hat{y} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i \cdot \mu(y)}{\sum_{i=1}^n \mu(y)} \quad 1.16$$

donde: c_i es el centro de la función de pertenencia correspondiente

V. Salida física del sistema de control.

Esta etapa es análoga a cualquier algoritmo de control. Una vez obtenido el valor de la variable de salida física del sistema de control, este valor es enviado al actuador correspondiente, para realizar la acción de control sobre el proceso.

1.3.1.2 Calibración y validación de un sistema de control basado en lógica difusa

La calibración de un sistema de control basado en lógica difusa consiste en el ajuste de los parámetros que definen las funciones de pertenencia a cada una de las etiquetas lingüísticas que componen las variables de entrada y salida del sistema de control. Dependiendo del tipo de función de pertenencia empleada (triangular, rectangular, trapezoidal, gaussiana o sigmoideal) variará el número de parámetros a calibrar. A modo de ejemplo, en un sistema de control compuesto exclusivamente por funciones Gaussianas, el número de parámetros a calibrar será dos veces (centro y amplitud de la campana de Gauss) el número de variables lingüísticas definidas.

No hay métodos sistemáticos que permitan calibrar un sistema de control basado en lógica difusa, es decir, no hay procedimientos para el ajuste automático de los parámetros (Santos *et al.*, 1996). El método comúnmente utilizado consiste en emplear técnicas directas de *prueba-error*, modificando los parámetros y las reglas del sistema de control difuso en base a la experiencia del personal involucrado en el proceso y a los resultados obtenidos después de su implementación (Chanona *et al.*, 2006).

La Figura 1.24 muestra el procedimiento de calibración y validación de un sistema de control basado en lógica difusa aplicado recientemente para el control de un proceso biológico de eliminación de nutrientes en una EDAR (Ruano *et al.*, 2012). La aplicación de esta secuencia de pasos permite validar el funcionamiento del sistema de control difuso mediante la evaluación de su respuesta frente a diferentes condiciones de operación. En la automatización del funcionamiento de los procesos involucrados en el tratamiento de aguas residuales de una EDAR

sería recomendable llevar a cabo una evaluación previa del funcionamiento del sistema de control, la cual podría realizarse mediante el diseño y la ejecución de una batería de experimentos simples, que sean capaces de representar la variabilidad de las características involucradas en el sistema evaluado.

La calibración y validación del sistema de control puede resultar menos complicada cuando se emplean herramientas informáticas, tales como la aplicación informática Diseño de Sistemas de Control - DSC (Ruano *et al.*, 2011), para diseñar el controlador y ajustar por simulación los parámetros de partida. El uso de este tipo de herramientas resulta también muy útil para la validación previa del funcionamiento del sistema de control antes de su implementación en la EDAR.

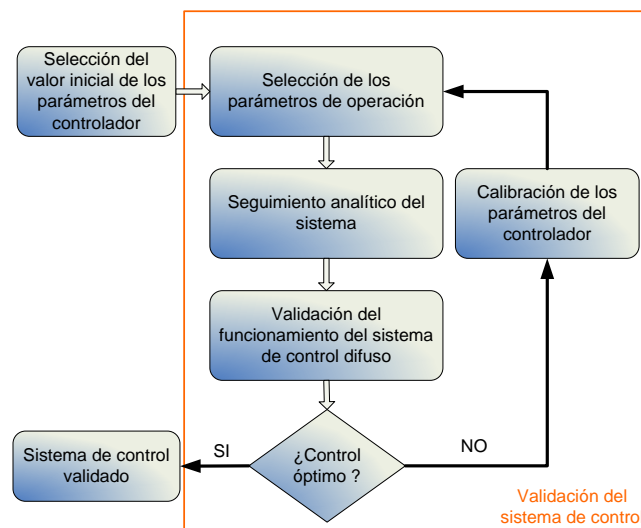


Figura 1.24. Etapas de calibración y validación de un sistema de control basado en lógica difusa.

1.3.2 Control automático de los procesos de eliminación biológica de nitrógeno

El control de la eliminación biológica de nitrógeno se basa en crear condiciones aerobias óptimas para que tenga lugar el proceso de nitrificación, y condiciones anóxicas óptimas para que tenga lugar el proceso de desnitrificación. Estas condiciones óptimas se basan, generalmente, en conseguir una eliminación de nitrógeno que cumpla con las condiciones de vertido y que minimice los costes de operación de la EDAR.

Las variables manipulables comúnmente empleadas en los sistemas de control para la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales en sistemas de fangos activados corresponden con:

- Frecuencia de trabajo de la soplante para ajustar la consigna de oxígeno en los reactores aerobios, dando lugar al proceso de nitrificación.

- Caudal de recirculación interna procedente de la zona aerobia hacia la zona anóxica. Esta recirculación transporta hacia la zona anóxica el nitrato producido en la zona aerobia, en donde tiene lugar el proceso de desnitrificación.
- Caudal de dosificación de materia orgánica externa, necesaria para que tenga lugar el proceso de desnitrificación.

La instrumentación *on-line* comúnmente utilizada para el control de la eliminación biológica de nitrógeno corresponde con analizadores de nitrato y amonio (Ingildsen y Olsson, 2002). Sin embargo, en la última década ha crecido el interés por la utilización de sensores de pH, potencial redox y oxígeno disuelto para la monitorización y el control de estos procesos (Ruano *et al.*, 2012). La utilización de este tipo de sensores, denominados de “bajo coste” se debe precisamente al elevado coste que supone la inversión y el mantenimiento de los analizadores, así como su compleja operación. La supervisión continua de los analizadores es necesaria para obtener un adecuado funcionamiento del sistema de control.

De acuerdo con Jeppson *et al.* (2002) las estrategias de control para la eliminación de nitrógeno en sistemas de fangos activados comúnmente aplicadas en las EDAR europeas corresponden con:

- **Sistema de control del proceso de nitrificación.** Consiste en modificar la consigna de oxígeno disuelto en base a la medida *on-line* de la concentración de amonio. De esta manera se minimiza el consumo energético derivado de la aireación, debido a que éste es elevado cuando se lleva a cabo la operación del proceso con consigna de oxígeno disuelto constante y aireación continua.

En la consecución de este objetivo se aplican principalmente dos estrategias de control basadas en las estructuras de control por retroalimentación y anticipativa. En el caso del sistema de control por retroalimentación, éste modifica la consigna de oxígeno disuelto del sistema de control de la aireación a partir de la medida *on-line* de amonio al final de la etapa aerobia. Por otro lado, el sistema de control anticipativo regula el perfil de la concentración de oxígeno en la etapa aerobia a partir de la medida *on-line* de amonio al principio del reactor aerobio.

- **Sistema de control del proceso de desnitrificación.** Se basa en optimizar la capacidad de desnitrificación de la etapa anóxica mediante la modificación del caudal de recirculación interna desde el reactor aerobio hacia el reactor anóxico, en los sistemas de predesnitrificación. Además, también se puede incrementar la capacidad de desnitrificación regulando la dosificación de carbono orgánico.

En general se aplican dos tipos de estrategias basadas en las estructuras de control por retroalimentación y/o anticipativo, las cuales están orientadas a modificar la recirculación de

nitrito desde la etapa aerobia hacia la etapa anóxica mediante la medida *on-line* de nitrito al final de la etapa aerobia o al final de la etapa anóxica, respectivamente. En el primero de los casos la estrategia se centra en regular el caudal de recirculación en función de la concentración de nitrito medida al final de la etapa aerobia, mientras que en el segundo caso se busca mantener una concentración de nitrito baja en la última zona anóxica aumentando la recirculación de la corriente interna. Existe una tercera estrategia que se basa en regular la dosificación de carbono orgánico en la etapa anóxica en base a la medida *on-line* de nitrito en esta etapa. En este último caso también es común encontrar controladores con estructuras basadas en retroalimentación o anticipativo.

En la Tabla 1.7 se resumen algunas de las estrategias de control diseñadas para la eliminación biológica de nitrógeno vía nitrito de las aguas residuales. En la mayoría de las estrategias de control diseñadas se emplean analizadores de amonio y nitrito a partir de los cuales es posible obtener una medida directa del contaminante. Sin embargo, elevados costes de adquisición, mantenimiento y calibración compleja y elevados tiempos de respuesta de este tipo de analizadores (por ejemplo: nutrientes, DQO y SST) hacen que su aplicación para el diseño de estrategias de control en una EDAR no sea completamente satisfactoria (Casellas *et al.*, 2006; Ruano *et al.*, 2009).

En las últimas dos décadas se ha prestado especial interés al diseño de sistemas de control a partir de medidas de pH, potencial redox y oxígeno mediante sensores *on-line*. Si bien este tipo de medidas no ofrecen información directa sobre el tipo contaminante y su concentración, su medida puede relacionarse con el estado de los procesos de eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales (Plisson-Saune *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2009). La mayoría de los sistemas de control empleando este tipo de sensores han sido desarrollados y aplicados en la operación de reactores secuenciales (SBR), alcanzándose elevados rendimientos de eliminación de nitrógeno (Akin y Ugurlu, 2005; Yang *et al.*, 2007; Won y Ra, 2011; Zanetti *et al.*, 2012). La aplicación de este tipo de sensores para diseñar sistemas de control en procesos de eliminación de nitrógeno llevados a cabo en un reactor operado en continuo (RCTA) aún es escasa (Ruano, 2012).

Por otro lado, también se han diseñado e implementado sistemas de control para los procesos de eliminación biológica de nitrógeno vía nitrito de las aguas residuales, como los que se describen a continuación:

- Volcke (2006) diseñó y evaluó mediante simulación un sistema de control para el proceso de nitrificación parcial en un reactor SHARON. Este sistema de control tuvo como objetivo ajustar la duración de la aireación para obtener un proceso de nitrificación parcial estable, y se basó en

ajustar la velocidad de flujo de aire y la adición de reactivos (ácido ó base) para controlar el pH.

- Guo *et al.* (2009) desarrollaron un sistema de control para ajustar la duración de la aireación en un proceso de nitrificación parcial. En este caso se empleó la evolución del perfil pH a lo largo de la etapa aerobia para detener la aireación. El sistema de control fue implementado y validado en un reactor secuencial (SBR) de 10 litros de capacidad.
- Gao *et al.* (2009) diseñaron un sistema de control para ajustar la duración de la etapa aerobia en un proceso operado para la nitrificación y desnitrificación vía nitrito. El sistema de control se basó en la identificación de dos puntos de corte sobre los perfiles de pH y potencial redox, que permitieron detener la aireación y así prevenir la oxidación de nitrito a nitrato. Este sistema de control fue implementado y validado en un reactor secuencial (SBR) de 38 litros de capacidad.
- Gu. *et al* (2011) desarrollaron un sistema de control que permitió llevar a cabo el proceso de nitrificación a bajas temperaturas. La estrategia de control fue diseñada a partir de la medida de pH y la frecuencia de trabajo de la soplante. Este sistema de control fue implementado y validado en un reactor secuencial (SBR).

Tabla 1.7. Estrategias de control diseñadas para la eliminación biológica de nitrógeno vía nitrato de las aguas residuales.

Proceso controlado	Estrategia de control	Tipo de sensores empleados	Referencia
Nitrificación	Apertura de las válvulas del sistema de aireación a partir de la desviación de las medidas <i>on-line</i> de amonio y nitrato con respecto a unas señales de consigna prefijadas. Las concentraciones fueron determinadas en la primera y segunda etapa de los tanques aerobios.	Analizadores de amonio y nitrato	Sloan y Pelletier, 2000
Nitrificación y desnitrificación	En la nitrificación se modifica la consigna de oxígeno disuelto a partir de la medida <i>on-line</i> de amonio al final de la etapa aerobia. En la desnitrificación se regula el caudal de recirculación aerobio-anóxico a partir de la medida de nitrato al final de la etapa aerobia y anóxica.	Analizadores de amonio y nitrato	Serralta <i>et al.</i> , 2002
Nitrificación y desnitrificación	En la nitrificación se fija la consigna de oxígeno disuelto del control de aireación del reactor aerobio en función de la concentración de amonio al final de la etapa anóxica. En la desnitrificación se regula el caudal de recirculación aerobio-anóxico en función de la concentración de nitrato al final de la etapa aerobia.	Analizadores de amonio y nitrato	Liu <i>et al.</i> , 2003
Nitrificación y desnitrificación	<i>Primera estrategia.</i> Controlador PI para el proceso de nitrificación que modifica la consigna de oxígeno del sistema de aireación en función de la concentración de amonio al final de la etapa aerobia. <i>Segunda estrategia.</i> Controlador PI para el proceso de desnitrificación que regula el caudal de recirculación interna aerobio-anóxico en función de la concentración de nitrato al final de la etapa anóxica. <i>Tercera estrategia.</i> Coordinada con la estrategia anterior, modifica la dosificación de carbono orgánico al inicio de la etapa anóxica a partir de la medida <i>on-line</i> de nitrato al final de la etapa aerobia.	Analizadores de amonio y nitrato	Ingildsen y Wendelboe, 2003
Nitrificación	Modificación de la consigna de oxígeno disuelto del sistema de control de aireación en función de la concentración de amonio en los reactores. Incluye además la modificación del volumen aerobio/anóxico en función de las concentraciones de amonio y nitrato medidas al final del segundo y cuarto reactor de un total de 6 reactores.	Analizadores de amonio y nitrato	Olsson y Ingildsen, 2003
Nitrificación y desnitrificación	Control basado en lógica difusa para ambos procesos. En la nitrificación se modifica la consigna de oxígeno disuelto del control de la aireación en función de la concentración de amonio medida en las corrientes afluente y efluente de la EDAR. En la desnitrificación se regula la dosificación de carbono orgánico para mantener la concentración de nitrato baja al final de la etapa anóxica.	Analizadores de amonio y nitrato	Yong <i>et al.</i> , 2005
Nitrificación y desnitrificación	Control PID para el proceso de nitrificación: modificación de la consigna de oxígeno en función de la concentración de amonio medida al final de la etapa aerobia, utilizando como variable de entrada al controlador la media móvil diaria de la concentración de amonio. Control PID para el proceso de desnitrificación: modificación del caudal de recirculación interna aerobio-anóxico en base a la medida de nitrato al final de la etapa anóxica.	Analizadores de amonio y nitrato	Ayasa <i>et al.</i> , 2006
Nitrificación y desnitrificación	Control basado en lógica difusa para ambos procesos. En la nitrificación se modifica la consigna de oxígeno en función de la diferencia entre dos valores de pH medidos al inicio y final de la zona aerobia. En la desnitrificación se regula el caudal de recirculación aerobio-anóxico en función de: la medida del potencial redox al final de la zona anóxica, la diferencia entre las medidas de potencial redox al final de la zona aerobia y al final de la zona anóxica, y la diferencia entre el pH medido al inicio y final de la etapa anóxica.	Sensores de pH y potencial redox	Ruano <i>et al.</i> , 2012

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) que lleva por título “Estudio de técnicas avanzadas para la eliminación de nitrógeno amoniacal en el sobrenadante de la deshidratación del fango. Aplicación al diseño y gestión de una EDAR sostenible” (CTM2005-06919-C03-01/TECNO). Además, esta tesis doctoral forma parte de la línea de investigación en eliminación de nutrientes seguida por el grupo CALAGUA; formado por personal del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente (IIAMA) de la Universidad Politécnica de Valencia y del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Valencia.

El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral es el estudio a escala de laboratorio del proceso de eliminación de nitrógeno vía nitrito, para eliminar el amonio de la corriente del sobrenadante de la deshidratación de fangos estabilizados mediante digestión anaerobia, con el fin de conocer y cuantificar la influencia que tienen diversos factores ambientales y de operación sobre el rendimiento y la estabilidad del proceso, así como de desarrollar, implementar y validar una estrategia de control que permita optimizar el funcionamiento del proceso en tiempo real. Para cumplir el objetivo principal de esta tesis se han planteado una serie de objetivos específicos, que se describen a continuación:

- Estudiar el efecto de diversos factores ambientales y de operación sobre la actividad de los organismos amonioxidantes (AOB) y sobre la calidad del efluente del proceso SHARON de nitrificación parcial.
 - Estudiar diversas estrategias de puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación parcial con el objetivo de reducir el tiempo para conseguir su puesta a punto y estabilidad.
 - Determinar la inhibición y/o toxicidad que tiene el amonio (NH_4^+) y el amoníaco (NH_3) sobre la actividad de los organismos AOB.
 - Determinar la afinidad que tienen los organismos AOB por emplear el amonio (NH_4^+) y/o el amoníaco (NH_3) como sustrato.
 - Determinar la inhibición y/o toxicidad que tiene el nitrito (NO_2^-) y el ácido nitroso (HNO_2) sobre la actividad de los organismos AOB.
 - Estudiar el efecto de la elevada salinidad sobre la actividad de los organismos AOB.
 - Estudiar el efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB.
 - Estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB.

- Estudiar el efecto de la variación del Tiempo de Retención Hidráulico (TRH) sobre las características del efluente del proceso de nitrificación parcial y las poblaciones microbianas.
- Conocer la diversidad y predominancia bacteriana dentro del grupo de organismos amonioxidantes bajo distintas condiciones experimentales.
- Desarrollar una estrategia de monitorización y un sistema de control para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito basados en la información proporcionada por sensores de bajo coste.
 - Estudiar diversas estrategias de puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito con el objetivo de obtener su puesta a punto y estabilidad.
 - Analizar la información procedente de diversos sensores de bajo coste (pH, potencial redox, oxígeno disuelto, conductividad, temperatura), y compararla con la información obtenida mediante determinaciones analíticas de la evolución de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.
 - Estudiar el proceso de desnitrificación vía nitrito empleando metanol como fuente de carbono.
 - Desarrollar una estrategia de monitorización del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.
 - Desarrollar los algoritmos de control e implementar el sistema de control mediante su programación en *Visual Basic.Net*.
 - Validar el sistema de control empleando sobrenadante sintético y real de la deshidratación de fangos estabilizados mediante digestión anaerobia de una EDAR.

Para alcanzar los objetivos trazados en este proyecto de tesis doctoral se diseñó el plan de trabajo que se detalla a continuación:

- Diseño, construcción, puesta en marcha y operación de varios montajes a escala de laboratorio donde se llevarán a cabo los procesos de nitrificación parcial, y nitrificación y desnitrificación vía nitrito adicionando una fuente externa de carbono orgánico. Por tanto, será necesario llevar a cabo las siguientes actividades:
 - Instrumentación de los montajes experimentales con sensores para la medición en tiempo real del pH, potencial redox, conductividad, temperatura y oxígeno disuelto.

- Desarrollo de un *software* para la adquisición y representación gráfica de los datos proporcionados por los sensores instalados, así como para el control del proceso operado mediante ciclos de duración fija y dosificación constante de materia orgánica.
 - Puesta en marcha, operación diaria y mantenimiento de los montajes de laboratorio. Para el funcionamiento diario de los reactores será necesario realizar una serie de tareas como: preparación del sobrenadante sintético utilizado como afluente al reactor, medida y ajuste de caudales, limpieza de las paredes de los reactores y palas de los agitadores, limpieza y calibrado de sensores, recogida y análisis de muestras, entre otros.
 - Seguimiento de la evolución de la población microbiana durante la puesta en marcha y operación de los procesos SHARON de nitrificación parcial y nitrificación y desnitrificación vía nitrito empleando la técnica de hibridación *in situ* FISH.
 - Análisis en laboratorio de los parámetros necesarios para el seguimiento de los procesos biológicos. La calidad del afluente y efluente de cada uno de los reactores será analizada siguiendo la metodología especificada en el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2005).
- Diseño y ejecución de experimentos para estudiar el efecto de diversos factores ambientales y de operación sobre la actividad de los organismos AOB y las características del efluente del proceso SHARON de nitrificación parcial.
 - Diseño de la estrategia de monitorización y del sistema de control para la optimización automática del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito, empleando metanol como fuente de carbono. El sistema de control se diseñará para ajustar automáticamente la duración de las etapas aerobia y anóxica, y optimizar la dosificación de metanol al inicio de la etapa anóxica en cada ciclo de operación. Para ello será necesario realizar las siguientes tareas:
 - Seguimiento de los procesos biológicos mediante un análisis exhaustivo de los registros proporcionados en tiempo real por los sensores instalados en los reactores (pH, temperatura, potencial redox, conductividad y oxígeno disuelto), con el objetivo de relacionar estos registros con el funcionamiento del proceso biológico. Con esta información se diseñará la estrategia de monitorización y el sistema de control del proceso, que permitirá su optimizar su funcionamiento de forma automática.

- Desarrollo de los algoritmos de control y su programación en *Visual Basic.Net*.
- Implementación y validación del sistema de control. Para la etapa de validación se llevarán a cabo una serie de experimentos en donde se variará el caudal y la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente, empleando en este caso sobrenadante sintético. Asimismo, se validará el sistema de control empleando sobrenadante de la deshidratación de fangos procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia).

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos experimentales para el estudio de los procesos biológicos de eliminación de nitrógeno de corrientes con elevada concentración de nitrógeno amoniacal, se han obtenido mediante el empleo de reactores a escala de laboratorio. En los siguientes subapartados se describirá cada uno de los montajes utilizados, tanto para la operación continua de los procesos, como para la realización de experimentos puntuales. De igual manera, se detallarán los métodos analíticos, y las técnicas de identificación y cuantificación microbiana empleados en cada ensayo, y a lo largo de todo el período experimental.

3.1 Descripción de los montajes experimentales

Todo el período experimental que comprende la presente tesis se puede dividir en varias fases de estudio, en las cuales se emplearon dos tipos de montajes experimentales. Para el estudio del proceso SHARON se emplearon tres reactores cilíndricos de metacrilato de 7 litros de capacidad. Las características de estos reactores se presentan en la Tabla 3.1. Además, se utilizó un reactor de vidrio de 0.3 litros de capacidad para llevar a cabo experimentos puntuales, empleando biomasa procedente de uno de los reactores SHARON.

Tabla 3.1. Características de los reactores utilizados para el proceso SHARON.

Forma	Cilíndrica
Material	Metacrilato
Diámetro	20 cm
Altura total	35 cm
Volumen útil	7 Litros

La distribución uniforme del licor mezcla en el interior de cada reactor SHARON se consiguió mediante un agitador mecánico de la marca *Heidolph* de 50 Hz que permite regular la velocidad de giro entre 35 y 2800 rpm. Cada sistema fue monitorizado en tiempo real mediante sensores de pH, potencial redox, conductividad, temperatura y oxígeno disuelto. El conjunto de los cuatro primeros sensores transmitió los datos al ordenador a través de un analizador multiparamétrico *Consort C861*. La concentración de oxígeno disuelto dentro de los reactores se midió empleando oxímetros de la marca *Oxi340 WTW*. De manera sistemática, a todos los sensores se les realizó operaciones de mantenimiento y calibración una vez por semana. En los ordenadores se instaló un sistema de control *on-off* para mantener la concentración de oxígeno disuelto en torno al valor de consigna deseado. Para alcanzar y

mantener estable la temperatura, los reactores fueron encamisados con un sistema de recirculación de agua procedente de un baño termostático de la marca *LAUDA ALPHA RA8*.

La fuente de carbono orgánico empleada para llevar a cabo la desnitrificación fue metanol (CH_3OH), debido a su bajo coste y fácil biodegradabilidad. Éste se dosificó de manera independiente a la corriente afluyente al reactor. Para la dosificación de metanol se empleó una unidad de dosificación de alta precisión marca *Liquino* de la firma comercial *Metrohm*. La disolución de metanol se preparó a una concentración muy elevada, con el objetivo de reducir al máximo la dilución del licor mezcla, provocada por la adición de la corriente de materia orgánica externa.

Las características específicas de operación de cada montaje experimental varían en función del estudio para el cual se emplea, por lo que resulta conveniente detallar esta información en varios subapartados que se presentan a continuación.

3.1.1 Reactores para la nitrificación parcial y para la nitrificación y desnitrificación vía nitrito

La operación del reactor SHARON se dividió en 2 fases. En una primera fase se encuentra el estudio del proceso de oxidación del 50% de amonio a nitrito (nitrificación parcial), proceso especialmente interesante por su posible acople con el proceso biológico de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX). En una segunda fase se encuentra el proceso de oxidación de amonio a nitrito y posterior reducción del nitrito a nitrógeno gas. En la Figura 3.1 se muestra un esquema y una fotografía de uno de los montajes experimentales empleados, concretamente el utilizado en la segunda fase. Se han utilizado en total, dos montajes experimentales para el proceso de nitrificación parcial (primera fase), y un montaje experimental para el proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito (segunda fase).

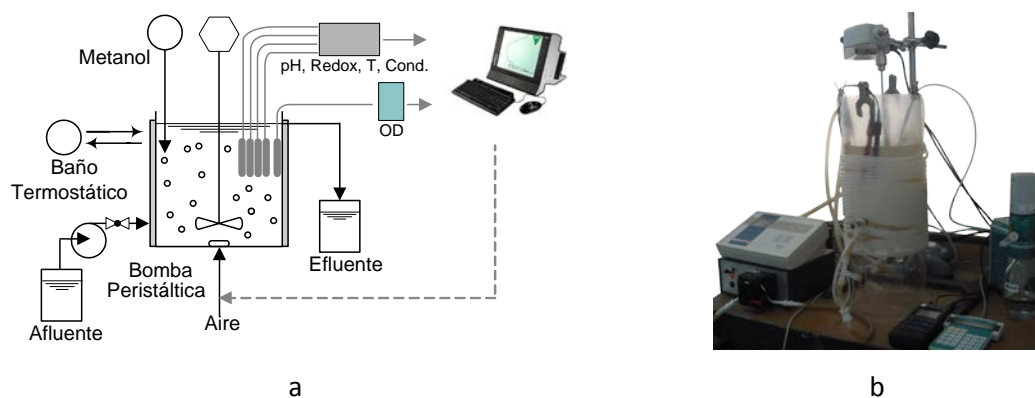


Figura 3.1. a) Esquema y b) fotografía del montaje experimental para el proceso SHARON.

Tal y como se muestra en la Figura 3.1a, el reactor dispone de una válvula en la parte inferior para la entrada del afluente mediante la acción de una bomba peristáltica, y un orificio situado en la parte superior para la salida del efluente por rebose. El sistema está instrumentado con sondas de temperatura, pH, potencial redox, conductividad y oxígeno disuelto, tal y como se comentó en el apartado anterior. Los datos de las sondas son almacenados en el ordenador, el cual se encargaba de conectar y desconectar la aireación y de dosificar el metanol. El sistema fue operado como un reactor en continuo de tanque agitado (RCTA), por lo que teóricamente, el tiempo de retención hidráulico (TRH) y el tiempo de retención celular (TRC) son iguales. Sin embargo, debido al efecto de la evaporación las relaciones matemáticas empleadas para el cálculo del TRH y TRC se describen a continuación:

$$TRC = \frac{V_R}{Q_e} \quad 3.1$$

$$TRH = \frac{V_R}{Q_a} \quad 3.2$$

donde: TRC tiempo de retención celular; TRH tiempo de retención hidráulico; V_R Volumen útil del reactor; Q_e Caudal efluente; Q_a Caudal afluente

El montaje experimental utilizado en la segunda fase es idéntico, con la excepción de la presencia de la corriente de materia orgánica externa, empleada únicamente en el estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.

3.1.2 Reactor empleado en los experimentos puntuales

Con el objetivo de determinar el efecto que ejercen diversos factores ambientales sobre la actividad de los organismos amonioxidantes (AOB), se dispuso de un montaje de laboratorio para realizar experimentos *off-line* empleando biomasa procedente de los sistemas anteriormente descritos. Las experiencias programadas en este reactor se basaron en técnicas respirométricas, ampliamente utilizadas en este campo científico, para determinar la velocidad de consumo de oxígeno (*Oxygen Uptake Rate*, OUR), y por tanto, medir la actividad celular de un cultivo, bajo determinadas condiciones.

Se utilizó un reactor encamisado de vidrio de 0.3 litros de capacidad (Figura 3.2). Éste se equipó con sensores de oxígeno disuelto, temperatura y pH (Multi-P), además de un agitador magnético para homogeneizar el licor mezcla. El ajuste del pH al valor deseado se realizó mediante la adición de base (Na_2CO_3) o ácido (HCl), según el caso, a través de dosificadores de alta precisión de la marca *Liquino (Metrohm)*. Para automatizar el ajuste del pH se utilizó un sistema de control externo de pH basado en lógica difusa desarrollado por Pastor *et al.* (2006),

el cual fue implementado en el *software* de control de este montaje experimental. La temperatura se ajustó y controló mediante la recirculación de agua proveniente de un baño termostático (*Lauda Alpha RA8*). Las consignas de oxígeno disuelto (OD), es decir, los límites superior e inferior de OD para el cálculo de la OUR, y la consigna de pH del medio fueron fácilmente manipuladas, según el experimento, a través de la interfaz de un *software* que se desarrolló e implementó en el ordenador del montaje experimental. Los datos de oxígeno disuelto obtenidos a lo largo de cada experimento fueron almacenados y procesados automáticamente para el cálculo de la OUR.

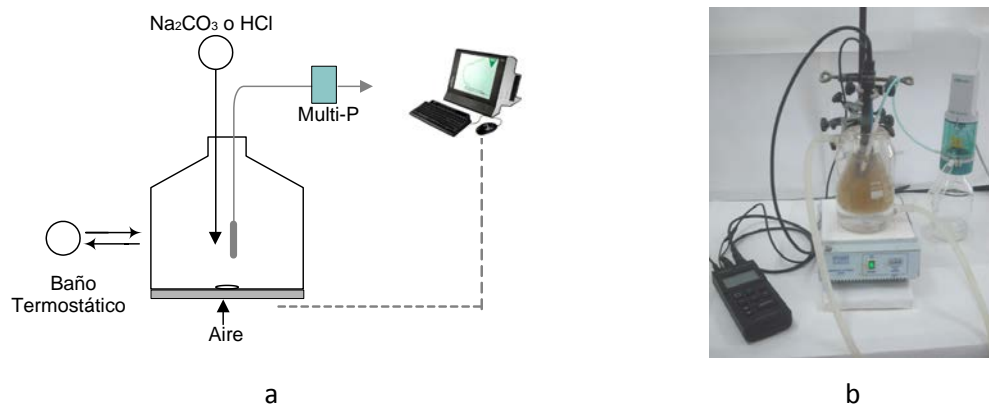


Figura 3.2. a) Esquema y b) fotografía del montaje experimental para los experimentos puntuales.

3.2 Procedimiento experimental

El procedimiento experimental seguido en esta tesis contempló la selección inicial de las condiciones de operación para llevar a cabo la puesta en marcha de los procesos biológicos de nitrificación parcial, y de nitrificación y desnitrificación vía nitrito. Una vez alcanzada la estabilidad del proceso de nitrificación parcial, se procedió a seleccionar los parámetros de operación y factores ambientales más significativos, con el objetivo de evaluar su influencia sobre la actividad de los organismos amonioxidantes (AOB). Asimismo, una vez alcanzada la estabilidad del proceso biológico de nitrificación y desnitrificación vía nitrito se evaluó su rendimiento y estabilidad en diferentes escenarios de operación. En la Figura 3.3 se encuentra esquematizado, a nivel general, el procedimiento experimental seguido en este trabajo de tesis doctoral.

Tras el análisis de la información obtenida durante la operación del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito, se procedió a desarrollar, implementar y validar un sistema de control, basado en lógica difusa, para la operación automática del proceso, empleando las señales provenientes de los sensores de pH y potencial redox.

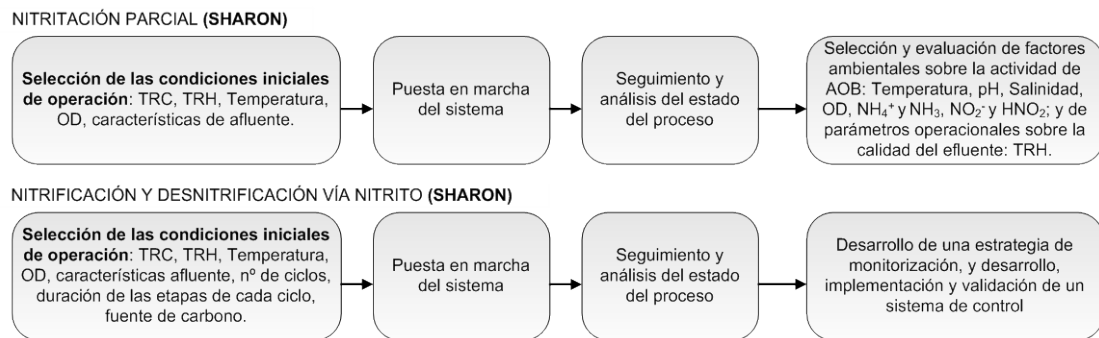


Figura 3.3. Esquema general del procedimiento experimental.

3.2.1 Estudio del proceso de nitrificación parcial

En esta primera etapa se estudió el efecto de distintos parámetros ambientales sobre la actividad de los organismos AOB durante el proceso de nitrificación parcial. El objetivo planteado comprendía la obtención de las condiciones óptimas de operación del proceso, en vista de su posible acople al proceso de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX). Se consideró importante incluir en este estudio la puesta en marcha del proceso debido a que se iba a emplear como inóculo biomasa procedente de la línea de aguas de una estación de depuración de agua residual (EDAR) convencional, la cual se encuentra adaptada a condiciones muy diferentes de las del proceso de nitrificación parcial en un reactor SHARON: bajos tiempos de retención celular y altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, principalmente. Además, al tratarse de organismos autótrofos, cuya velocidad de crecimiento es baja en comparación con los organismos heterótrofos, el tiempo necesario para completar la puesta a punto y estabilidad del proceso podría ser elevado.

El estudio del proceso de nitrificación parcial se realizó utilizando un afluente sintético, cuya composición reproduce las características del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos. Las concentraciones de los compuestos del afluente sintético utilizado se muestran en la Tabla 3.2. Como se puede observar en esta tabla, las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+) y bicarbonato (HCO_3^-) son elevadas, con una relación molar en torno a 1, y además, se utilizaron otros compuestos en concentraciones traza cuya presencia es indispensable para asegurar el desarrollo de la biomasa.

Las etapas incluidas en el estudio del proceso de nitrificación parcial comprenden la puesta en marcha, y el seguimiento y evolución del proceso de nitrificación parcial a dos valores de temperatura diferentes, concretamente 30°C y 35°C. Una vez alcanzado el proceso de nitrificación parcial, se procedió a la selección y evaluación de los factores ambientales y de operación que afectan la actividad de los organismos AOB y la calidad del efluente del proceso.

Para este estudio se emplearon dos montajes experimentales idénticos, denominados R_1 y R_2 , cuyas características se encuentran descritas en el apartado 3.1.1.

Tabla 3.2. Características del afluente al proceso de nitrificación parcial.

Compuestos principales	Concentración (mg L⁻¹)	Compuestos Traza	Concentración (mg L⁻¹)
N-NH ₄ (NH ₄ Cl)	1000	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.03
CaCl ₂	2.5	H ₃ BO ₃	0.30
MgSO ₄ ·7H ₂ O	51	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.06
K ₂ HPO ₄	14	KI	1.27
HCO ₃ ⁻	4390	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.24
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.12
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.24
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.30

El primero de los montajes experimentales (R_1) fue operado manteniendo estable el proceso de nitrificación parcial. La población de organismos AOB desarrollada en su interior se empleó para evaluar el efecto que tienen diversos factores ambientales sobre su actividad. Entre los factores ambientales evaluados se encuentran: la temperatura, el pH, la salinidad, el oxígeno disuelto (OD), y las concentraciones de amonio (NH₄⁺), amoníaco (NH₃), nitrito (NO₂⁻) y ácido nitroso (HNO₂).

El segundo montaje experimental (R_2) se empleó para evaluar el efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH) sobre las características del efluente del proceso, en vista a obtener la máxima capacidad de tratamiento del proceso SHARON operado para la nitrificación parcial.

3.2.1.1 Puesta en marcha del proceso

El período de puesta en marcha comprendió dos ensayos, en los cuales se evaluó y comparó el tiempo necesario para lograr la puesta a punto y estabilidad del proceso de nitrificación parcial. En ambos ensayos se empleó como inóculo biomasa procedente de la estación depuradora de agua residual (EDAR) de la cuenca del Carraixet (Valencia). Es importante destacar que este tipo de inóculo se encuentra adaptado a tratar corrientes de agua residual con bajas concentraciones de nitrógeno amoniacal, concentraciones por lo general inferiores a 100 mg N L⁻¹, que es lo típico de afluentes de agua residual urbana (Metcalf y Eddy, 1995). Por este motivo se consideró necesario prestar especial atención a la fase de puesta en marcha.

La primera puesta en marcha consistió en adaptar la biomasa a altas concentraciones de nitrógeno amoniacal de manera progresiva. La concentración de amonio se fue incrementando

en la corriente afluyente de manera escalonada hasta alcanzar $1000 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$. La relación molar entre la alcalinidad, medida como bicarbonato (HCO_3^-), y el nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+) también se modificó gradualmente a lo largo de esta primera puesta en marcha. La temperatura del proceso se incrementó progresivamente de 25°C a 30°C .

La segunda puesta en marcha fue encaminada a someter a la biomasa a altas concentraciones de nitrógeno amoniacal desde el inicio de operación, por lo que la concentración de nitrógeno amoniacal de $1000 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ fue introducida en la corriente afluyente al proceso desde el inicio. En este caso, la relación molar ($\text{HCO}_3^-/\text{N-NH}_4$) se mantuvo constante en un ratio de 1, que es la relación molar típica de la corriente del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos. Durante esta segunda puesta en marcha, la temperatura del reactor se mantuvo constante en 30°C en todo momento.

En las dos estrategias de puesta en marcha evaluadas la concentración de oxígeno disuelto (OD) se mantuvo en $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y el pH del medio no fue controlado.

3.2.1.2 Efecto de la concentración de amonio y amoníaco sobre la actividad de los organismos AOB

El efecto de las concentraciones de amonio (NH_4^+) y amoníaco (NH_3) sobre la actividad de los organismos AOB fue evaluado mediante una serie de experimentos *off-line*, empleando biomasa procedente del reactor SHARON de nitrificación parcial R_1 . Se utilizó para estos ensayos el montaje para los experimentos puntuales descrito en el apartado 3.1.2.

La actividad de los organismos AOB, medida a través de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), fue determinada a diferentes concentraciones de amonio y amoníaco. El rango de concentraciones evaluado comprendió desde 45 hasta $10000 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$. Los experimentos fueron realizados a cuatro valores de pH diferentes: 6.5, 7, 7.5 y 8.1. En total se realizaron cuatro experimentos con su correspondiente duplicado para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. En todos los casos la temperatura se mantuvo constante en 30°C .

Para la ejecución de cada experimento fue necesaria la preparación de la muestra. Esta preparación se realizó de la siguiente manera (Figura 3.4):

1. Extracción de una muestra de licor mezcla del reactor SHARON de nitrificación parcial que se encontraba en condiciones estables y estacionarias (reactor R_1).

2. Determinación en la muestra extraída de las concentraciones de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), ortofosfato (PO_4^{3-}), alcalinidad, sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).
3. Ajuste de las concentraciones de amonio y nitrito a los valores de partida programados para el experimento.
 - 3.1 En el caso en el que las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- de partida del experimento fueran inferiores que las concentraciones medidas de estos compuestos en el licor mezcla, se procedía a decantar el fango activado, y posteriormente, se realizaba la extracción de un determinado volumen de sobrenadante. El volumen de sobrenadante retirado dependía de las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- determinadas en el licor mezcla (numeral 2), y las concentraciones de partida de estos compuestos en cada uno de los experimentos programados. Este volumen retirado era reemplazado por alimento sintético (Tabla 3.2) sin NH_4^+ , manteniendo de esta manera la concentración original de la biomasa. Para evitar que la biomasa sufriera un choque osmótico, la sal de amonio (NH_4Cl), habitualmente empleada en la preparación del alimento, era reemplazada por cloruro de sodio (NaCl).
 - 3.2 En el caso en el que las concentraciones de NH_4^+ y NO_2^- de partida del experimento fueran superiores que las concentraciones medidas de estos compuestos en el licor mezcla, se procedía a adicionar las sales de cloruro de amonio (NH_4Cl) y nitrito de sodio (NaNO_2), según correspondiera, para ajustar en cada experimento las concentraciones iniciales de amonio y nitrito, respectivamente.
4. Confirmación de las condiciones de partida programadas para cada uno de los experimentos determinando analíticamente las concentraciones de los compuestos medidos en el numeral 2.

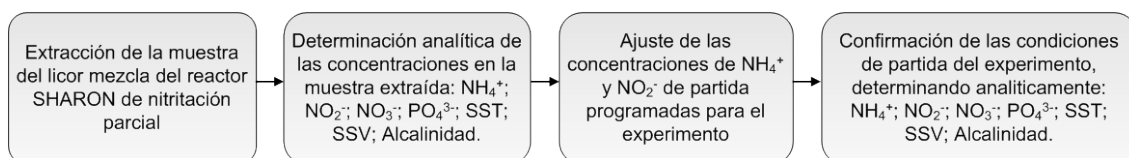


Figura 3.4. Diagrama de la secuencia seguida para la preparación de la muestra.

En los experimentos la concentración de amoníaco (NH_3) fue calculada a través de las Ecuaciones 3.3, 3.4 y 3.5 de equilibrio ácido-base a 30°C (Anthonisen *et al.*, 1976). La OUR fue medida en cada nivel de concentración de amonio durante aproximadamente 1 hora.

$$TAN = NH_4^+ + NH_3 \quad 3.3$$

$$\text{Equilibrio químico } NH_3/NH_4^+ \quad Ke^{NH} = \frac{-6344}{e^{T+273}} = 8.09 \cdot 10^{-9} \quad 3.4$$

$$NH_3 = \frac{TAN}{1 + \frac{10^{-pH}}{Ke^{NH}}} \quad 3.5$$

donde, Ke^{NH} (mol L^{-1}) es la constante de equilibrio químico a la temperatura T ($^{\circ}\text{C}$)

3.2.1.3 Efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB

El efecto de la salinidad fue evaluado con el objetivo de determinar la reducción en la actividad de los organismos AOB como consecuencia de la alta salinidad, propia de sistemas biológicos de tratamiento de corrientes de agua residual con alta concentración de nitrógeno amoniacal. Para la ejecución de estos experimentos, las muestras fueron preparadas siguiendo la metodología mostrada en la Figura 3.4 (apartado 3.2.1.2). Se utilizó el montaje para los experimentos puntuales descrito en el apartado 3.1.2.

Se realizaron un total de ocho experimentos empleando diferentes sales con y sin amonio: nitrato de amonio (NH_4NO_3), sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), nitrato de amonio y cloruro de sodio ($NH_4NO_3:NaCl$), cloruro de sodio ($NaCl$), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$). Algunos de los experimentos fueron realizados por duplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. El rango de evaluación de la salinidad estuvo entre 0.07 y 0.68 M, y la OUR fue determinada en cada nivel de concentración de sal durante al menos 1 hora. En los experimentos en los que se emplearon sales sin amonio, se adicionó 1000 mg N- $NH_4 L^{-1}$ como concentración de partida para evitar la reducción de la actividad de los organismos AOB por falta de sustrato. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a pH 7 y una temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.4 Efecto de la concentración de nitrito y ácido nitroso sobre la actividad de los organismos AOB

El efecto de las concentraciones de nitrito (NO_2^-) y ácido nitroso (HNO_2) sobre la actividad de los organismos AOB fue evaluado mediante la ejecución de tres experimentos realizado cada uno de ellos a un valor de pH diferente: 6.25, 6.5 y 7. La biomasa objeto de estudio fue extraída del reactor SHARON de nitrificación parcial que se mantuvo en condiciones estables (reactor R_1). La preparación de la muestra para realizar cada experimento siguió la metodología mostrada en la Figura 3.4 (apartado 3.2.1.2). Los ensayos fueron realizados

empleando el montaje experimental descrito en el apartado 3.1.2, manteniendo la temperatura constante en 30°C.

Las concentraciones totales de nitrito (TNO₂) estudiadas fueron ajustadas mediante la adición de nitrito sódico (NaNO₂), en un rango de concentración comprendido entre 75 y 5000 mg N-NO₂ L⁻¹. En cada nivel de concentración evaluado, la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) fue determinada durante aproximadamente 1 hora. Con el objetivo de asegurar la presencia de sustrato suficiente para los organismos AOB, se adicionó 1000 mg N-NH₄ L⁻¹ al inicio de cada uno de los experimentos. La concentración de ácido nitroso (HNO₂) fue calculada a través de las ecuaciones 3.6, 3.7 y 3.8 de equilibrio ácido-base a 30°C (Anthonisen *et al.*, 1976).

$$TNO = NO_2^- + HNO_2 \quad 3.6$$

$$Ke^{NO} = \frac{-2300}{e^{T+273}} = 5.05 \cdot 10^{-4} \quad 3.7$$

Equilibrio químico HNO₂/NO₂⁻

$$HNO_2 = \frac{TNO}{1 + \frac{Ke^{NO}}{10^{-pH}}} \quad 3.8$$

donde, Ke^{NO} (mol L⁻¹) es la constante de equilibrio químico a la temperatura T (°C)

3.2.1.5 Efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB

El efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB fue evaluado en un rango comprendido entre 6 y 9, con escalones de 0.5 unidades. La metodología experimental consistió en determinar la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), durante al menos 1 hora, en cada escalón de pH. El valor del pH se ajustó de manera automática mediante la adición de carbonato de sodio (Na₂CO₃). Los ensayos fueron realizados a temperatura constante de 30°C, empleando el montaje experimental para experimentos puntuales descrito en el apartado 3.1.2. La biomasa fue extraída del reactor SHARON de nitrificación parcial operado en condiciones estables (reactor R₁).

Se realizaron un total de nueve experimentos a diferentes concentraciones de amonio y nitrito. Para el ajuste inicial de estas concentraciones fue necesario preparar la muestra siguiendo la metodología mostrada en la Figura 3.4 (apartado 3.2.1.2). En todos los casos, los experimentos fueron realizados por duplicado con el objetivo de confirmar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

3.2.1.6 Efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB

El efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB fue evaluada mediante dos grupos de experimentos, en los que se empleó biomasa procedente del reactor SHARON de nitrificación parcial operado en condiciones estables (reactor R₁). Tal y como se comentó en el apartado 3.2.1, la operación de este reactor fue dividida en dos períodos, en los que la temperatura se mantuvo constante en 30 y 35°C, respectivamente. Las concentraciones de amonio y nitrito de partida en cada experimento corresponden a las obtenidas en el reactor R₁ en el momento de la extracción de la biomasa. Los ensayos se realizaron empleando el montaje experimental para experimentos puntuales descrito en el apartado 3.1.2. El valor del pH se mantuvo constante en 7 a lo largo de cada experimento.

En el primer grupo de experimentos la biomasa fue sometida a incrementos progresivos de la temperatura, en un rango comprendido entre 15 y 45°C, siguiendo la metodología que se describe a continuación:

1. Extracción de la muestra del reactor SHARON de nitrificación parcial operado en condiciones estables (reactor R1).
2. Determinación de las concentraciones de amonio y nitrito, con el objetivo de comprobar que la actividad de los organismos AOB no estuviera limitada por déficit de sustrato y que la concentración de ácido nitroso presente en el licor mezcla no fuera lo suficientemente alta como para inhibir la actividad de los organismos AOB.
3. Evaluación de la actividad bacteriana en el rango de temperatura establecido. La temperatura de partida de los experimentos fue 15°C, y a partir de este valor, se realizaron incrementos de la temperatura en intervalos de 5°C, hasta alcanzar 45°C. En cada escalón de temperatura la actividad de los organismos AOB, medida como la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), fue determinada durante aproximadamente 1 hora.

Seguindo la metodología anteriormente descrita se realizaron un total de cuatro ensayos, dos ensayos cuando la biomasa estaba aclimatada a 30°C y dos ensayos cuando la biomasa estaba aclimatada a 35°C.

Por otra parte, se realizó un segundo grupo de experimentos en los que se determinó la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) a un valor fijo de temperatura durante aproximadamente 8 horas, empleando en este caso biomasa procedente del reactor SHARON R₁ durante el período en el que la temperatura de operación fue de 30°C. Estos experimentos se realizaron siguiendo los numerales 1 y 2 de la metodología descrita en este apartado, y

posteriormente, se ajustó el *setpoint* de control de temperatura al valor establecido para cada uno de los experimentos. Los valores de temperatura evaluados en este segundo grupo de experimentos fueron 30°C, 35°C, 40°C y 45°C.

3.2.1.7 Efecto del tiempo de retención hidráulico sobre las características del efluente

El TRH y el TRC son parámetros de operación muy importantes para las poblaciones microbianas que intervienen en los procesos biológicos de depuración. Al ser un proceso operado en continuo (RCTA) sin recirculación de fangos, el TRH es igual al TRC. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la variación del TRH sobre las características del efluente del proceso de nitrificación parcial y las poblaciones microbianas involucradas. El estudio incluye la evaluación del efecto del TRH a dos valores de temperatura diferente, 30°C y 35°C. La evaluación de estos parámetros fue realizada empleando el reactor SHARON de nitrificación parcial R₂.

La metodología seguida consistió en incrementar el caudal afluente al proceso de manera escalonada, evaluando la estabilidad y rendimiento del proceso en cada escalón. Las características de la corriente de agua residual afluente empleada en este estudio están descritas en la Tabla 3.2. La consigna de oxígeno disuelto se estableció en 2 mg O₂ L⁻¹. El pH del proceso fue un parámetro no ajustado durante la mayor parte de este estudio. En los períodos en los que se realizó un control de pH se adicionó ácido clorhídrico (HCl, 0.5M).

3.2.2 Estudio del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito

El estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito fue realizado empleando el montaje experimental descrito en la sección 3.1.1. Este estudio fue estructurado en dos bloques: el primero de los bloques correspondió a la puesta en marcha, seguimiento y evaluación del rendimiento del proceso de eliminación biológica de nitrógeno amoniacal vía nitrito. El segundo bloque experimental fue enfocado hacia la monitorización y control automático del proceso mediante la utilización de sensores de pH, potencial redox y oxígeno disuelto (DO).

3.2.2.1 Puesta en marcha del proceso

La puesta en marcha y operación del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito fue realizada mediante la alternancia de etapas aerobias y anóxicas en el reactor SHARON. En la Tabla 3.3 se encuentran las condiciones establecidas en cada uno de los períodos de puesta en marcha del proceso. Se realizaron tres estudios utilizando diferentes inóculos, en los cuales se

pretendía determinar la forma de poner en marcha el proceso, centrando el interés en conseguir el funcionamiento acoplado de la nitrificación y desnitrificación vía nitrito. La temperatura de operación fue un parámetro que se modificó entre las estrategias de puesta en marcha II y III. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo constante en $2.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ y el pH del reactor no fue controlado en ninguna de las tres puestas en marcha. Los porcentajes de duración de las etapas aerobia y anóxica de cada ciclo de operación fueron modificados en la estrategia de puesta en marcha I, mientras que en las estrategias de puesta en marcha II y III se mantuvieron constantes.

Tabla 3.3. Puestas en marcha del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.

Puesta en marcha	Inóculo	T (°C)	pH	Caudal Afluyente (L d^{-1})	OD ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)	Ciclos por día	Etapa (%)	
							Ae	Ax
I	SHARON nitritación parcial	30	Sin control	3 – 1.5	2.5	12-6	66.6-50	33.4-50
II	EDAR urbana	30	Sin control	1.5	2.5	6	66.6	33.4
III	EDAR urbana	35	Sin control	1.5	2.5	6	66.6	33.4

En la primera puesta en marcha del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito se empleó como inóculo biomasa procedente del reactor SHARON de nitritación parcial. Dado que esta biomasa se encuentra enriquecida con organismos amonioxidantes adaptados a altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, lo que se pretendió con este experimento fue desarrollar una población de bacterias heterótrofas, capaz de desnitrificar a partir de nitrito en altas concentraciones. Las características de la corriente afluyente empleada en la primera puesta en marcha se encuentran descritas en la Tabla 3.2 (apartado 3.2.1). Con el objetivo de potenciar el desarrollo de los organismos desnitrificantes, y evitar la posible inhibición de los organismos AOB, la cantidad de metanol dosificada al inicio de la etapa anóxica de cada ciclo de operación se incrementó de manera progresiva, hasta alcanzar la relación estequiométrica determinada a partir de la Ecuación 1.9 del apartado 1.2.2.

En la segunda y tercera estrategia de puesta en marcha se evaluó la puesta en marcha utilizando biomasa procedente de una EDAR con tratamiento convencional, en la que el nitrógeno amoniacal era eliminado siguiendo la ruta del nitrato. Este inóculo no se encontraba aclimatado a altas concentraciones de amonio y nitrito, por lo que en estos experimentos se pretendía conocer la posibilidad de adaptación de los microorganismos desnitrificantes a las altas concentraciones de amonio y nitrito. Las características finales de la corriente afluyente empleada en las estrategias de puesta en marcha II y III se encuentran en la Tabla 3.4. Las concentraciones de amonio y la alcalinidad fueron incrementadas de manera progresiva a lo

largo del período experimental hasta alcanzar 500 mg N-NH₄ L⁻¹ y 2256 mg HCO₃⁻ L⁻¹ respectivamente.

Tabla 3.4. Características del afluente al proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en las puesta en marcha II y III.

Compuestos principales	Concentración (mg L ⁻¹)	Compuestos Traza	Concentración (mg L ⁻¹)
N-NH ₄ (NH ₄ Cl)	50 - 500	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.03
CaCl ₂	2.5	H ₃ BO ₃	0.30
MgSO ₄ ·7H ₂ O	51	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.06
K ₂ HPO ₄	14	KI	1.27
HCO ₃ ⁻	225 - 2256	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.24
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.12
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.24
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.30

Tras completar la puesta en marcha del proceso, el siguiente paso consistió en evaluar la estabilidad y el rendimiento de la eliminación de nitrógeno bajo distintas condiciones de operación, para lo cual se realizaron cambios en la duración de las etapas aerobia y anóxica, así como en la dosis de metanol en determinados ciclos de operación para reducir el nitrito en condiciones anóxicas. Asimismo, se realizó un seguimiento microbiológico empleando la técnica de hibridación *in situ* FISH, con el objetivo de conocer las especies de organismos amonioxidantes (AOB) predominantes en el reactor SHARON, y confirmar la ausencia de los organismos nitritoxidantes (NOB). Las sondas de hibridación empleadas se describen posteriormente en el apartado 3.3.2.1.

3.2.2.2 Monitorización y control automático del proceso

La automatización del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito se centró en dos aspectos fundamentales, el control de la duración de las etapas aerobias y anóxicas, y la optimización de la dosificación de materia orgánica externa. Estos aspectos afectan directamente a la calidad del efluente del proceso y a los costes económicos derivados de su operación.

Para automatizar el proceso es necesario disponer de información del estado en que se encuentra el proceso biológico en cada momento. Por este motivo, inicialmente se llevó a cabo una etapa de monitorización del proceso que consistió en el análisis de la información aportada por las señales de los sensores de pH, potencial redox y oxígeno disuelto que estaban instalados en el reactor, y su relación con las concentraciones de los compuestos nitrogenados determinados analíticamente durante las etapas de puesta en marcha y seguimiento. Durante

esta etapa de monitorización se establecieron los criterios generales para conseguir un funcionamiento óptimo del proceso, así como el diseño de un protocolo para la detección de fallos, que pueden causar el deterioro del proceso de eliminación biológica de nitrógeno vía nitrito.

A partir de la etapa de monitorización se procedió al diseño de la estrategia de control, que permitiera la optimización de la operación en tiempo real del proceso biológico. Debido a la complejidad del proceso, se empleó la lógica difusa para el diseño de los algoritmos de control. La teoría que soporta la base de la lógica difusa se encuentra descrita en el apartado de introducción (1.3.1). Posteriormente, se implementó la estrategia de control en el ordenador que gobierna el proceso mediante su programación en el entorno de *Visual Basic.Net*. Una vez implementada la estrategia de control se procedió a su validación mediante el uso de las siguientes corrientes: sobrenadante sintético cuyas características reproducen la composición típica del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos (las características de esta corriente se muestran en la Tabla 3.4), y sobrenadante real de la EDAR de la cuenca del Carraixet (las características de este sobrenadante se muestran en la Tabla 3.5). La validación del controlador empleando esta corriente procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet permitió contrastar el funcionamiento del controlador ante fluctuaciones reales de la concentración de nitrógeno amoniacal.

Tabla 3.5. Características del sobrenadante deshidratado de la digestión anaerobia de fangos de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia) que fue utilizado como afluente al proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito para la validación del sistema de control.

Compuestos	Concentración media	Desviación Estándar	n
DQO soluble (mg L ⁻¹)	150	10	20
NH ₄ ⁺ (mg N L ⁻¹)	615	90	20
NO ₂ ⁻ (mg N L ⁻¹)	0.1	0	20
NO ₃ ⁻ (mg N L ⁻¹)	3.6	3	20
PO ₄ ³⁺ (mg P L ⁻¹)	12	1	20
Alcalinidad (mgHCO ₃ L ⁻¹)	2700	600	20
pH	7.7	0.1	20
SST (mg L ⁻¹)	134	50	20
SSV (mg L ⁻¹)	75	18	20

3.3 Métodos analíticos y microbiológicos

3.3.1 Métodos de análisis de contaminantes en las aguas residuales

3.3.1.1 Amonio, nitrito, nitrato y ortofosfato

Las concentraciones de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) y ortofosfato (PO_4^{3-}) fueron determinadas inicialmente por cromatografía iónica. El equipo empleado fue un *IC modelo 761 Compact* de la casa comercial *Metrohm*. También se emplearon otros métodos de análisis propuestos por el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA/WEF, 2005), y equipos como el analizador multiparamétrico *SmartChem200* de la casa *Metrohm*.

3.3.1.2 Nitrógeno total

Se utilizó el test de determinación de nitrógeno total de la firma Merck. Los compuestos orgánicos e inorgánicos de nitrógeno se transforman en nitratos por el método de *Koroleff* por tratamiento con un oxidante en un termorreactor. Estos nitratos, en solución sulfúrica y fosfórica forman con 2,6-dimetilfenol (DMP) el compuesto 4-nitro-2,6-dimetil-fenol que se determina fotométricamente a 338 nm empleando un espectrofotómetro (*Spectroquant VEGA 400*).

3.3.1.3 Sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles

La concentración de *sólidos suspendidos totales (SST)* se determina mediante el paso de una muestra a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm . Posteriormente, se pesa el material retenido una vez se haya eliminado la humedad a 105°C en una estufa. El incremento en el peso del filtro representa la cantidad de sólidos suspendidos totales en la muestra. Los *sólidos suspendidos volátiles (SSV)* y los sólidos suspendidos *no volátiles (SSNV)* se determinan mediante la calcinación de los sólidos suspendidos totales a 550°C (APHA/AWWA/WEF, 2005).

3.3.1.4 Alcalinidad

Para la determinación de la alcalinidad se ha empleado el método de valoración ácido-base propuesto por Moosbrugger *et al.* (1992). El método consiste en la valoración de una muestra con una concentración conocida de HCl (0.1N) hasta alcanzar valores de pH de 6.7, 5.9, 5.2 y 4.3. Posteriormente, a partir de cálculos de equilibrio químico que consideran las concentraciones de especies químicas como: fosfato, amonio y sulfuro, pH y temperatura inicial de la muestra, volumen de muestra empleada, y los volúmenes de HCl adicionados para

alcanzar los respectivos valores de pH antes citados; se calcula la alcalinidad asociada al carbonato y se expresa como carbonato de calcio (CaCO_3). El equipo utilizado para llevar a cabo este análisis es un valorador (titrador) marca 716 *DMS Titrino* de la firma comercial *Metrohm*.

3.3.1.5 Demanda química de oxígeno

Para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se han empleado dos métodos analíticos, diferenciados entre sí por el rango de concentración de DQO para el cual se aplican. La medida de la DQO en ambos casos se realiza de forma indirecta, determinando el exceso de dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) empleado. El primero de los métodos empleados fue el estándar de oxidación de la materia orgánica mediante digestión con reflujo abierto (APHA/AWWA/WEF, 2005), diseñado para un rango de DQO comprendido entre 50 y 900 mg DQO L^{-1} . En este método se determina el exceso de dicromato a través de una valoración redox. El segundo método utilizado fue el test de la firma comercial Merck, con un rango de medida comprendido entre 10 y 150 mg DQO L^{-1} . Este método consiste en una digestión con reflujo cerrado, y determinación del exceso de dicromato por colorimetría.

Es importante destacar que para determinar la concentración de materia orgánica mediante el uso de estos métodos fue necesario eliminar la interferencia originada por la alta concentración de nitrito. Para contrarrestar esta interferencia se emplearon 10 mg de ácido sulfámico ($\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$) por cada mg de N-NO_2^- presente en la muestra (APHA/AWWA/WEF, 2005).

3.3.2 Técnicas microbiológicas y moleculares

3.3.2.1 Técnica de hibridación in situ FISH

La técnica FISH (*Fluorescent In Situ Hybridisation*) consiste en la hibridación de una sonda con una parte específica del 16S RNA bacteriano (Manz *et al.*, 1992). La sonda se elabora mediante la síntesis química de nucleótidos y se marca con un agente de color fluorescente (fluorocromo). Las bacterias de un grupo taxonómico específico (especie, género o clase entre otros), al ser hibridadas con una sonda específica, pueden ser identificadas empleando un microscopio de fluorescencia.

Se utilizó la técnica FISH para determinar la presencia de organismos amonioxidantes (AOB), nitritoxidantes (NOB) y desnitrificantes en la biomasa empleada como inóculo para la puesta en marcha de cada uno de los procesos biológicos estudiados en esta tesis. Además, durante la

operación del reactor SHARON se empleó la técnica FISH para realizar la identificación y posterior cuantificación de las poblaciones de AOB y NOB, con respecto al total de bacterias presentes en los sistemas biológicos estudiados. Se empleó un microscopio de fluorescencia DM2500 dotado de una cámara digital *Leica DFC420c* para la identificación y captura de imágenes. La visualización de las muestras se realizó con un objetivo de 63x (*Leica63x/0.80 N PLAN*). En la Tabla 3.6 se detallan las sondas empleadas en esta investigación. En esta tabla se muestra el nombre de la sonda, la secuencia de nucleótidos de la sonda, la bacteria diana y la referencia donde ha sido descrita dicha sonda.

Tabla 3.6. Sondas de hibridación empleadas en la identificación de organismos AOB, NOB y desnitrificantes.

Sonda	Secuencia 5' - 3'	Bacteria	Referencia
EUBmix	EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	<i>Most Bacteria</i> Amann, R. <i>et al.</i> , 1990
	EUB338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Planctomycetales</i> Daims, H. <i>et al.</i> , 1999
	EUB338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Verrucomicrobiales</i> Daims, H. <i>et al.</i> , 1999
NSO190	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	<i>Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria</i> Mobarry, B. <i>et al.</i> , 1996	
NSO1225	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	<i>Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria</i> Mobarry, B. <i>et al.</i> , 1996	
NEU	CCC CTC TGC TGC ACT CTA	<i>Most halophilic and halotolerant Nitrosomonas spp.</i> Wagner, M., <i>et al.</i> 1995	
Nmv	TCC TCA GAG ACT ACG CGG	<i>Nitrosococcus mobilis ("Nitrosomonas") lineage</i> Juretschko, S., <i>et al.</i> 1998	
Nsv443	CCG TGA CCG TTT CGT TCC G	<i>Nitrospira spp.</i> Mobarry, B 1996	
Nmo218	CGG CCG CTC CAA AAG CAT	<i>Nitrosomonas oligotropha-lineage Nitrosomonas europaea, halophila, eutropha, kraftisried-isolated</i> Gieseke, A., <i>et al.</i> 2001	
Nse1472	ACC CCA GTC ATG ACC CCC	<i>Nitrosomonas europaea, halophila, eutropha, kraftisried-isolated</i> Juretschko, S., <i>et al.</i> 1998	
Ntspa712	CGC CTT CGC CAC CGG CCT TCC	<i>Most members of the phylum Nitrospirae</i> Daims, H., <i>et al.</i> 2001	
NIT3	CCT GTG CTC CAT GCT CCG	<i>Nitrobacter spp</i> Wagner, M., <i>et al.</i> 1996	
DEN67	CAA GCA CCC GCG CTG CCG	<i>Methanol-utilizing denitrifying cluster</i> Ginige, M., <i>et al.</i> 2005	
AT1458	GAA TCT CAC CGT GGT AAG CGC	<i>Azoarcus-Thauera cluster</i> Rabus, R., <i>et al.</i> 1999	
PAR651	ACC TCT CTC GAA CTC CAG	<i>Genus Paracoccus</i> Neef, A., <i>et al.</i> 1996	
TBD1419	ACT TCT GCC AGA TTC CAC	<i>Thiobacillus denitrificans</i> Fernández, N., <i>et al.</i> 2008	

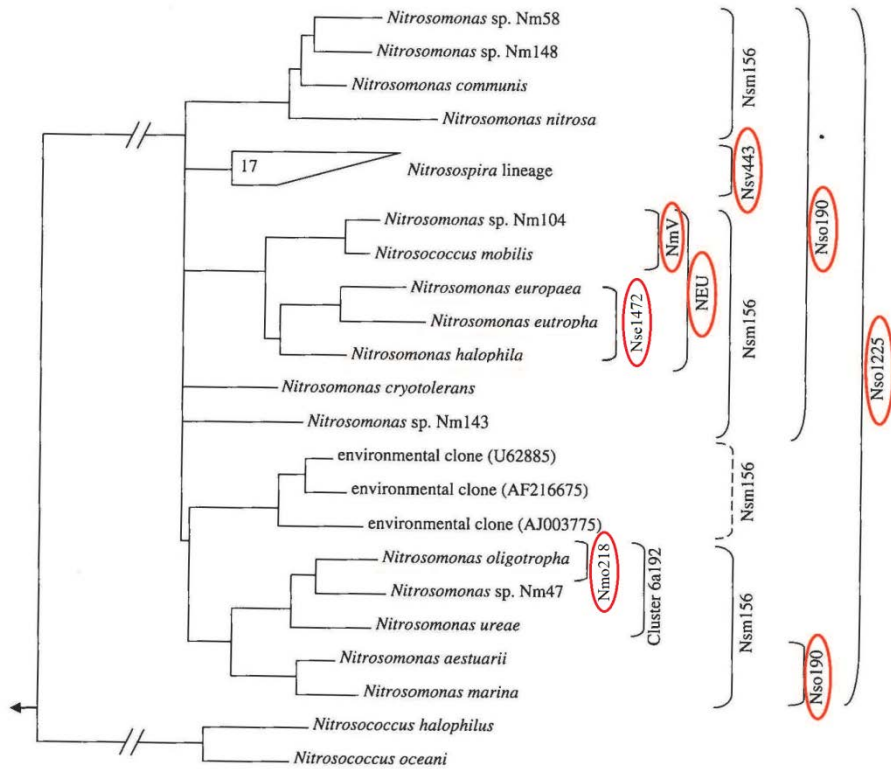
En la Figura 3.5 se encuentra el árbol de clasificación filogenético para las especies de organismos AOB (Figura 3.5a) y NOB (Figura 3.5b), con las sondas de oligonucleótidos comúnmente empleadas para su identificación, y se han marcado en rojo las utilizadas en este trabajo.

Para la cuantificación de las distintas especies microbianas presentes en las muestras se ha utilizado el método propuesto por Borrás (2008), el cual se divide en cinco etapas básicas descritas a continuación:

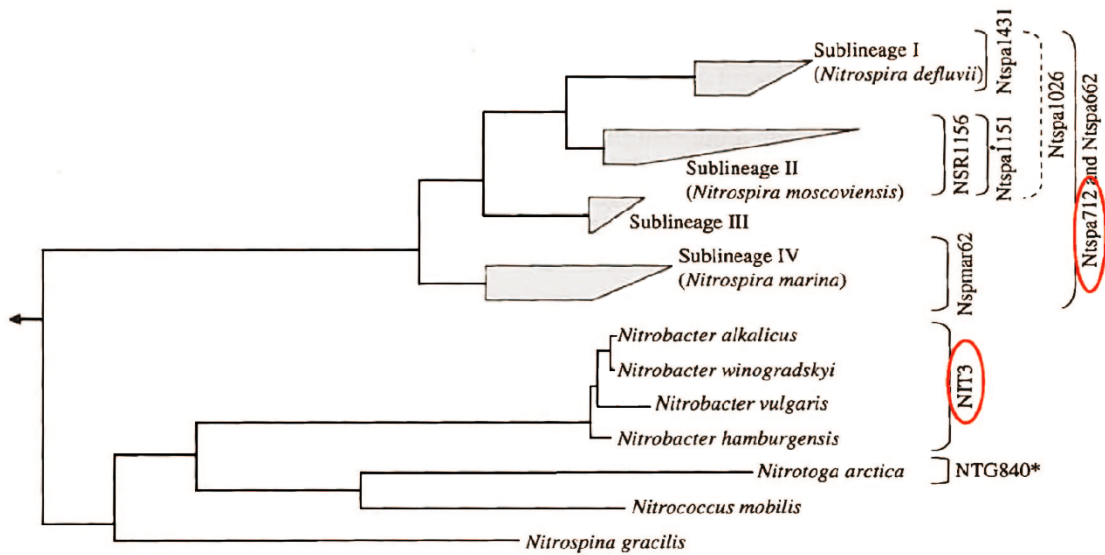
1. Toma de muestra. Las muestras deben tomarse de una parte representativa del fango o cultivo de bacterias. Para ello, es necesario que el reactor esté completamente mezclado.
2. Aplicación de la técnica de hibridación *in situ*, FISH.
 - Fijación de la muestra para paralizar toda la actividad bacteriana.
 - Hibridación con las sondas pertinentes.
3. Observación en el microscopio y toma de imágenes. Una vez realizada la hibridación, los portaobjetos deben ser examinados bajo un microscopio de epifluorescencia o un microscopio confocal láser, con los filtros adecuados según los fluorocromos utilizados. Mediante una cámara digital acoplada al microscopio se tomarán imágenes de entre 20 y 40 campos representativos de la muestra hibridada.
4. Cuantificación de los datos mediante *software*. Las imágenes son introducidas en un *software* que realiza la cuantificación y devuelve un informe detallado de los porcentajes de áreas ocupadas por las bacterias presentes en la muestra hibridada.
5. Análisis de los resultados. El informe debe ser revisado cuidadosamente con el fin de filtrar posibles resultados erróneos o estadísticamente incoherentes.

El resultado final obtenido de la aplicación del *software* de cuantificación desarrollado es un número que representa el porcentaje en área de una especie bacteriana en la muestra, acompañado de su desviación estándar.

Como paso previo al empleo de la técnica de hibridación *in situ* FISH, se llevó a cabo el procedimiento de fijación de las muestras. Éstas fueron periódicamente extraídas desde cada reactor, y fijadas siguiendo el protocolo establecido para las bacterias Gram negativas (Amann, 1990) empleando paraformaldehído (PFA).



a



b

Figura 3.5. Árbol de clasificación filogenético para las especies de organismos AOB (a) y NOB (b) relacionadas principalmente con la depuración de aguas residuales que incluye las sondas de oligonucleótidos comúnmente empleadas para su identificación (Nielsen et al., 2009). En rojo aparecen marcadas las sondas empleadas en este trabajo.

3.3.2.2 Técnica de viabilidad celular

La técnica de viabilidad celular determina la integridad de la membrana celular, lo que permite identificar las bacterias vivas y muertas presentes en una determinada muestra. Esta técnica fue aplicada durante el seguimiento de los procesos biológicos estudiados, así como durante la ejecución de los experimentos descritos en el apartado 3.2.1.

Se empleó el kit “L-7012 LIVE/DEAD® BacLight viability kit for microscopy and quantitative assays”, el cual utiliza dos fluorocromos: el Yoduro de propidio (PI, tinción roja) y el SYTO 9 (tinción verde). La molécula SYTO 9 es de menor tamaño que la molécula PI, por lo que cuando la membrana bacteriana se encuentra en buen estado, la molécula SYTO 9 es capaz de entrar en la célula, prevaleciendo una coloración verde e indicando que la bacteria es viable. En caso contrario, las células no viables se identifican cuando la molécula PI entra en la célula y desplaza a la molécula SYTO 9, prevaleciendo una coloración roja. La identificación y la cuantificación se realizaron empleando el microscopio de epifluorescencia y la metodología de cuantificación descritos en el apartado 3.3.2.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO DEL PROCESO SHARON DE NITRITACIÓN PARCIAL

En esta sección se presentan y discuten los resultados obtenidos del estudio del proceso de nitrificación parcial llevado a cabo en un reactor SHARON. En el primer apartado se recogen los resultados obtenidos durante el período de puesta en marcha y seguimiento de la evolución del proceso. En el segundo apartado se presentan los resultados de los experimentos puntuales, mediante los que se determinó el efecto que tienen diversos factores ambientales sobre la actividad de los organismos AOB, y también, los resultados del efecto del TRH sobre la estabilidad del proceso de nitrificación parcial y la calidad del efluente. Finalmente, en el tercer apartado se encuentran consignados una serie de criterios y recomendaciones acerca de la forma de poner en marcha y operar un reactor SHARON para obtener un proceso de nitrificación parcial estable.

4.1.1 Puesta en marcha y seguimiento de la evolución del proceso

Se evaluaron dos estrategias de puesta en marcha en las cuales se empleó como inóculo fango activo procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia). En esta EDAR el nitrógeno amoniacal se elimina por vía biológica de manera convencional, es decir, siguiendo la ruta del nitrato. La utilización de técnicas microbiológicas mostró que el inóculo empleado en ambas estrategias de puesta en marcha estaba compuesto principalmente por bacterias heterótrofas, que eliminan materia orgánica en condiciones aerobias y anóxicas, y una pequeña fracción de bacterias autótrofas, compuesta por organismos amonioxidantes (AOB) y nitritoxidantes (NOB).

Mediante la técnica FISH se determinó que la proporción de organismos AOB (clase β -proteobacteria) en comparación con el total de bacterias (dominio *Eubacteria*) presentes en el inóculo en el momento de inicio de cada puesta en marcha era del $7\pm 2\%$ (Figura 4.1). Además, hibridaciones realizadas dentro de los organismos AOB (clase β -proteobacteria) indicaron que este porcentaje se correspondía mayoritariamente con bacterias marcadas con la sonda Nmo218 ($4\pm 1\%$), empleada para identificar bacterias de la especie *Nitrosomonas oligotropha* spp. Las especies *Nitrosospira* spp. y *Nitrosococcus mobilis* spp., fueron detectadas en una proporción en torno al 0.1% mediante la hibridación con las sondas Nsv443 y Nmv, respectivamente. La señal fue negativa para las especies *Nitrosomonas eutropha* spp. y *Nitrosomona europaea* spp., hibridadas con la sonda Nse1472.

La proporción de organismos NOB en el inóculo de ambas puestas en marcha se situó en un $3\pm 1\%$ comparado con el total de bacterias identificadas con la sonda EUBmix. Este porcentaje corresponde a bacterias pertenecientes al *phylum Nitrospirae*, identificadas empleando la sonda Ntspa712. La señal obtenida de la hibridación con la sonda NIT3, utilizada para identificar bacterias NOB de la especie *Nitrobacter spp.* fue negativa, indicando la ausencia de esta especie en la biomasa empleada en ambas puestas en marcha del proceso.

Las dos puestas en marcha no se realizaron simultáneamente, sino en diferentes épocas, por lo que la similitud en la composición microbiana en los inóculos empleados permite asegurar que las diferencias que se observen entre ambas puestas en marcha no se deben al inóculo empleado. Por otra parte, los resultados obtenidos confirman que la predominancia de los organismos AOB y NOB, principales responsables del proceso de nitrificación, es baja en este tipo de fango activado procedente de procesos de tratamiento de agua residual de tipo convencional.

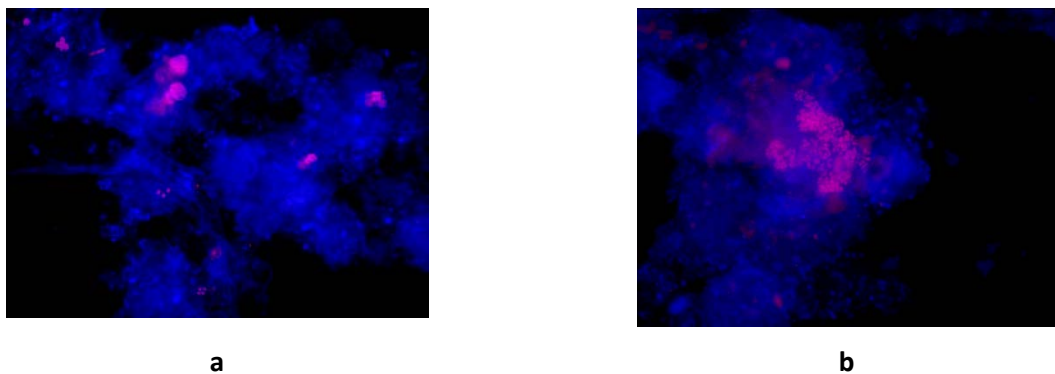


Figura 4.1. Microfotografía FISH mostrando la presencia de organismos amonioxidantes β -proteobacteria (color rosa) usando la sonda NSO190, frente al total de bacterias (sonda EUB mix), en (a) el inóculo utilizado para la puesta en marcha I, y (b) el inóculo empleado en la puesta en marcha II. Imágenes tomadas a 63x.

4.1.1.1 Puesta en marcha I: incremento progresivo de la concentración de N-amoniaca

Esta puesta en marcha consistió en adaptar de manera progresiva la biomasa a las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal, típicas de la corriente del sobrenadante de la deshidratación de fangos digeridos anaeróticamente. Este período de estudio fue dividido en cinco etapas, con una duración total de 80 días, a lo largo de las cuales se fue modificando la concentración de nitrógeno amoniacal, la temperatura y la relación HCO_3^-/N . La Tabla 4.1 resume los cambios realizados en la operación del proceso de nitrificación parcial en el reactor SHARON durante la puesta en marcha I. Durante todo el período experimental el tiempo de retención hidráulico se mantuvo constante en 2.3 días.

Tabla 4.1. Condiciones de operación del proceso de nitrificación parcial SHARON durante la puesta en marcha I.

Etapa	Concentración amonio en la corriente afluyente (mg N-NH ₄ L ⁻¹)	TRH (días)	Temperatura (°C)	Ratio molar HCO ₃ ⁻ /N
1	300	2.3	25	1.9
2	600	2.3	25	0.9
3	1000	2.3	25-30	0.5
4	1000	2.3	30	1.1
5	1000	2.3	30	2.2

La Figura 4.2 muestra la evolución de los compuestos nitrogenados, la alcalinidad (medida como CaCO₃) y el pH en las corrientes afluyente y efluente al proceso durante la puesta en marcha I. Tal y como se observa en esta figura, el amonio de la corriente afluyente es oxidado rápidamente a nitrato en la etapa 1, confirmando que existe una población de organismos AOB y NOB bien desarrollada en el licor mezcla del reactor. Para no limitar el desarrollo de las bacterias y amortiguar las variaciones de pH, la alcalinidad del afluyente se ajustó para tener un relación molar HCO₃⁻/N-NH₄ en torno a 1.9, relación considerablemente superior a la comúnmente encontrada en corrientes de sobrenadante de la deshidratación de fangos sometidos a digestión anaerobia que se sitúa en torno a 1. Como se observa en la Figura 4.2b, durante esta primera etapa la alcalinidad en la corriente efluente se situó en torno a 150 mg CaCO₃ L⁻¹, mientras que el pH del reactor osciló alrededor de 7.8.

Desde el inicio de la etapa 2 la concentración de amonio en la corriente afluyente se incrementó a 600 mg N-NH₄ L⁻¹, mientras que la alcalinidad se mantuvo constante con respecto a la etapa 1 en 2000 mg CaCO₃ L⁻¹, por lo que la relación molar HCO₃⁻/N-NH₄ se situó en 0.9. Durante esta etapa se observa inicialmente un período de transición, en el que la concentración de nitrato comenzó a descender, al contrario de lo que sucedió con el nitrito, que comenzó a acumularse en el reactor. En este período de transición el pH osciló bruscamente. Tras el período de transición, se observa un período de estabilización que comenzó el día 20, durante el cual el porcentaje de oxidación de amonio alcanzó el 37%.

En la etapa 3 la temperatura de operación se incrementó progresivamente desde 25°C hasta 30°C a lo largo de dos días de operación. La concentración de nitrógeno amoniacal se incrementó a 1000 mg N L⁻¹ al comienzo de la etapa, con lo que relación molar HCO₃⁻/N-NH₄ durante todo este período estuvo en torno a 0.5. La alcalinidad aportada en la corriente de entrada no se incrementó en esta etapa para evitar el posible impacto adverso que podría presentar la alta salinidad sobre la biomasa aún en período de adaptación. Sin embargo, el déficit de alcalinidad al que fue sometido el proceso limitó severamente el rendimiento de

oxidación de amonio, que no superó el 20%. Por este motivo, en la etapa 4 se incrementó la alcalinidad en la corriente afluyente hasta alcanzar la relación molar HCO_3^-/N típica de la corriente de sobrenadante de la deshidratación de fangos sometidos a digestión anaerobia ($\text{HCO}_3^-/\text{N-NH}_4 = 1$). Como se puede observar en la Figura 4.2a el proceso evolucionó muy favorablemente y para el día 55 alcanzó un rendimiento de oxidación de amonio a nitrito del 50% (nitrificación parcial), con un consumo total de la alcalinidad aportada en la corriente afluyente.

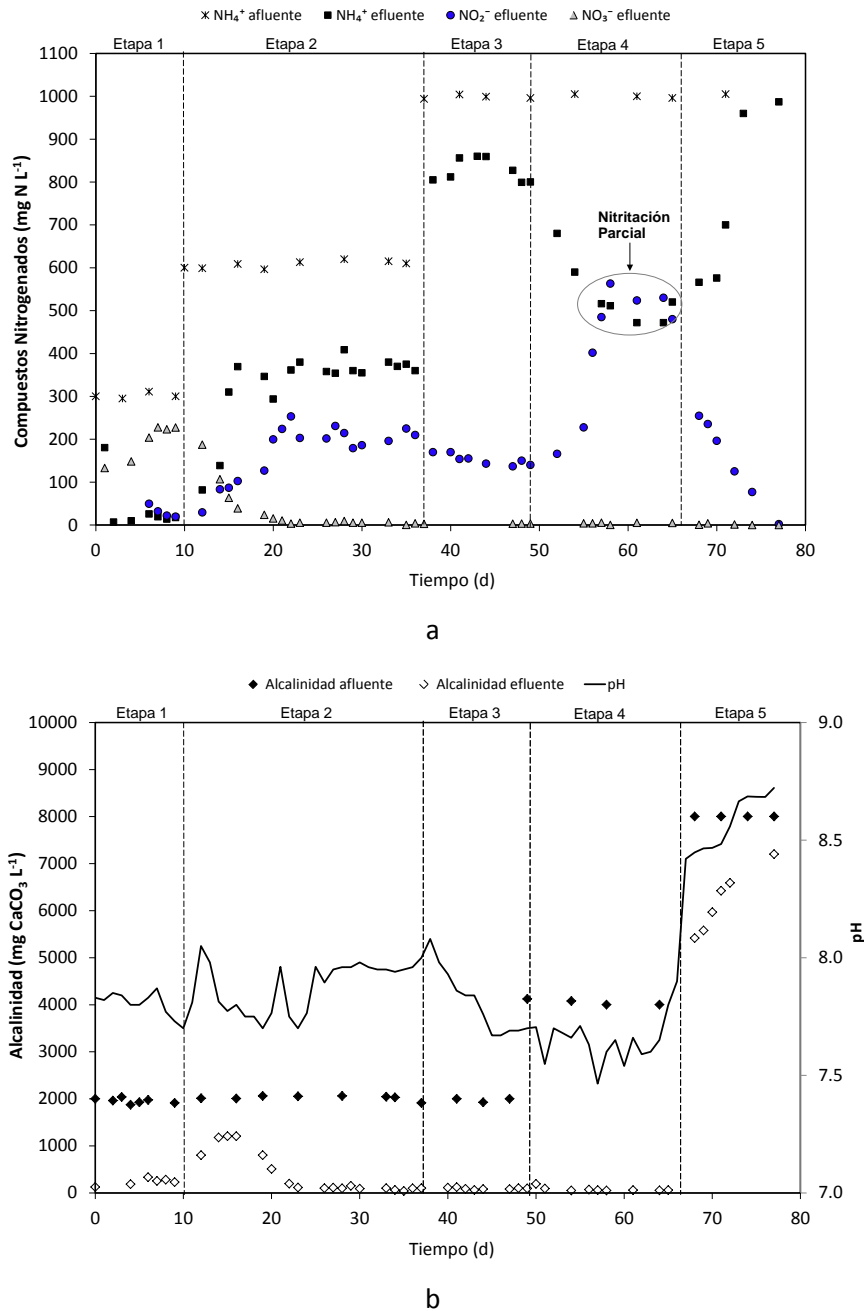


Figura 4.2. Evolución de las concentraciones de los compuestos nitrogenados (a), alcalinidad y pH (b) en las corrientes afluyente y efluente al proceso de nitrificación parcial (SHARON) durante la puesta en marcha I.

El análisis mediante FISH de muestras del licor mezcla del reactor reveló una clara predominancia de bacterias amonioxidantes clase β -proteobacteria ($86\pm 1\%$) frente al total de bacterias hibridadas con la sonda general EUBmix (Figura 4.3).

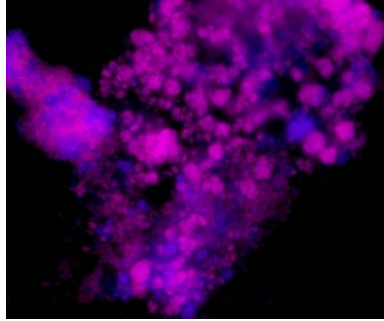


Figura 4.3. Microfotografía FISH mostrando la presencia de organismos AOB β -proteobacteria (color rosa) usando la sonda NSO190, frente al total de bacterias (sonda EUB mix) para el día 57 de la puesta en marcha I. Imágenes tomadas a 63x.

Una vez conseguida la nitrificación parcial, se decidió realizar una nueva etapa (etapa 5) incrementando la alcalinidad en el agua residual afluente, con el objetivo de determinar si era posible alcanzar un mayor rendimiento de oxidación de amonio a nitrito. La relación molar $\text{HCO}_3^-/\text{N-NH}_4$ se duplicó con respecto a la empleada en la etapa 4, pero tal y como se observa en la Figura 4.2a se produjo un claro y rápido deterioro del proceso, obteniéndose en la corriente efluente concentraciones de amonio similares a las aportadas en el agua residual afluente. Durante esta quinta etapa, el pH del reactor se incrementó como consecuencia del deterioro del proceso de oxidación de amonio, por lo que la alcalinidad aportada por el agua residual afluente no fue consumida (Figura 4.2b). Debido a que la única modificación que se realizó fue el incremento de la alcalinidad en la corriente afluente, se presume que la principal causa del deterioro observado en el proceso de oxidación de amonio fue el desequilibrio osmótico entre la célula y el medio que la rodea, como consecuencia de la alta alcalinidad y nitrógeno amoniacal aportados en el alimento como bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y cloruro de amonio (NH_4Cl), respectivamente. Varios autores (Panswad *et al.*, 1999; Windey *et al.*, 2005) advierten del efecto adverso que tiene la alta salinidad sobre los procesos biológicos de eliminación de nitrógeno de las aguas residuales. Debido a la relevancia del tema se consideró necesario profundizar en él, y por ello se realizó un estudio específico para cuantificar el efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos amonioxidantes, cuyos resultados se recogen en el apartado 4.1.2.2 del presente documento.

4.1.1.2 Puesta en marcha II: arranque del proceso con alta concentración de N-amoniacal

En esta segunda puesta en marcha del proceso de nitrificación parcial la biomasa procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia) fue sometida a altas concentraciones de nitrógeno amoniacal desde el inicio de operación. La concentración de nitrógeno amoniacal utilizada fue de $1000 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$, que es la concentración habitualmente encontrada en la corriente del sobrenadante de la deshidratación de fangos provenientes de la digestión anaerobia. Este período experimental fue dividido en dos etapas, en las que se modificó el caudal afluente al proceso y, por tanto, el tiempo de retención hidráulico y el tiempo de retención celular. Durante las dos etapas de la puesta en marcha II la temperatura de operación permaneció controlada en 30°C y el ratio molar $\text{HCO}_3^-/\text{N-NH}_4$ ajustado en 1.1. Las condiciones de operación de la puesta en marcha II se resumen en la Tabla 4.2.

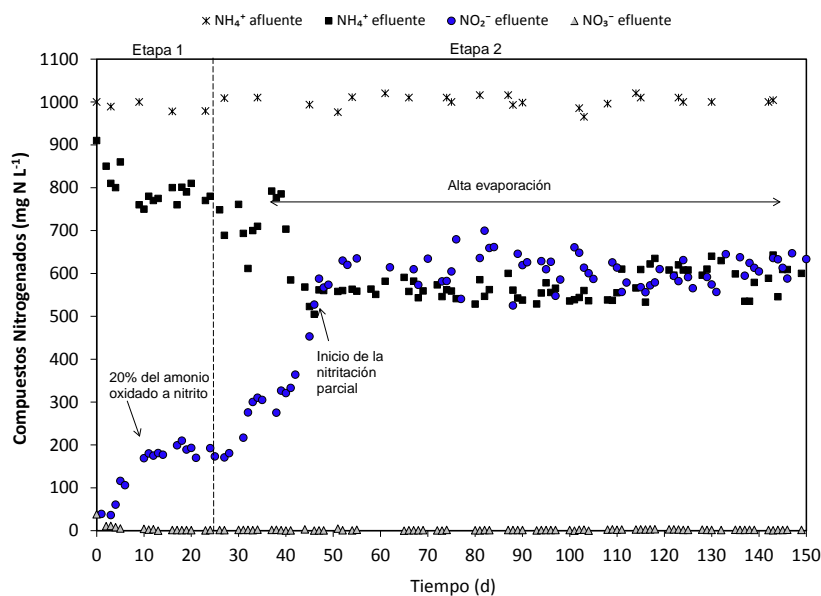
Tabla 4.2. Condiciones de operación del proceso de nitrificación parcial SHARON durante la puesta en marcha II.

Etapa	Concentración amonio en la corriente afluente ($\text{mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$)	TRH (días)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Ratio molar HCO_3^-/N
1	1000	2.3	30	1.1
2	1000	4.6	30	1.1

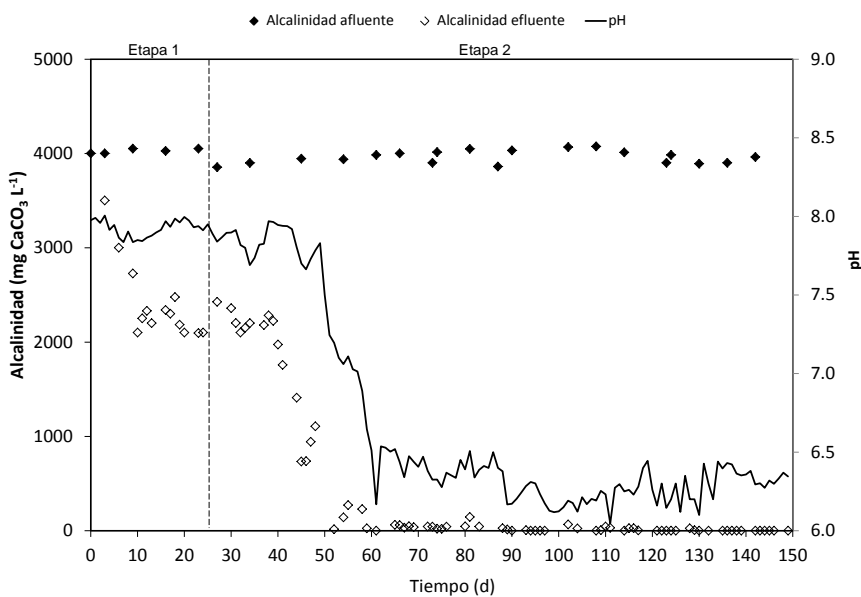
La Figura 4.4 muestra la evolución de los compuestos nitrogenados, la alcalinidad (medida como CaCO_3) y el pH en las corrientes afluente y efluente al proceso durante la puesta en marcha II. Como se puede observar en la Figura 4.4a, durante la etapa 1 el sistema alcanzó a oxidar el 20% del amonio a nitrito tras 10 días de operación. Este porcentaje de oxidación de amonio a nitrito se mantuvo relativamente constante hasta el día 25, momento a partir del cual se decidió incrementar el TRH del proceso (etapa 2), con el objetivo de incrementar la población de organismos AOB y conseguir una mayor oxidación de amonio en el proceso de nitrificación parcial.

Tal y como se acaba de comentar, el caudal de entrada al proceso se disminuyó durante la etapa 2 de esta puesta en marcha para obtener un mayor TRH (4.6 días). Los demás parámetros de operación se mantuvieron constantes en los valores fijados durante la etapa 1. Se puede observar en la Figura 4.4a como tras el cambio en el TRH (día 25) se produjo un incremento progresivo del rendimiento de oxidación de amonio a nitrito, el cual se corresponde con el descenso tanto de la alcalinidad en la corriente efluente como del pH en el reactor (Figura 4.4b). De acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 4.4a, y

tomando como punto de partida las condiciones de operación establecidas durante la etapa 2, es posible obtener el proceso de nitrificación parcial en tan sólo 20 días de operación.



a



b

Figura 4.4. Evolución de las concentraciones de los compuestos nitrogenados (a), alcalinidad y pH (b) en las corrientes afluente y efluente al proceso de nitrificación parcial, durante la puesta en marcha II.

Si se realiza un balance de masa para el nitrógeno en la etapa 2, se puede observar que el sumatorio de las concentraciones de los compuestos nitrogenados en el efluente es mayor que en el afluente. Esto es debido a la alta evaporación que se produjo en el reactor como consecuencia de las condiciones de operación impuestas y las condiciones de temperatura y humedad relativa del laboratorio donde se situó el montaje experimental. Midiendo los

caudales de entrada y salida al proceso se comprobó que en torno al 33% del caudal afluente al reactor se perdía por evaporación. Esta significativa reducción del caudal efluente del proceso llevó a que el tiempo de retención celular fuera mayor que el tiempo de retención hidráulico, siendo de 7 días y 4.6 días respectivamente. A pesar del elevado TRC, la concentración de nitrato (NO_3^-) determinada en la corriente efluente del proceso fue inferior a $2 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ durante esta segunda etapa de puesta en marcha, lo que indica la poca abundancia de organismos NOB en el sistema. El análisis mediante FISH de muestras del licor mezcla del reactor reveló que la población de organismos nitritoxidantes, hibridados con las sondas Ntspa712 (*phylum Nitrospirae*) y NIT3 (*Nitrobacter spp.*), no superó en ningún momento el 0.1% del total de bacterias hibridadas con la sonda EUBmix. Resultados similares se han obtenido en otras investigaciones en las que la operación de un reactor de nitrificación parcial con altos TRC (hasta 7 días en Ganigué *et al.*, 2007 y hasta 30 días en Jubany *et al.*, 2009) no ocasionó una producción significativa de nitrato (estando siempre por debajo del 5%). La ausencia de una población significativa de organismos NOB en sistemas SHARON operados con altos tiempos de retención celular puede ser atribuida al efecto de otros factores y parámetros de operación como la temperatura, el oxígeno disuelto, la concentración de nitrito y ácido nitroso, y la concentración de amonio, entre otros, los cuales pueden jugar un papel importante en la competencia entre los organismos AOB y NOB.

Comparando las dos estrategias de puesta en marcha utilizadas, se puede concluir que la imposición de altas concentraciones de amonio y alcalinidad, desde el inicio de operación, no afecta negativamente al desarrollo de las poblaciones de microorganismos amonioxidantes presentes en el inóculo. En ambas estrategias de puesta en marcha, el rendimiento de oxidación de amonio a nitrito en torno al 50% (nitrificación parcial) se consiguió con TRC altos, superiores a 1 día que es lo que recomienda Hellinga *et al.* (1998). Estos resultados son coherentes con los de otros autores como Van Hulle *et al.* (2007), quienes afirman que el empleo de bajos tiempos de retención celular durante el período de puesta en marcha, utilizando como inóculo organismos AOB de la línea de aguas de una EDAR urbana, ocasiona que el funcionamiento del reactor SHARON se torne inestable.

4.1.2 Efecto de los factores ambientales y de operación sobre la actividad de los organismos AOB y las características del efluente del proceso

Cambios en las condiciones ambientales y de operación, tales como temperatura, pH, disponibilidad de sustrato, aireación, características de la fuente de carbono y concentraciones de agentes inhibidores, entre otros, pueden afectar a la actividad de los organismos AOB (Daims *et al.*, 2010). Por ello, una vez alcanzado el proceso de nitrificación parcial, y habiendo identificado las especies *Nitrosomonas eutropha spp.* y *Nitrosomonas europaea spp.* como las más abundantes, se realizó una exhaustiva campaña experimental para conocer y cuantificar la influencia de diversos factores ambientales y parámetros de operación sobre la actividad de estas especies de organismos AOB así como sobre el rendimiento y la estabilidad del proceso. Los resultados de esta experimentación se recogen en este apartado.

La Figura 4.5 muestra la evolución de los compuestos nitrogenados en la corriente efluente del proceso SHARON de nitrificación parcial R1. En la figura se observa que tras completar la puesta en marcha del proceso de nitrificación parcial (día 45), el porcentaje de nitrificación osciló en torno al 50% durante los dos períodos experimentales evaluados, el primero a una temperatura de 30°C y el segundo período a una temperatura de 35°C. Las concentraciones de amonio y nitrito que se muestran en la figura corresponden con las concentraciones reales medidas en el licor mezcla del reactor. Como se comentó anteriormente, debido a la evaporación en el reactor se produjo un incremento de la concentración de los diferentes compuestos presentes en el licor mezcla y, por este motivo, el sumatorio de los compuestos nitrogenados en el efluente del reactor fue superior que en el afluente. Además, la evaporación producida ocasionó que el TRC fuera significativamente mayor que el TRH, 7 días frente a 4.6 días, respectivamente. A pesar de que el reactor se estuviera operando con este elevado valor de TRC, la concentración de nitrato permaneció por debajo de 2 mg N-NO₃ L⁻¹ en todo momento, lo que permitió asegurar que el proceso de eliminación de N-amoniaco siguió la ruta del nitrito. Este hecho también fue confirmado mediante la utilización de la técnica FISH, que reveló que en el reactor SHARON predominaba un cultivo altamente enriquecido de organismos AOB, siendo del total de bacterias identificadas con la sonda EUBmix el 93±3% las bacterias identificadas con la sonda específica NSO190. Este porcentaje corresponde al valor medio obtenido tras el análisis de diversas muestras tomadas a lo largo del periodo de operación estable del reactor SHARON de nitrificación parcial. La Figura 4.6 muestra la abundancia de organismos AOB β-proteobacteria (color rosa) usando la sonda NSO190, frente al total de bacterias (sonda EUB mix) para el día 650 de operación.

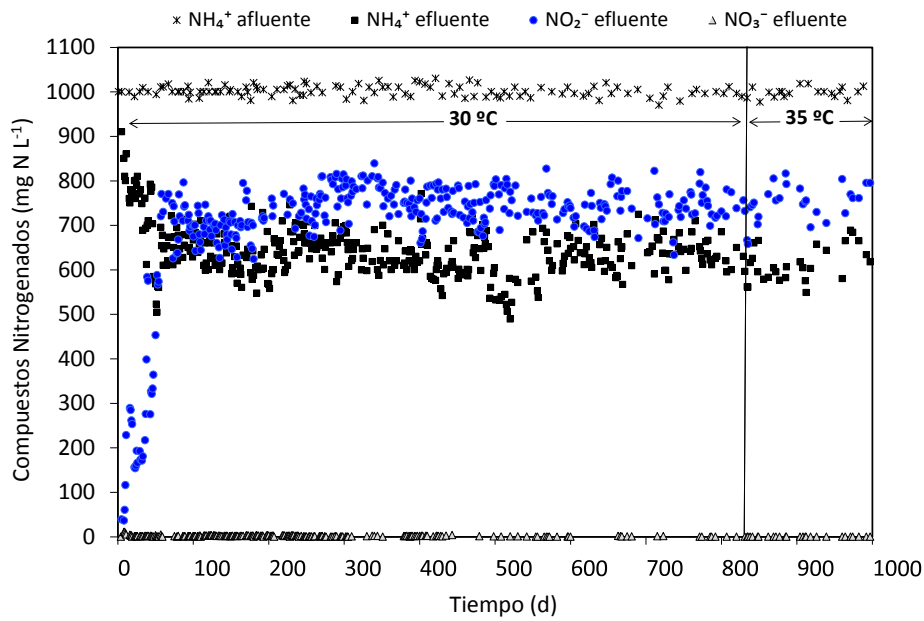


Figura 4.5. Evolución de los compuestos nitrogenados en la corriente efluente del proceso SHARON de nitrificación parcial R1.

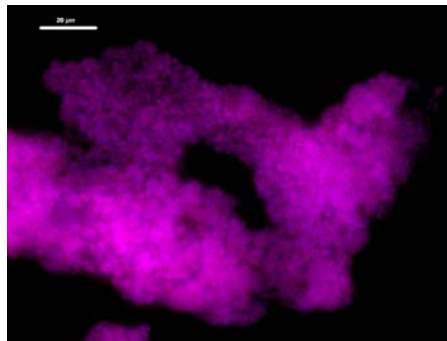


Figura 4.6. Microfotografía FISH mostrando la presencia de organismos AOB β -proteobacteria (color rosa) usando la sonda NSO190, frente al total de bacterias (sonda EUB mix) para el día 650 de operación.

La biomasa desarrollada en el reactor de nitrificación parcial R1 fue empleada para la realización de una serie de experimentos puntuales, en los que se evaluó el efecto de diversos factores ambientales sobre la actividad de los organismos AOB, siguiendo la metodología descrita en el apartado de materiales y métodos 3.2.1. A continuación se presentan los resultados de esta evaluación, recogidos en los siguientes 5 subapartados.

4.1.2.1 Efecto de la concentración de amonio y amoníaco sobre la actividad de los organismos AOB

La evaluación del efecto de la concentración de amonio (NH_4^+) y amoníaco (NH_3) sobre la actividad de los organismos AOB se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.1.2. Se realizaron un total de ocho experimentos a cuatro valores de pH diferentes (6.5, 7, 7.5 y 8.1), para los que se empleó biomasa procedente del reactor de nitrificación parcial R1 (Figura 4.5), el cual se operaba para mantener el proceso estable y en condiciones estacionarias y con un grado de nitrificación en torno al 50%. Cada experimento fue realizado por duplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. En la Tabla 4.3 se encuentran las concentraciones de amonio empleadas en cada nivel de pH estudiado. Como se observa en esta tabla, el rango de amonio evaluado comprendió desde 45 hasta 10000 $\text{mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$.

Tabla 4.3. Concentraciones de amonio empleadas en la evaluación del efecto del amonio y amoníaco sobre la actividad de los organismos AOB.

pH	Experimento	Concentración de amonio ($\text{mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$)							
6.5	1	70	100	300	950	1500	2200	7000	
	2	95	250	550	1200	1800	4000	5000	10000
7.0	3	60	95	150	950	2500	5500	10000	
	4	300	800	1100	1500	2100	4100	8100	
7.5	5	45	300	800	1100	1500	2100	2800	4100
	6	250	600	1000	1400	2000	4000	6000	
8.1	7	45	534	1490	2350				
	8	190	1055	1900	2770				

En todos los experimentos se determinó la actividad bacteriana, medida como velocidad de consumo de oxígeno (OUR), para cada concentración de amonio; atribuyéndose los cambios observados en la OUR a la actividad de los organismos AOB presentes en el reactor, ya que durante el período de realización de estos ensayos la concentración de nitrato en el reactor SHARON fue prácticamente despreciable ($< 2 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$), y de acuerdo con los resultados de FISH, la abundancia de organismos AOB β -proteobacteria se situó en torno al $93 \pm 3\%$.

La Figura 4.7 muestra los resultados obtenidos para el experimento 3 realizado a pH 7. Se observa como la actividad bacteriana, medida como OUR ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), se mantuvo relativamente estable para cada concentración de amonio evaluada, y varió cada vez que se cambiaba la concentración de amonio. Conforme se incrementó la concentración de amonio, la actividad bacteriana también aumentó hasta alcanzar su máximo en el rango comprendido entre $950 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ y $2500 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$. Para las concentraciones evaluadas superiores a $2500 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ se observó un descenso considerable de la actividad bacteriana.

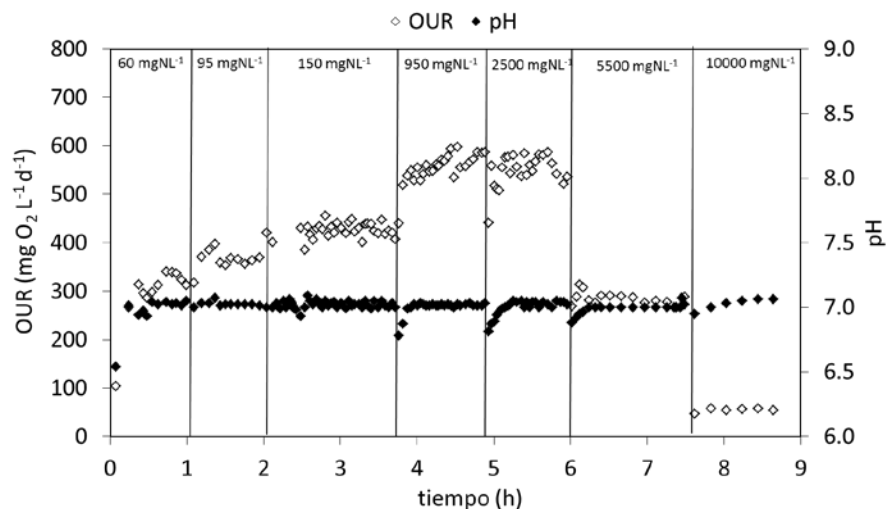


Figura 4.7. Evolución de la OUR para cada concentración de amonio empleada en el experimento 3 realizado a pH 7.0.

Los resultados obtenidos para todos los experimentos, mostrados en la Figura 4.8, responden a un patrón de comportamiento similar al mostrado en la Figura 4.7. Sin embargo, los valores máximos de OUR alcanzados en cada experimento fueron diferentes, como consecuencia de las condiciones establecidas en cada experimento, concentración de amonio empleada y pH evaluado. Para poder comparar todos los experimentos entre sí, fue necesario normalizar los valores de OUR obtenidos en cada nivel de concentración evaluado respecto del valor máximo de OUR alcanzado en cada experimento. Por tanto, en cada experimento se calculó el cociente entre el valor de la OUR para cada concentración de amonio y el valor máximo de la OUR en dicho experimento, siendo este cociente el porcentaje del valor máximo de OUR (%OUR). Dado que el valor de la OUR se mantuvo relativamente constante en cada nivel de concentración evaluado, el análisis de los resultados se realizó utilizando el valor medio de OUR para cada nivel de concentración.

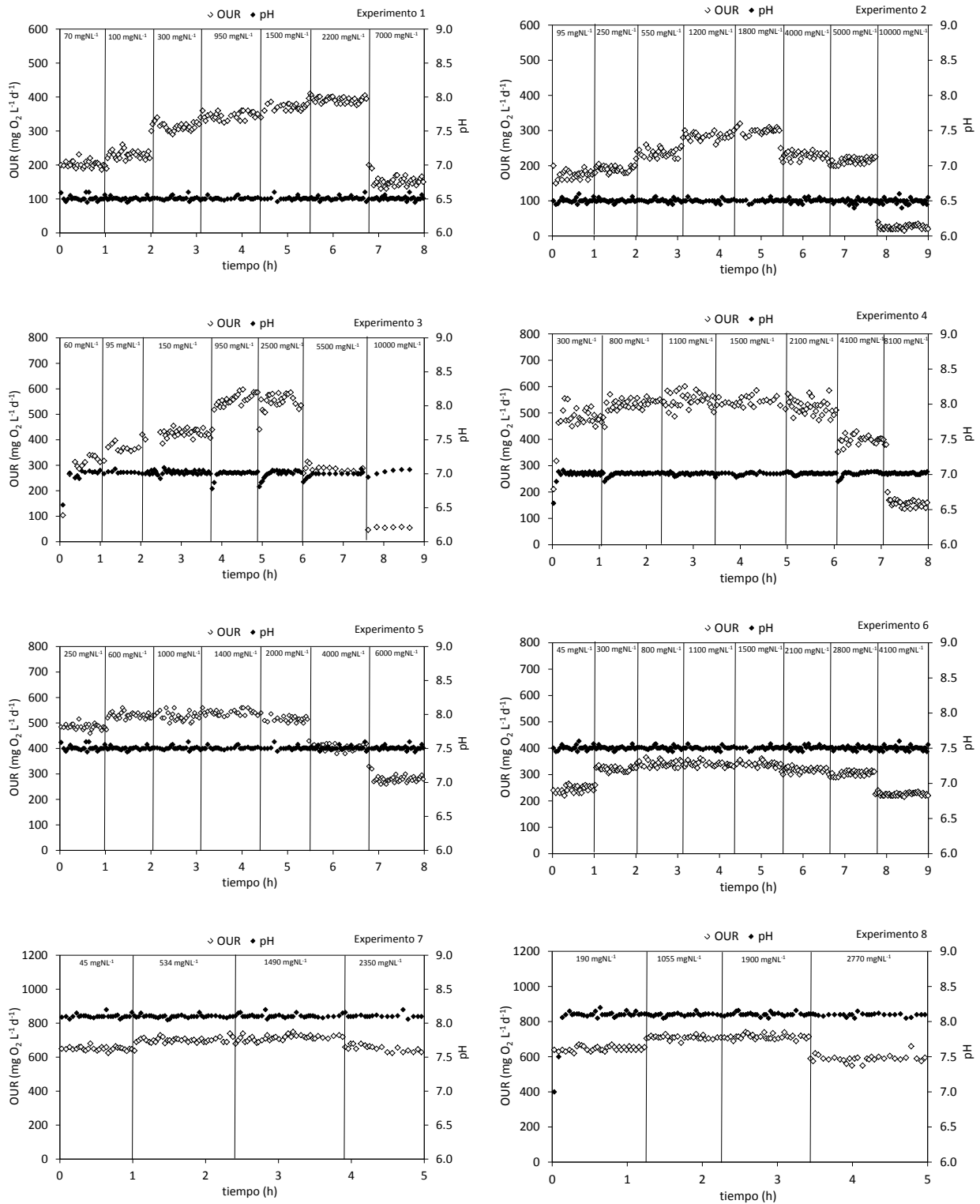


Figura 4.8. Evolución de la OUR y la concentración de amonio en los experimentos realizados para evaluar el efecto de la concentración de amonio y amoniaco sobre la actividad de los organismos AOB.

En la Figura 4.9 se encuentran representados gráficamente los resultados de todos los experimentos realizados a los distintos valores de pH y concentraciones de amonio y amoniaco empleadas. Las concentraciones de amoniaco fueron determinadas empleando las ecuaciones

de equilibrio químico 3.3, 3.4 y 3.5 (apartado 3.2.1.2), en función del pH y la temperatura de cada experimento. Tal y como se indicó, la temperatura se mantuvo constante en 30°C en todos los experimentos. Las Figuras 4.9a y 4.9b muestran los resultados en todo el rango de concentraciones de amonio y amoniaco evaluadas, mientras que las Figuras 4.9c y 4.9d únicamente muestran los resultados en las zonas de bajas concentraciones para poder analizar la limitación de la actividad de los organismos AOB por déficit de sustrato.

En las Figuras 4.9a y 4.9b se puede observar claramente que hay una reducción de la actividad de los organismos AOB tanto para bajas como altas concentraciones. Observando ambas figuras, se puede afirmar que para altas concentraciones de amonio, el amoniaco no es el responsable del descenso de la actividad de los organismos AOB, ya que la reducción observada es muy diferente en cada experimento. Se puede comprobar como a pH 8.1 la actividad de los organismos amonioxidantes es prácticamente del 100% cuando la concentración de amoniaco es 186 mg N-NH₃ L⁻¹, mientras que en el experimento realizado a pH 7 la actividad es inferior al 20% siendo la concentración de amoniaco de 80 mg N-NH₃ L⁻¹. En la Figura 4.9a la actividad de los organismos AOB desciende siguiendo el mismo patrón en todos los experimentos: aproximadamente a partir de 2200 mg N-NH₄ L⁻¹ la actividad de las bacterias AOB desciende conforme se incrementa la concentración de amonio. Estos resultados parecen indicar que la elevada concentración de amonio inhibe la actividad de los organismos AOB. En bibliografía existen trabajos como el de Hunik *et al.* (1992) y Mosquera-Corral *et al.* (2005) que señalan que la salinidad puede afectar negativamente a los organismos AOB. Por este motivo y con el objetivo de clarificar si el amonio o la salinidad son responsables de la reducción de la actividad de los organismos AOB, se realizaron otros experimentos utilizando sales con y sin amonio cuyos resultados se recogen en el apartado 4.1.2.2.

Comparando las Figuras 4.8c y 4.8d se puede observar como la actividad bacteriana sigue la misma tendencia cuando se compara frente a la concentración de amoniaco, independientemente del valor de pH evaluado, pero diferente comportamiento cuando se compara frente a la concentración de amonio. Estos resultados permiten concluir que el amoniaco es el sustrato real de las especies de organismos amonioxidantes presentes en el proceso SHARON investigado, pertenecientes principalmente a los géneros *Nitrosomonas europaea* y *Nitrosomonas eutropha*, según los resultados obtenidos tras la aplicación de la técnica FISH.

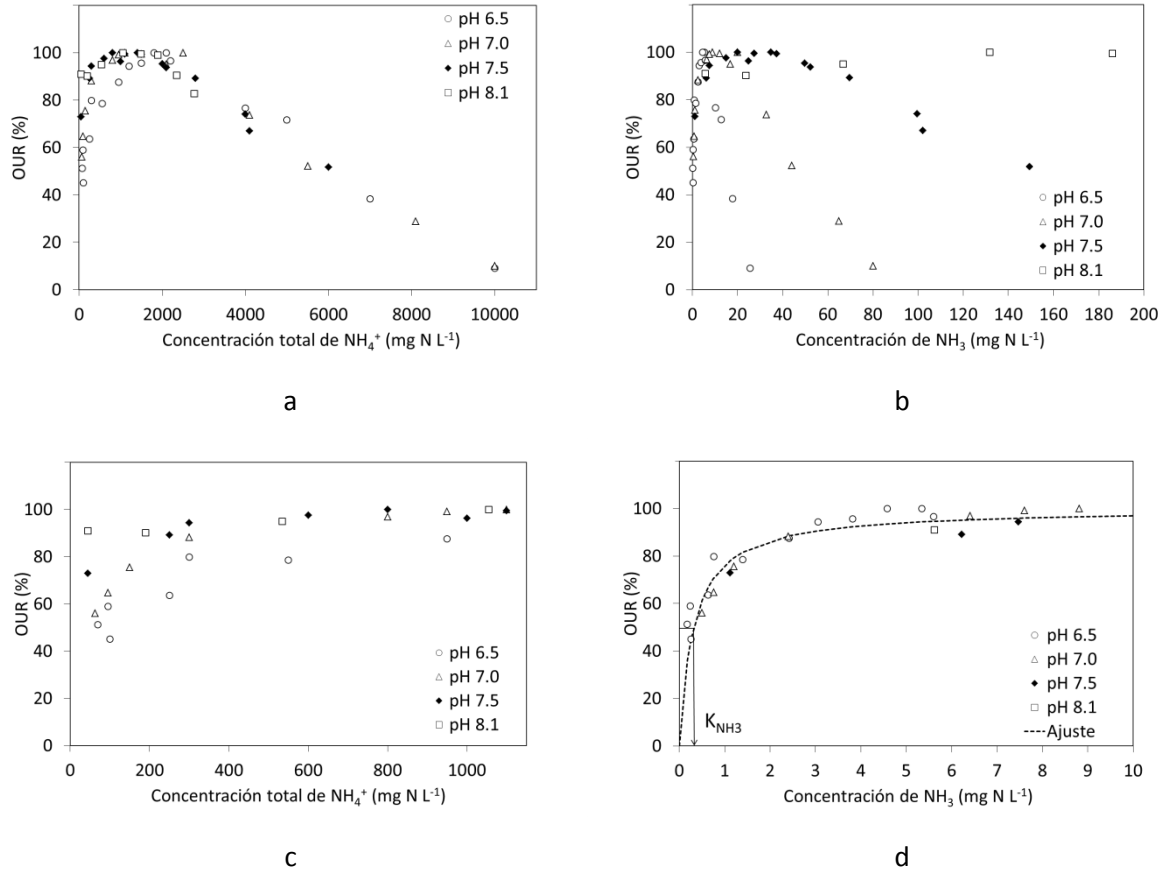


Figura 4.9. Actividad de los organismos AOB expresada como %OUR máxima frente a la concentración de amonio(a y c) y amoníaco (b y d).

Si se ajusta una función de tipo Monod (Ecuación 4.1) a los resultados experimentales obtenidos, se puede comprobar que el comportamiento observado se puede representar adecuadamente con este tipo de función y que el valor de la constante de semisaturación para el amoníaco (K_{NH_3}) es de 0.32 mg N-NH₃ L⁻¹. Resultados similares fueron obtenidos por Ciudad *et al.* (2006) y Hellinga *et al.* (1998) con valores de K_{NH_3} de 0.3 y 0.46 mg N-NH₃ L⁻¹, respectivamente.

Función tipo Monod 4.1

$$\frac{S_{NH_3}}{K_{NH_3} + S_{NH_3}}$$

donde K_{NH_3} es la constante de semisaturación y S_{NH_3} es la concentración de amoníaco.

4.1.2.2 Efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB

Para estudiar el efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB se realizaron un total de ocho experimentos siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.1.3. Las sales empleadas y su concentración de evaluación se encuentran detalladas en la Tabla 4.4. En

los experimentos en los que se emplearon sales sin amonio: NaCl y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se adicionó 1000 mg N- $\text{NH}_4 \text{ L}^{-1}$, añadido como NH_4Cl , de forma que la actividad de los organismos AOB no estuviera limitada por falta de sustrato.

Tabla 4.4. Concentraciones de sales empleadas en el estudio del efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB.

Sal	Experimento	Salinidad (mol L^{-1})							
NaCl^a	1	0.07	0.11	0.15	0.23	0.31	0.42	0.54	
	2	0.007	0.01	0.02	0.03	0.04	0.12	0.20	0.28
NH_4NO_3	3	0.010	0.011	0.02	0.04	0.08	0.15	0.22	0.33
	4	0.002	0.006	0.01	0.03	0.05	0.07	0.11	0.16
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	0.003	0.009	0.03	0.07	0.12	0.22	0.30	0.37
	6	0.005	0.02	0.05	0.08	0.15	0.29	0.36	0.50
$\text{NH}_4\text{NO}_3:\text{NaCl}$ Mezcla 1:1	7	0.07	0.09	0.10	0.14	0.17	0.20	0.24	0.27
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^a$	8	0.07	0.09	0.11	0.13	0.16	0.20	0.23	0.27
		0.31							

^a Adición de 1000 mg N- $\text{NH}_4 \text{ L}^{-1}$ al inicio del experimento para proporcionar sustrato a los organismos AOB.

Una manera de poder comparar la inhibición de las bacterias por diferentes sales es representando su actividad frente a la concentración de sales en el medio a lo largo de cada experimento. Utilizando este tipo de representación para analizar los resultados de la experimentación se observaron dos patrones de comportamiento, diferenciados entre sí por el tipo de sal empleada: experimentos en los que se empleó sales sin amonio (experimentos 1, 7 y 8) y experimentos en los que se empleó sales con amonio (experimentos del 2 al 6).

En los experimentos en los que se empleó sales sin amonio se obtuvieron resultados como los mostrados en la Figura 4.10. En esta figura se representa la evolución de la OUR a lo largo del experimento 1 en el que se empleó cloruro de sodio (NaCl), y cuya concentración se encuentra expresada en moles por litro (M). En la figura se puede observar que la actividad bacteriana permanece prácticamente constante y en su máximo valor hasta que la concentración de sal alcanzó 0.15 M. Concentraciones de sal de 0.23 M y superiores ocasionaron una clara reducción de la actividad de los organismos AOB.

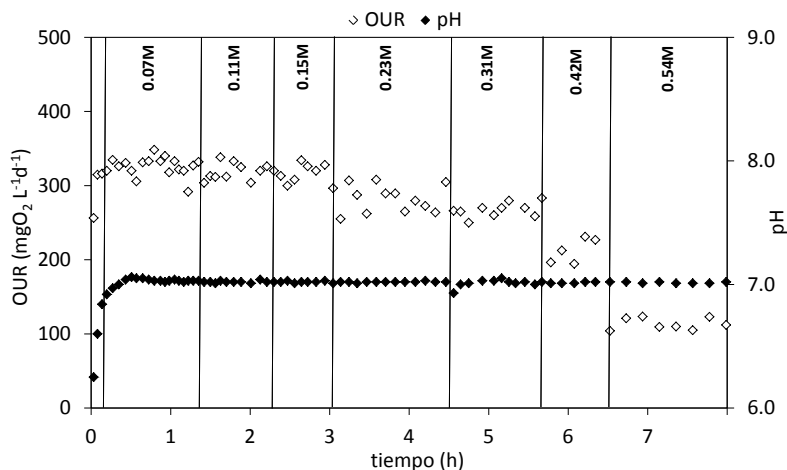


Figura 4.10. Resultados del experimento 1 en donde se evaluó el efecto de la concentración molar de cloruro de sodio (NaCl) sobre la actividad bacteriana (medida como OUR) a pH 7 y 30°C. Al inicio del experimento se adicionó 1000 mg N-NH₄ L⁻¹ para no limitar la actividad de los organismos AOB por déficit de sustrato.

En los experimentos en los que se empleó sales de amonio, como es el caso del experimento 3 en el que se adicionó nitrato de amonio (NH₄NO₃) y cuyos resultados se muestran en la Figura 4.11, se observa que la actividad de los organismos AOB aumenta a medida que la concentración de amonio se incrementa hasta alcanzar una concentración de amonio a partir de la cual la actividad disminuye.

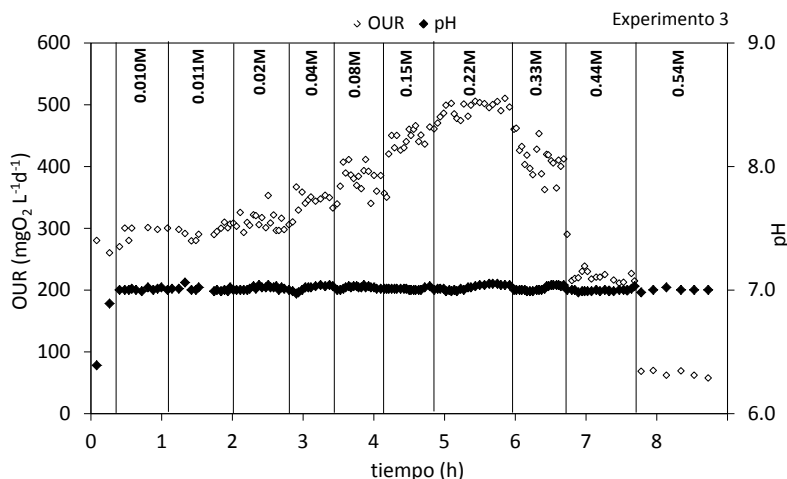


Figura 4.11. Resultados del experimento 3 en donde se evaluó el efecto de la concentración molar de nitrato de amonio (NH₄NO₃) sobre la actividad bacteriana (medida como OUR) a pH 7 y 30°C.

Los resultados obtenidos para todos los experimentos realizados se muestran en la Figura 4.12. Como se explicó anteriormente, para poder comparar los experimentos entre sí fue necesario normalizar los valores de la OUR obtenidos en cada nivel de concentración evaluado respecto del valor máximo de la OUR alcanzado en cada experimento. De esta manera, se calculó en cada experimento el cociente entre el valor de la OUR para cada concentración de

sal evaluada y el valor máximo de la OUR en dicho experimento. Este cociente fue expresado como el porcentaje del valor máximo de la OUR (%OUR). Dado que el valor de la OUR se mantuvo relativamente constante en cada nivel de concentración de sal evaluado, el análisis de los resultados se realizó utilizando el valor medio de la OUR para cada nivel de concentración.

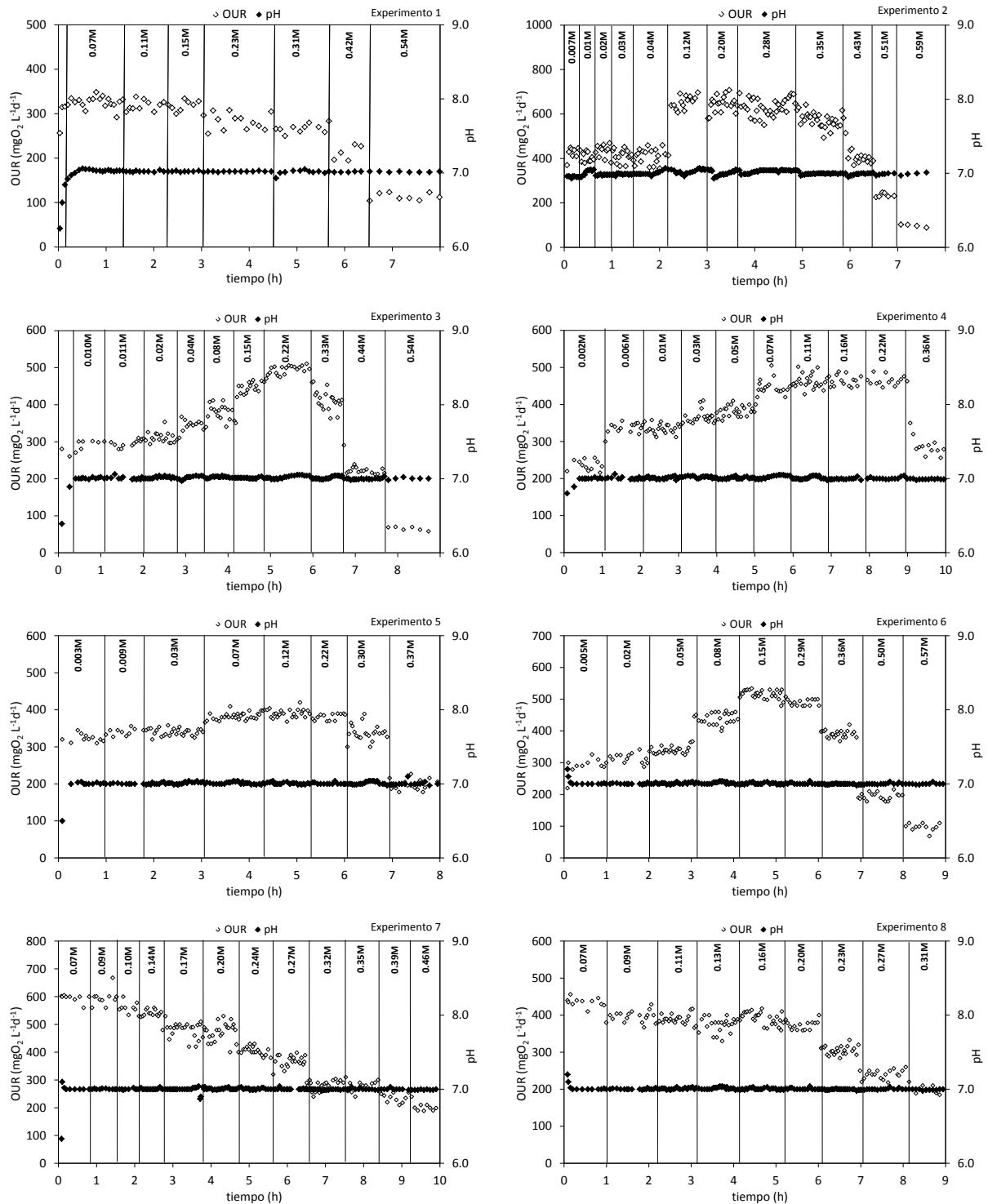


Figura 4.12. Evolución de la OUR y la salinidad (M) en los experimentos realizados para evaluar el efecto de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB.

La Figura 4.13 muestra la velocidad de consumo de oxígeno normalizada (%OUR) frente a la concentración de sal en todos los experimentos realizados con diferentes tipos de sales, y también se han incluido los experimentos descritos en el apartado 4.1.2.1, en los que se empleó cloruro de amonio (NH_4Cl). Para comparar todos los resultados obtenidos, el rango de concentración de sal representado en esta figura inicia en 0.1 M debido a que en los experimentos en los que se empleó sal sin amonio el efecto de ésta sobre la actividad de los organismos AOB se evaluó tras la adición de sustrato ($1000 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$).

Como se puede observar en la Figura 4.13, los resultados presentan una tendencia similar en la reducción de la actividad bacteriana (%OUR) a medida que se incrementó la concentración de sal. En todos los experimentos se produce una inhibición similar independientemente del tipo de sal empleada y del pH. Estos resultados ponen de manifiesto que la inhibición de la actividad de los organismos AOB a altas concentraciones de amonio (NH_4^+) observada en los experimentos del apartado 4.1.2.1 (ver Figura 4.9a) es consecuencia de la alta salinidad, y no de que el amonio por sí mismo sea inhibidor.

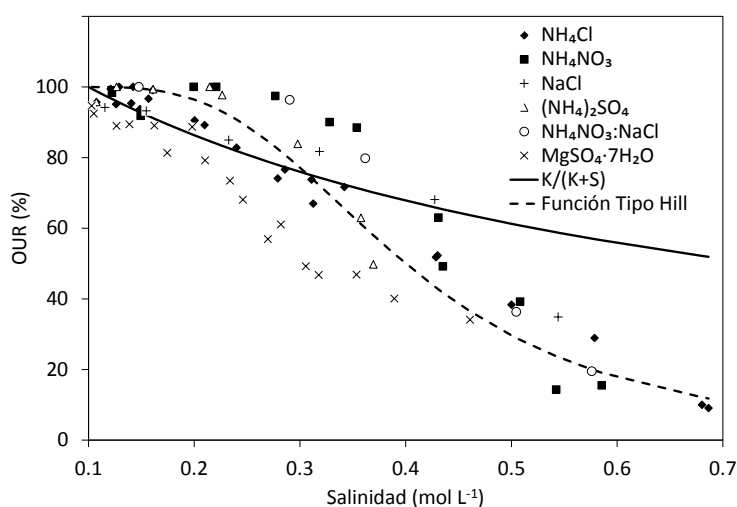


Figura 4.13. Actividad de los organismos AOB, normalizada y expresada como % OUR, frente a la salinidad.

Mediante el ajuste de la función típica de inhibición no competitiva (Ecuación 4.2) a los resultados experimentales recogidos en la Figura 4.12, se observó que ésta no era capaz de representar adecuadamente el efecto inhibitorio de la salinidad sobre la actividad de los organismos AOB, por lo que se buscó una función alternativa de estructura similar que fuera capaz de hacerlo. Así la función Hill (Ecuación 4.3) con valor de 0.3M para la constante de inhibición por salinidad (K_M) y $n=3$ para el parámetro de ajuste, describió adecuadamente el comportamiento observado (Claros *et al.*, 2010).

Función de inhibición no competitiva	$\frac{K_M}{K_M + S_M}$	4.2
--------------------------------------	-------------------------	-----

Donde K_M es la constante de inhibición por salinidad y S_M es la concentración de sal.

Función de inhibición tipo Hill	$\frac{K_M^n}{K_M^n + S_M^n}$	4.3
---------------------------------	-------------------------------	-----

donde K_M es la constante de inhibición por salinidad, S_M es la concentración de la sal y n es el parámetro de ajuste.

El efecto de la salinidad sobre los organismos nitrificantes ha mostrado que la alta presión osmótica puede llegar a alterar la estructura de la bacteria ocasionando cambios en su morfología y tamaño (Chen *et al.*, 2003). Sin embargo, la inhibición de la nitrificación puede llegar a ser parcialmente aliviada por la presencia de iones de potasio (K^+) en el medio, los cuales permiten regular la cantidad de agua en el citoplasma celular mediante su acumulación en el interior de la bacteria (Jin *et al.*, 2007). La aclimatación bacteriana y los cambios en la estructura de la comunidad microbiana representan un papel importante en la adaptación de los organismos nitrificantes a la alta salinidad (Bassin *et al.*, 2011). Dentro del grupo de organismos AOB los resultados obtenidos en la investigación de Bassin *et al.* (2011) muestran que las especies *Nitrosomona europaea* y *Nitrosomona eutropha* presentan alta tolerancia a la salinidad, con un 80% de actividad a concentraciones de sal inferiores a 0.3 mol L^{-1} . Estos resultados son coherentes con los obtenidos en este trabajo de investigación debido a que estas especies de organismos AOB fueron también identificadas en el reactor SHARON objeto de estudio, y además los resultados obtenidos del efecto de la salinidad sobre su actividad indicaron que para concentraciones de sal superiores a 0.3 M su actividad desciende considerablemente. Asimismo, estos resultados están relacionados con los obtenidos por Chen *et al.* (2003), quienes indicaron que las especies *Nitrosomona europaea* y *Nitrosomona eutropha* son dominantes a concentraciones de sal inferiores a 0.28 mol L^{-1} , mientras que para concentraciones de sal en el intervalo comprendido entre 0.28 mol L^{-1} y 0.51 mol L^{-1} la especie de AOB dominante es *Nitrosococcus mobilis*. Por otra parte, la especie *Nitrosomona oligotropha*, identificada mayoritariamente en los procesos de tratamiento de agua residual urbana que contienen bajas concentraciones de nitrógeno amoniacal ($< 100 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$) presentan una menor tolerancia a la salinidad, reduciéndose drásticamente su actividad a concentraciones de sal superiores a 0.02 mol L^{-1} (Claros *et al.*, 2010).

Las investigaciones realizadas por Jin *et al.*, (2007) muestran que los organismos nitritoxidantes (NOB) son más sensibles al estrés osmótico que los organismos amonioxidantes (AOB), causando la acumulación de nitrito. Este hecho podría explicar la obtención de la ruta del nitrito en el tratamiento biológico de corrientes de agua residuales con altas concentraciones de nitrógeno amoniacal operados a tiempos de retención celular relativamente altos (superiores a 1 día).

4.1.2.3 Efecto de la concentración de nitrito y ácido nitroso sobre la actividad de los organismos AOB

El efecto de la concentración de nitrito y ácido nitroso fue evaluado siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 3.2.1.4. En estos experimentos la concentración de nitrito (NO_2^-) fue progresivamente incrementada mediante la adición de nitrito sódico (NaNO_2). En la Tabla 4.5 se encuentran las concentraciones de nitrito empleadas en los experimentos, y como se puede observar el rango de concentraciones evaluado comprendió desde 75 hasta 5000 mg N- NO_2 L⁻¹. Los valores de pH empleados permitieron alcanzar concentraciones de ácido nitroso (HNO_2) relativamente altas, sin tener que adicionar demasiada cantidad de nitrito sódico como para inhibir la actividad de los organismos AOB por la alta salinidad.

Tabla 4.5. Concentraciones de nitrito empleadas en el estudio del efecto del nitrito y ácido nitroso sobre la actividad de los organismos AOB.

pH	Experimento	Concentración de Nitrito (mg N- NO_2 L ⁻¹)						
6.25	1	170	350	500	1000	1550	2000	
6.50	2	95	200	550	1170	2000	3000	5000
7.00	3	75	550	1550	3000	4600		

En la Figura 4.14 se muestran los resultados de la evolución de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y de la concentración de nitrito en los experimentos realizados a pH 6.25, 6.50 y 7.00. Como se puede observar en esta figura, conforme se fue incrementando la concentración de nitrito y, por tanto, la concentración de ácido nitroso, la OUR descendió de manera progresiva. La máxima actividad de los organismos AOB se obtuvo al inicio del experimento.

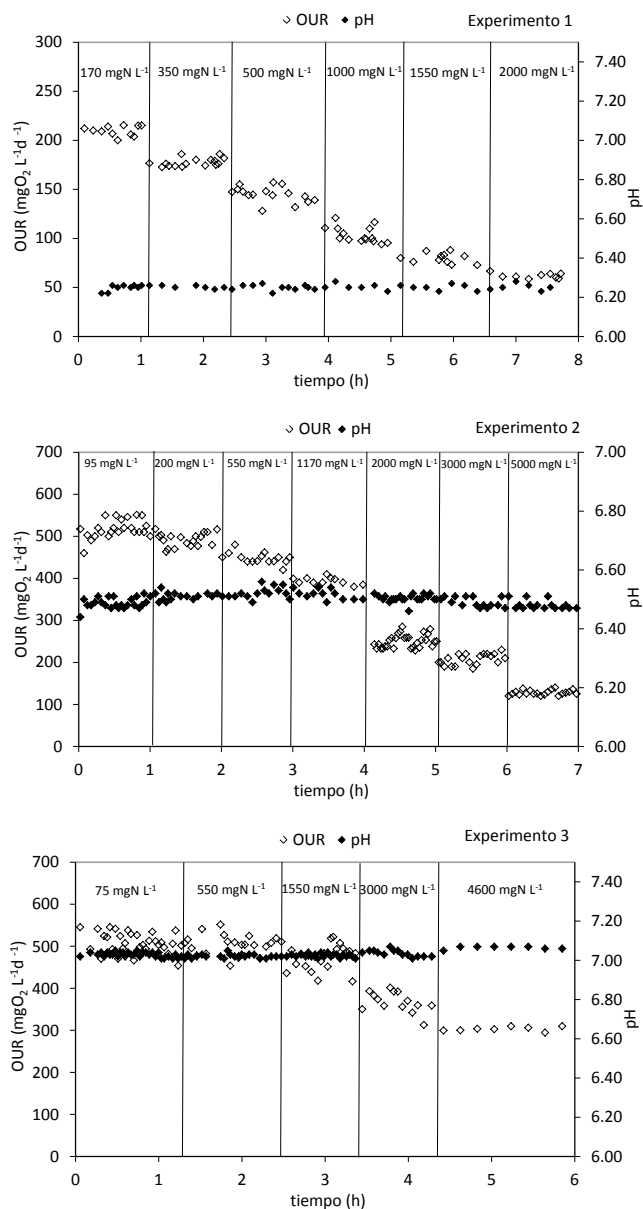


Figura 4.14. Evolución de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) para cada concentración de nitrito empleada en los experimentos realizados a pH 6.25, 6.50 y 7.00.

Al igual que en los apartados anteriores (4.1.2.1 y 4.1.2.2) para comparar los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados, la actividad (OUR) registrada de los organismos AOB para cada nivel de concentración evaluado fue normalizada con respecto al valor máximo alcanzado en cada experimento. En la Figura 4.15 se encuentra representada la actividad bacteriana, expresada como la velocidad de consumo de oxígeno normalizada (%OUR), en función de las concentraciones de nitrito y de ácido nitroso, éste último calculado mediante las Ecuaciones 3.6, 3.7 y 3.8 (apartado 3.2.1.4) teniendo en cuenta el pH de cada experimento y que la temperatura en todos ellos se mantuvo constante en 30°C. Como se observa en esta figura en los tres experimentos la disminución de la actividad (%OUR) siguió la misma tendencia al representarla frente a la concentración de ácido nitroso

independientemente del pH, mientras que fue muy diferente al representarla frente a la concentración de nitrito. Estos resultados permiten confirmar que la inhibición de la actividad de los organismos AOB es debida al ácido nitroso (HNO_2) y no al nitrito presente en el licor mezcla del reactor.

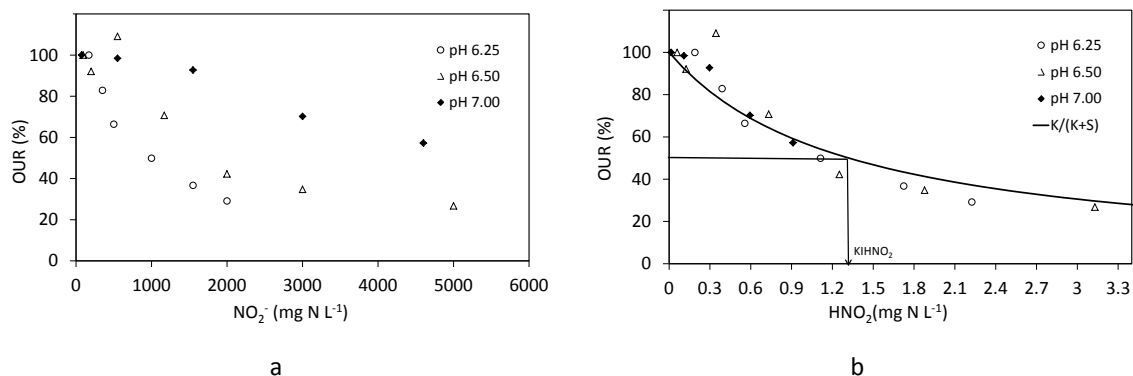


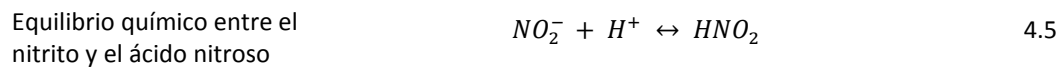
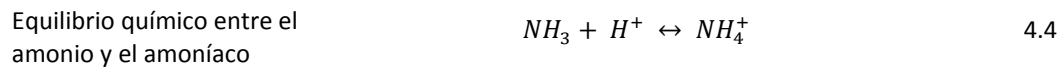
Figura 4.15. Actividad de los organismos AOB medida como porcentaje de OUR frente a la concentración de: (a) nitrito (N-NO_2^-) y (b) ácido nitroso (N-HNO_2).

Ajustando la función típica de inhibición no competitiva (Ecuación 4.2, apartado 4.1.2.2) a los resultados experimentales recogidos en la Figura 4.15b, se puede observar que esta función representa adecuadamente el efecto inhibitorio del ácido nitroso. A partir del ajuste realizado, se ha obtenido que la concentración de ácido nitroso que reduce la actividad de los organismos AOB al 50% es de $1.32 \text{ mg N-HNO}_2 \text{ L}^{-1}$, valor que se encuentra dentro del rango establecido por las referencias bibliográficas $0.07\text{--}2.8 \text{ mg N-HNO}_2 \text{ L}^{-1}$ (Jones *et al.*, 2007; Wett *et al.*, 2003). La variabilidad en los resultados encontrados en bibliografía puede ser debida a la combinación de parámetros de operación, condiciones ambientales y poblaciones microbianas asociadas al fango activo empleado en cada estudio (Zhou *et al.*, 2011). La tolerancia a las altas concentraciones de ácido nitroso en el medio por parte de la especie *Nitrosomonas europaea* spp., identificada como una de las más abundantes en el proceso SHARON estudiado, viene dada por la presencia de la enzima NirK, localizada en el periplasma de la bacteria e implicada en el metabolismo del nitrógeno (Beaumont *et al.*, 2002). Por otra parte, las investigaciones realizadas por Yang *et al.* (2003) señalan que la inhibición puede ser reversible por lo que tras disminuir la concentración de ácido nitroso en el licor mezcla la actividad de los organismos AOB volvería a incrementarse.

En el caso de los procesos convencionales de eliminación biológica de nitrógeno vía nitrato (NO_3^-), la inhibición que produce la presencia de ácido nitroso en el medio es más severa sobre los organismos nitritoxidantes (NOB) que sobre los organismos amonioxidantes (AOB), por lo que la ruta del nitrito puede verse favorecida (Vadivelu *et al.*, 2006b).

4.1.2.4 Efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB

La influencia del pH sobre la actividad de los organismos AOB es compleja, puesto que el pH afecta al equilibrio químico de las reacciones ácido-base entre el amoníaco (NH_3) y el amonio (NH_4^+), así como entre el ácido nitroso (HNO_2) y el nitrito (NO_2^-), de acuerdo con las Ecuaciones 4.4 y 4.5, respectivamente, modificando la cantidad de sustrato disponibilidad para los organismos AOB, así como la cantidad de agente inhibidor en el licor mezcla. En estas reacciones ácido-base el hecho de que predomine la forma ionizada o la no ionizada dependerá del pH y de la temperatura. Además, las variaciones del pH en el reactor se verán amortiguadas por la presencia de bicarbonato (HCO_3^-) en el licor mezcla, de acuerdo con la Ecuación 1.6 (apartado 1.2.1.1.1); de manera que cuando se desabsorbe dióxido de carbono (CO_2) del reactor y los protones (H^+) son eliminados, con el consecuente incremento del pH del licor mezcla.



Por todo lo que se acaba de indicar, para estudiar el efecto del pH se planificó el procedimiento que se describe en el apartado 3.2.1.5, en el que se evalúa un amplio rango de concentraciones amonio y nitrito de partida. Las concentraciones iniciales de amonio y nitrito empleadas en los nueve experimentos realizados se encuentran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Concentraciones iniciales de amonio y nitrito empleadas en cada uno de los experimentos realizados para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
N-NH ₄ mg L ⁻¹	550	550	550	1100	1100	1100	1100	1100	2000
N-NO ₂ mg L ⁻¹	700	1000	2000	1000	4000	4000	500	200	2000

En la Figura 4.16 se presentan los resultados obtenidos en el experimento 9. En la Figura 4.16a se encuentra representada la evolución de la actividad expresada como velocidad de consumo de oxígeno (OUR, mg O₂ L⁻¹ d⁻¹) en cada nivel de pH evaluado a lo largo del experimento, y en la Figura 4.16b se representa la actividad de los organismos AOB, normalizada respecto del máximo alcanzado en el experimento (%OUR) frente al pH.

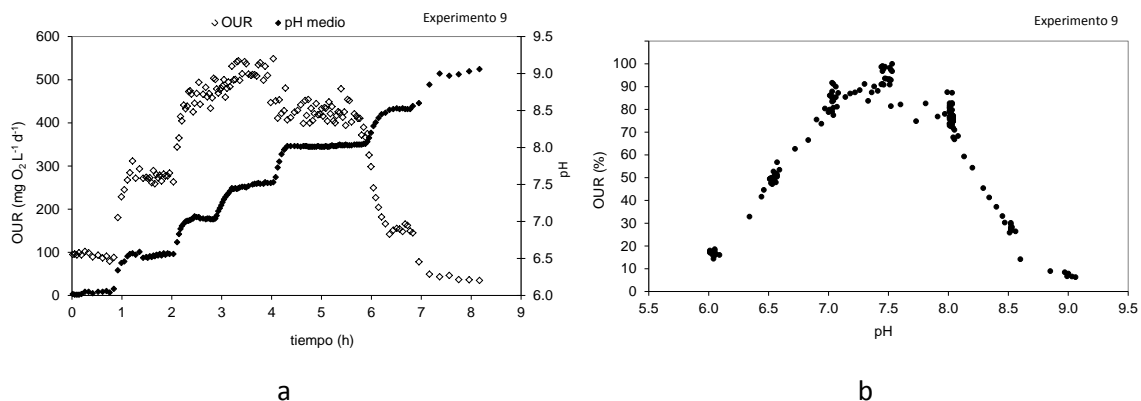


Figura 4.16. Resultados del experimento 9: a) Evolución de la OUR en cada nivel de pH evaluado a lo largo del experimento, b) OUR normalizada respecto de su valor máximo frente al pH en este experimento.

Como se puede observar en la Figura 4.16 conforme el pH se fue incrementando, la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) aumentó, hasta alcanzar un máximo (entre pH 7 y 7.5) a partir del cual comenzó a descender progresivamente a medida que se continuó incrementando el pH. Además se puede apreciar que el descenso de la OUR a valores de pH por encima del óptimo es más rápido que a pH por debajo del óptimo, mostrando que el efecto del pH sobre los organismos AOB no responde a comportamiento simétrico. Similar comportamiento se obtuvo en todos los experimentos realizados, y cuyos resultados se muestran en la Figura 4.17. Los resultados son coherentes con los obtenidos por Van Hulle *et al.* (2007), que indican que en el rango de pH comprendido entre 6.5 y 8.0 la actividad de los organismos AOB es óptima. Estos autores sugieren además que el efecto del pH es igual a ambos lados del pH óptimo, lo cual difiere de los resultados obtenidos en esta investigación, que señala que éste efecto es mayor a valores por encima del pH óptimo.

El descenso en la actividad de los organismos AOB a valores por encima del pH óptimo no es debido a la falta de sustrato (NH₃), ya que según los resultados del apartado 4.1.2.1, en ningún caso la concentración de amonio alcanzó a ser inhibitoria, y conforme incrementa el pH también lo hace la concentración de sustrato. Además, a pesar de la alta concentración de nitrito empleada y su continua generación como resultado del proceso de nitrificación a lo largo del experimento, la disponibilidad en el licor mezcla de ácido nitroso se reduce al incrementar el pH. Por tanto, la disminución de la actividad observada tampoco puede ser atribuida a la presencia de ácido nitroso. La salinidad alcanzó su máximo valor durante este experimento (el nº 9), situándose en 0.15 mol L⁻¹, concentración insuficiente para inhibir la actividad de los organismos AOB, de acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado 4.1.2.2. Por tanto, se puede afirmar que el descenso observado en la actividad de los organismos AOB se debe al elevado pH. Por otro lado, la reducción en la actividad de los organismos AOB a valores por

debajo del pH óptimo no sólo es consecuencia del bajo pH sino también de la alta disponibilidad de ácido nitroso en el licor mezcla, que llega a ser de $3.5 \text{ mg N-HNO}_2 \text{ L}^{-1}$ a pH 6 y 30°C . De acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado 4.1.2.3, la actividad de los organismos AOB se reduce al 50% con una concentración de $1.32 \text{ mg N-HNO}_2 \text{ L}^{-1}$. En ningún caso el descenso de la actividad de los organismos AOB a pH por debajo del óptimo fue consecuencia de limitación por sustrato, puesto que la concentración de amoníaco en el momento más desfavorable se situó en $1.8 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$, y según los resultados obtenidos en el apartado 4.1.2.1, la actividad de los organismos AOB se reduce al 50% cuando la concentración de amoníaco en el medio es de $0.32 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$.

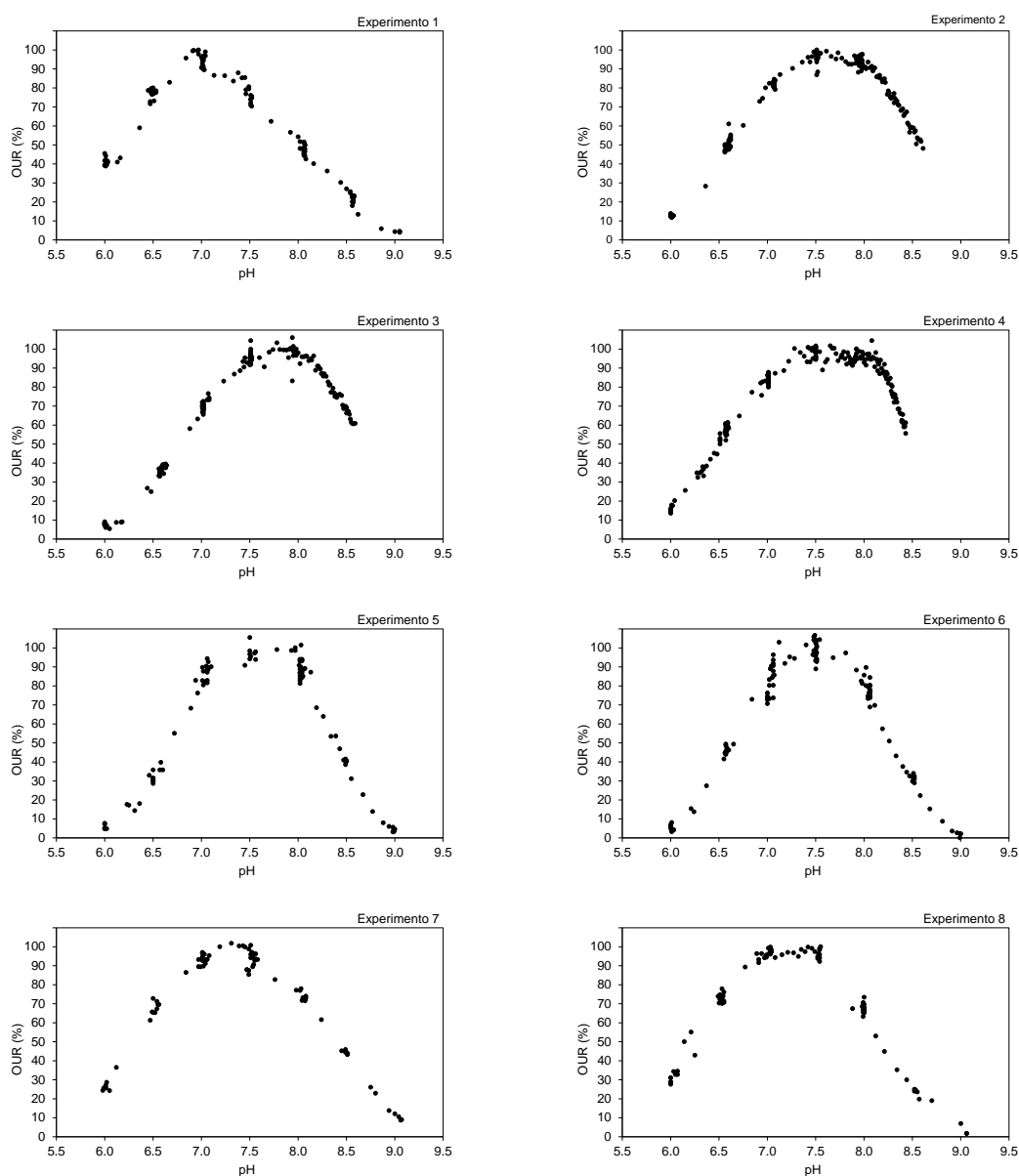


Figura 4.17. Evolución de la OUR normalizada respecto de su valor máximo (%OUR) frente al pH en los experimentos realizados para evaluar el efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB

En la Figura 4.18 se muestra para todos los experimentos la OUR normalizada respecto del máximo de cada experimento frente al pH. Esta figura que permite comparar simultáneamente los nueve experimentos realizados, muestra que el rango en que se encuentra el pH óptimo no es el mismo en todos los casos. Así en los experimentos del 1 al 4 realizados con fango activo del reactor SHARON cuando el pH del reactor estaba en torno a 6.6, el rango de pH óptimo se desplazó ligeramente hacia la derecha (pH óptimo entre 7.5 y 8); mientras que en los experimentos del 5 al 9 realizados cuando el pH del reactor estuvo en torno a 6.2, el rango de pH óptimo se situó entre 7 y 7.5. Estos resultados permiten afirmar que el pH óptimo de los organismos AOB depende de las condiciones ambientales en las que se desarrollan, siendo capaces, por tanto, de adaptar su pH óptimo a las condiciones en las que crecen.

El efecto del pH se representó mediante la función asimétrica representada en la Ecuación 4.6, la cual permite ajustar de manera independiente ambos lados del pH óptimo (Claros *et al.*, 2011). En esta expresión las constantes K_{IH} y K_H indican el pH al que se alcanza la mitad de la velocidad máxima de crecimiento, mientras que las constantes A_H y A_{IH} permiten ajustar la pendiente de la curva de inhibición a ambos lados del pH óptimo. Se incluye en la expresión la función de inhibición no competitiva para el ácido nitroso determinada en el apartado 4.1.2.3, para tener en cuenta que a pH por debajo del pH óptimo la reducción de la actividad de los organismos AOB es debida en parte a la concentración de ácido nitroso disponible en el licor mezcla.

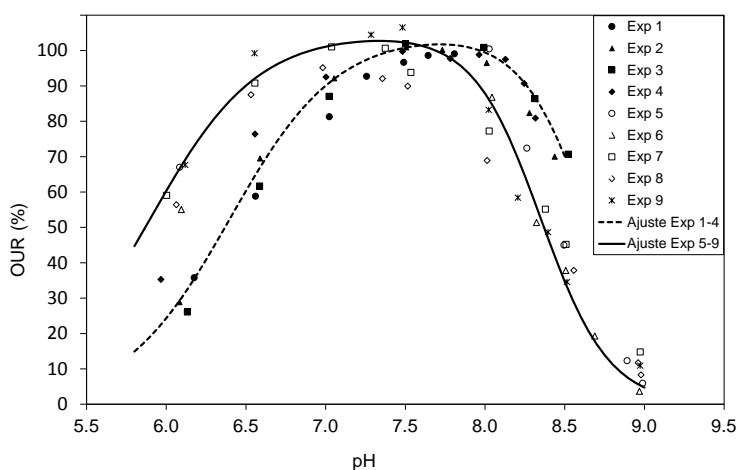


Figura 4.18. Actividad de los organismos AOB normalizada (%OUR) frente al pH para todos los experimentos.

$$\frac{OUR}{OUR_{max}} = \frac{K_{IHNO_2}}{K_{IHNO_2} + S_{HNO_2}} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad 4.6$$

La Tabla 4.7 contiene los resultados del ajuste de la expresión anterior a los dos grupos de experimentos obtenidos. El valor del pH óptimo en los experimentos del 1 al 4 fue 7.75, los cuales fueron realizados cuando el pH del reactor SHARON se encontró en 6.6. Por otro lado, el pH óptimo de los experimentos del 5 al 9 fue 7.4, durante estos experimentos el pH en el reactor SHARON fue 6.2. Se empleó la constante de inhibición para el ácido nitroso de 1.32 mg N-HNO₂ L⁻¹, obtenida en los experimentos descritos en el apartado 4.1.2.3.

Tabla 4.7. Constantes de inhibición (expresadas en unidades de pH) y pH óptimo obtenido del ajuste de la ecuación 4.6 a los resultados experimentales mostrados en la Figura 4.18.

Experimentos	pH del reactor	K _H	A _H	K _{IH}	A _{IH}	pH óptimo
1,2,3,4	6.60	6.40	1	8.55	3	7.75
5,6,7,8,9	6.20	5.70	1	8.20	3	7.40

4.1.2.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB

Los experimentos para determinar el efecto de la temperatura fueron realizados siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.1.6 de la sección de materiales y métodos. Tal y como se indica en dicho apartado, los experimentos se realizaron utilizando biomasa del reactor SHARON de nitrificación parcial R1 tanto durante el período en el que la temperatura de operación estuvo controlada en 30°C como cuando estuvo controlada en 35°C (ver Figura 4.5). En concreto, los experimentos 1 y 2 fueron realizados con biomasa extraída de este sistema los días 650 y 652, respectivamente; mientras que los experimentos 3 y 4 fueron realizados con biomasa extraída los días 940 y 942, respectivamente.

En la Figura 4.19 se muestra la evolución de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) a lo largo de los cuatro experimentos realizados y los escalones de temperatura evaluados. Las Figuras 4.19a y 4.19b corresponden con el período en el que la temperatura de operación del reactor SHARON fue de 30°C, mientras que las Figuras 4.19c y 4.19d corresponden con el período de operación a una temperatura de 35°C. Como se puede observar en esta figura, en todos los casos la actividad bacteriana aumentó a medida que se incrementó la temperatura, hasta alcanzar la temperatura de 40°C. Valores superiores de temperatura ocasionaron que la actividad de los organismos AOB descendiera considerablemente, sin llegar a estabilizarse para una temperatura de 45°C. Al comparar los resultados entre sí, se puede observar como la actividad bacteriana experimentó un incremento en torno al 12% al pasar de 35 a 40°C con

fango aclimatado a una temperatura de 30°C. En los experimentos realizados con fango aclimatado a una temperatura de 35°C, el rango de máxima actividad se alcanzó en el intervalo de temperatura comprendido entre 35 y 40°C.

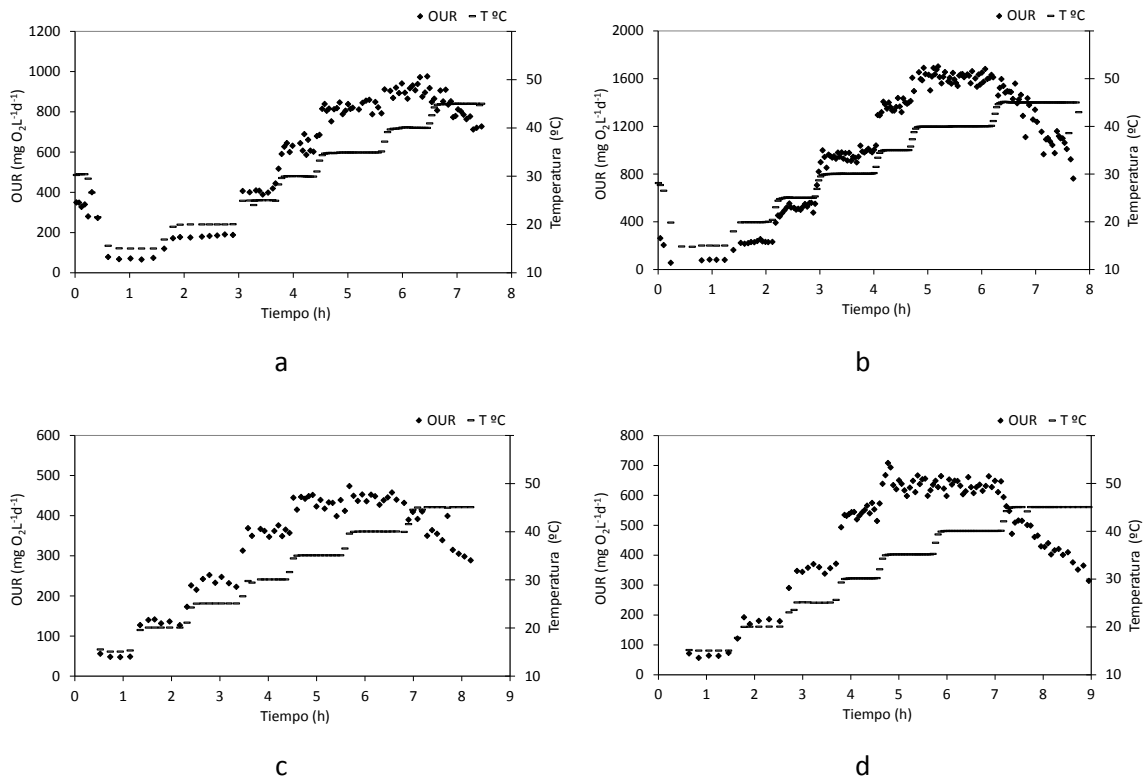


Figura 4.19. Efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB: a) Experimento 1 con fango aclimatado a 30°C; b) Experimento 2 con fango aclimatado a 30°C; c) Experimento 3 con fango aclimatado a 35°C; d) Experimento 4 con fango aclimatado a 35°C.

Para poder comparar los resultados obtenidos en los cuatro experimentos fue necesario normalizar los valores de OUR obtenidos en cada escalón de temperatura evaluado respecto del valor máximo de OUR alcanzado en cada experimento. Por tanto, se calculó en cada experimento el cociente entre el valor de la OUR para cada escalón de temperatura y el valor máximo de la OUR en dicho experimento, siendo dicho cociente el porcentaje del valor máximo de OUR (%OUR) alcanzado. En la Figura 4.20 se muestran los resultados obtenidos que indican que el rango de temperatura en donde la actividad de los organismos AOB es óptima (superior al 80%) se encuentra comprendido entre 35 y 40°C, que el proceso de nitrificación no es estable a temperaturas superiores a 40°C debido a que su actividad desciende significativamente, y que para temperaturas inferiores a 25°C la actividad de los organismos AOB se reduce considerablemente a valores de OUR inferiores al 40%.

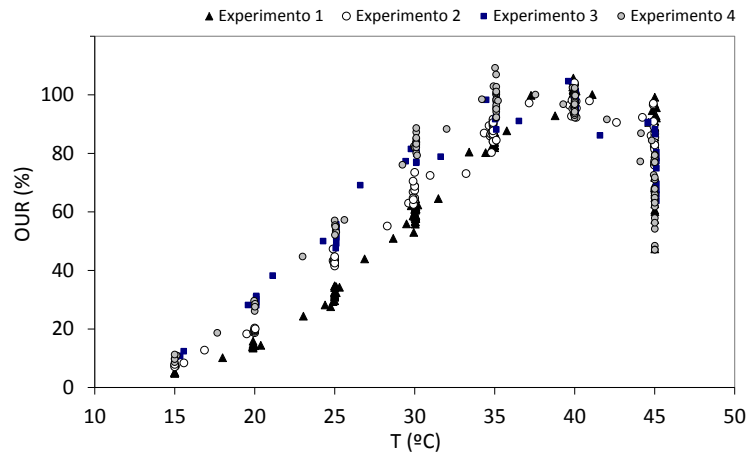


Figura 4.20. Actividad de los organismos AOB, normalizada y expresada como %OUR, frente a la temperatura. Experimentos 1 y 2 realizados con fango aclimatado a 30°C, y experimentos 3 y 4 realizados con fango aclimatado a 35°C.

Para representar matemáticamente el efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB se emplearon dos modelos: *Arrhenius* (Ecuación 4.7) y *Ratkowsky* modificado (Ecuación 4.8). El ajuste se realizó utilizando los valores medios de la OUR normalizada para cada temperatura, excluyendo los valores superiores a 40°C debido a que la actividad no se estabilizó, tal y como se puede observar en la Figura 4.19.

$$\text{Arrhenius} \quad OUR = OUR_{Tr} \cdot \theta^{(T-Tr)} \quad 4.7$$

donde OUR_{Tr} es el valor de la OUR a una temperatura de referencia (Tr).

$$\text{Ratkowsky modificado} \quad OUR = 100 \cdot [b \cdot (T - T_{min})]^2 \cdot [1 - e^{-c \cdot (T - T_{max})}] \quad 4.8$$

T_{max} = temperatura máxima de crecimiento; T_{min} = Temperatura mínima de crecimiento; b y c son parámetros de ajuste.

El mejor ajuste a los datos experimentales se obtuvo con los parámetros que se muestran en la Tabla 4.8, y se representa gráficamente en la Figura 4.21. Como se puede observar en la Figura 4.21a el modelo de *Arrhenius* representa adecuadamente el efecto para valores de temperatura hasta 30°C. Para temperaturas mayores es necesario utilizar el modelo modificado de *Ratkowsky*, que tal y como se observa en la Figura 4.21b, presenta un ajuste satisfactorio para el rango de temperatura comprendido entre 15 y 40°C (Claros *et al.*, 2009).

Tabla 4.8. Parámetros empleados en el ajuste de los modelos de Arrhenius y Ratkowsky a los datos experimentales obtenidos en los ensayos de barrido de temperatura.

Parámetro	Arrhenius			Ratkowsky		
	θ	Temp. (°C)	Temp. máxima (°C)	Temp. mínima (°C)	b	c
Experimento	1.14	30	48.7	8.6	0.0046	0.0766

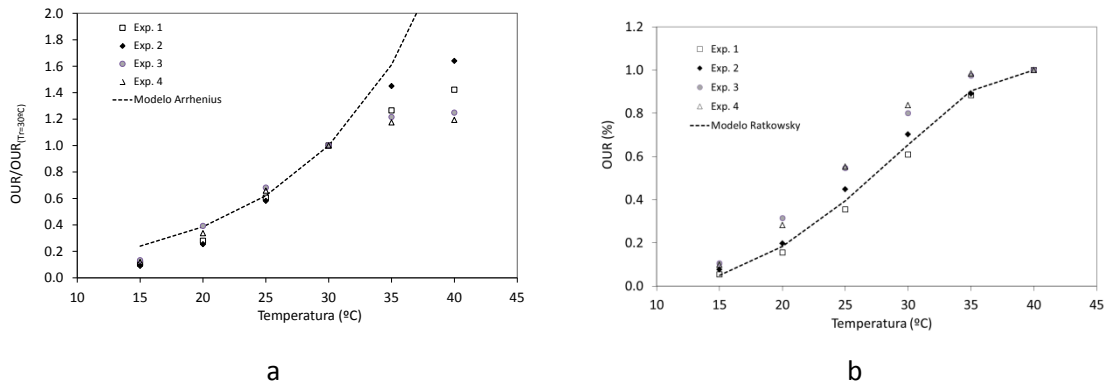


Figura 4.21. Resultados de los ajustes de los modelos a los resultados experimentales obtenidos en los experimentos de barrido de temperatura: a) Arrhenius y b) Ratkowsky.

Mientras que en el primer grupo de experimentos (1 a 4) la estabilidad fue determinada durante aproximadamente una hora en cada nivel de temperatura, en el segundo grupo de experimentos la temperatura se mantuvo fija durante aproximadamente ocho horas. En la Figura 4.22 se muestra la evolución de la actividad de los organismos AOB a diferentes valores de temperatura (30, 35, 40 y 45°C) evaluada durante un período de aproximadamente 8 horas. Los cuatro experimentos fueron realizados empleando fango aclimatado a 30°C.

En el experimento puntual realizado a una temperatura de 30°C, la evolución de la velocidad de consumo de oxígeno fue constante durante las ocho horas de evaluación, situándose en todo momento en torno al máximo (Figura 4.22a), como cabría esperar puesto que el fango empleado estaba aclimatado a esta temperatura. En el experimento realizado a 35°C (Figura 4.22b) se observa cómo la actividad de los organismos AOB se encuentra próxima a su máximo durante las primeras cinco horas de evaluación, y partir de ese momento, la *OUR* descendió hasta situarse en torno al 70% de actividad al cabo de ocho horas de evaluación. Resultados similares fueron obtenidos en el experimento realizado a 40°C (Figura 4.22c), en el que la actividad de los organismos AOB fue máxima durante las primeras cuatro horas de experimentación, momento a partir del cual la actividad descendió de manera progresiva hasta situarse en torno al 60% tras ocho horas de experimento. Este descenso en la actividad de los organismos AOB no puede atribuirse ni a una limitación por falta de sustrato ni al efecto

inhibitorio del ácido nitroso, puesto que las determinaciones analíticas realizadas al final de cada experimento mostraron concentraciones de amoníaco superiores a $5 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$ y concentraciones de ácido nitroso inferiores a $0.13 \text{ mg N-HNO}_2 \text{ L}^{-1}$ (a la temperatura y pH del experimento). La reducción de la actividad fue más acusada en el experimento realizado a 40°C que en el realizado a 35°C , lo cual posiblemente fue ocasionado con el hecho de que la temperatura en el primer caso se encuentra más alejada del valor al que se encuentra aclimatada la biomasa que se utilizó para la realización de los experimentos, que era de 30°C .

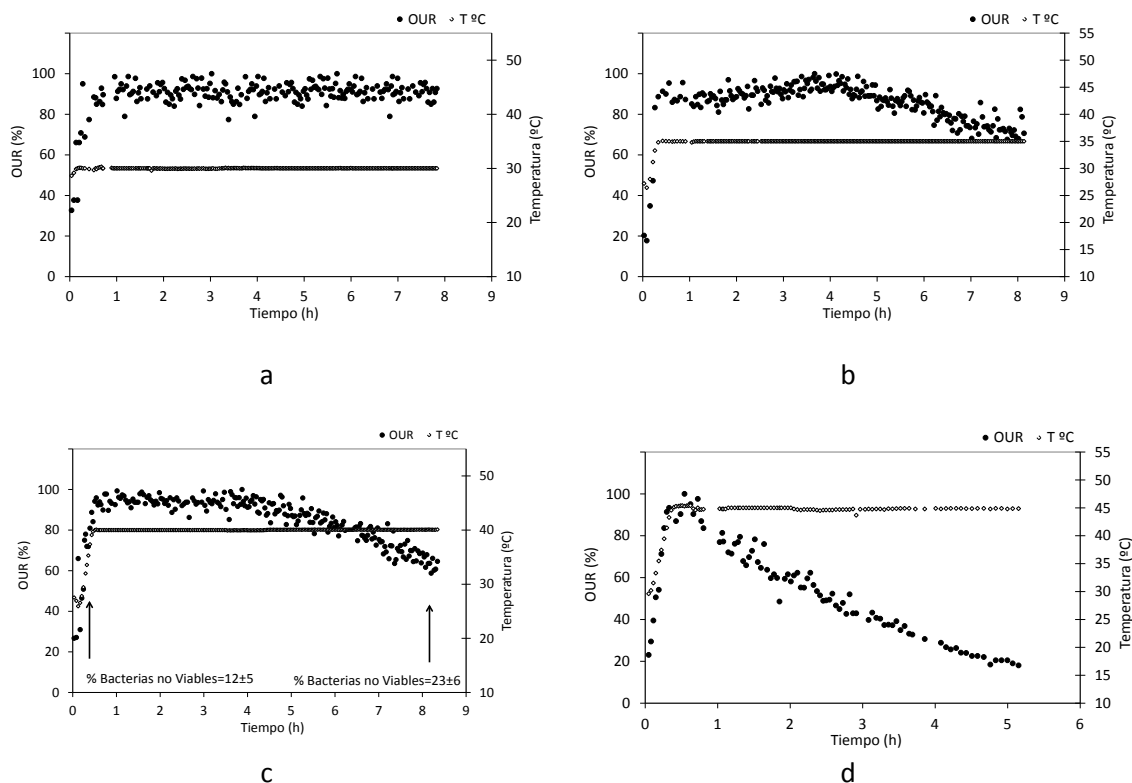


Figura 4.22. Actividad de los organismos AOB, normalizada y expresada como %OUR, frente a la temperatura. Experimentos: a) 30°C ; b) 35°C ; c) 40°C y d) 45°C .

En el experimento realizado a 40°C se utilizó la técnica de viabilidad celular para conocer el porcentaje de bacterias no viables al inicio y al final del experimento. Los resultados de esta técnica mostraron que el porcentaje de bacterias no viables se incrementó desde $12\pm 5\%$ hasta un $23\pm 6\%$, tras 8 horas de experimento (Figura 4.23). Estos resultados indican que a pesar de registrar valores altos de actividad celular al inicio de los ensayos realizados a 35 y 40°C , el descenso de la OUR puede ser atribuido a la no adaptación de la población de microorganismos a cambios bruscos de temperatura. Por lo que cambios repentinos de la temperatura podría influir de manera adversa en la actividad de AOB, ocasionando un descenso en la eficiencia del proceso de nitrificación parcial. En cualquier caso, teniendo en cuenta el escaso incremento de la actividad de las bacterias AOB al pasar de 35 a 40°C , no

compensa económicamente llevar a cabo el proceso a temperaturas superiores a 35°C. Finalmente indicar, que tal y como se observa en la Figura 4.22d, a una temperatura de 45°C las bacterias no pueden mantener su actividad.

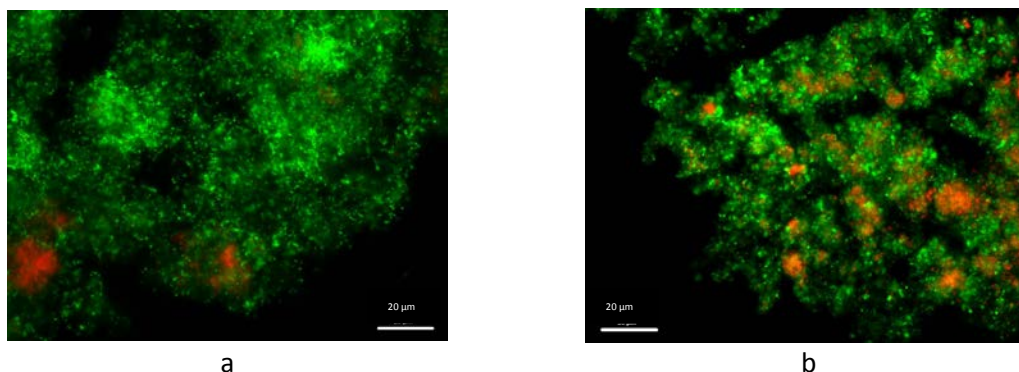


Figura 4.23. Viabilidad celular determinada en el experimento realizado a 40°C. Porcentaje de bacterias no viables: a) al inicio del experimento (12±5%) y (b) al final del experimento (23±6%). Imágenes tomadas a 63x.

4.1.2.6 Efecto del tiempo de retención hidráulico sobre las características del efluente del proceso

La obtención de un proceso de nitrificación parcial estable está relacionada con la eliminación de las bacterias NOB del reactor, responsables de la oxidación del nitrito a nitrato. Una forma efectiva de conseguirlo es operando el proceso a elevada temperatura y con un tiempo de retención celular que sea a la vez lo suficientemente alto como para mantener a los organismos AOB en el reactor pero lo suficientemente bajo como para eliminar a los organismos NOB del reactor. Partiendo de estas condiciones, si se disminuye el TRC llegará un momento en el que los organismos AOB también serán eliminados del reactor y no habrá eliminación de nitrógeno amoniacal (recordar que en este reactor el TRC es igual al TRH). Esto es precisamente lo que se pretende con este estudio, determinar el mínimo TRC que permita que el proceso SHARON funcione de manera estable obteniendo la máxima capacidad de tratamiento del sistema operado para la nitrificación parcial (50% de oxidación de amonio a nitrito). Para ello se partió de las condiciones impuestas para la puesta en marcha del proceso, con TRC efectivo de 7 días, y se procedió a incrementar el caudal afluente de manera escalonada, estudiando en cada uno de los períodos la evolución del proceso mediante determinaciones analíticas, registros *on-line* de pH, potencial redox y temperatura, y seguimiento microbiológico empleando la técnica FISH.

Este estudio fue realizado empleando el montaje experimental de nitrificación parcial R2, y tuvo una duración de 2.5 años divididos en 12 etapas de operación, en las que además de variar el caudal afluente al proceso, y consecuentemente el TRC y TRH, de manera puntual en ciertas etapas se incrementó la temperatura y se dispuso control externo de pH. En la Tabla 4.9 se encuentran descritas las características más importantes de cada etapa. Al llevar a cabo el proceso a altas temperaturas ($\geq 30^{\circ}\text{C}$) en un reactor abierto, el efecto de la evaporación resultó significativo, lo que provocó que el TRC no fuera igual al TRH (a pesar de ser un reactor RCTA sin recirculación de fangos) sino que hubiera una diferencia considerable entre ambos. Es importante destacar que este efecto varió de acuerdo al TRH y la temperatura a la que fue operado el reactor, además de las condiciones ambientales del laboratorio donde se situó el montaje experimental.

Tabla 4.9. Características de operación del reactor SHARON de nitrificación parcial R2 para estudiar el efecto del TRH sobre el rendimiento y estabilidad del proceso.

ETAPA	Q afluente L d^{-1}	Q efluente L d^{-1}	TRH d	TRC d	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Evaporación %	Nitrificación %
1	1.5	1.0	4.7	7.0	30	33	54
2	2.0	1.5	3.5	4.7	30	25	55
3	2.5	2.1	2.8	3.3	30	16	54
4	3.0	2.4	2.3	2.9	30	20	50
5	3.5	2.9	2.0	2.4	30	17	60
6	4.0	3.4	1.75	2.1	30	15	56
7	5.0	4.5	1.4	1.6	30	10	25
8	4.0	3.8	1.75	1.8	30	5	41
9	4.5	4.0	1.5	1.75	30	11	43
10	4.5	4.0	1.5	1.75	35	11	53
11	5.0	4.6	1.4	1.5	35	8	55
12	5.5	5.0	1.3	1.4	35	9	30

La Figura 4.24 muestra la evolución de los principales parámetros de seguimiento medidos a lo largo del período experimental. La evolución del proceso de nitrificación durante las cuatro primeras etapas resultó estable (Figura 4.24a), situándose el porcentaje de oxidación de amonio a nitrito en torno al 54% en las tres primeras etapas evaluadas, y cerca del 50% en la cuarta etapa. Durante estas cuatro primeras etapas la concentración de biomasa en el reactor se mantuvo por debajo de $150 \text{ mg SST L}^{-1}$ (Figura 4.24b), pero aun así, el proceso se mantuvo estable. En la Figura 4.24c se observa cómo la alcalinidad fue consumida completamente durante la operación del proceso en las condiciones establecidas en las cuatro primeras etapas.

A partir de la etapa 5 se observa cómo los incrementos de caudal afluente con la consecuente disminución de los tiempos de retención hidráulico y celular ocasionaron pérdidas

significativas de biomasa en el reactor. Debido a este lavado de las bacterias del sistema se produjo una disminución del grado de nitrificación, y como consecuencia se incrementó considerablemente el pH del medio y la alcalinidad en el efluente, alcanzando valores superiores a 8 y 1000 mg CaCO₃ L⁻¹, respectivamente. En estos períodos la producción de nitrito descendió significativamente pero la concentración de amonio en el efluente sufrió un incremento poco acusado. Esto fue debido a que parte del amonio que no fue oxidado a nitrito se desabsorbió del sistema en forma de amoniaco (NH₃), cuya concentración era alta por el elevado pH del medio y la alta temperatura de operación.

Con el paso del tiempo, la biomasa se adaptó a las nuevas condiciones, incrementando su velocidad de crecimiento y mostrando que el proceso era capaz de autorregularse. Así durante la etapa 5 y hacia el día 340 de seguimiento desde el inicio de la experimentación, se observó un acusado incremento de la concentración de biomasa en el sistema, y entre los días 350 a 420 el porcentaje de oxidación de amonio a nitrito alcanzó un 60%. Este alto rendimiento de nitrificación ocasionó que la alcalinidad acumulada se consumiera prácticamente en su totalidad, reduciéndose drásticamente el pH del medio. Respuesta similar del proceso fue observada durante la etapa 6, en la que tras el lavado inicial después de incrementar el caudal afluente, se produjo una recuperación del proceso, observándose a partir del día 480 un claro incremento de la concentración de biomasa, al igual que del rendimiento de nitrificación que se estabilizó en torno a un 56% de oxidación de amonio a nitrito.

En la etapa 7 se aumentó el caudal de alimentación a 5 L d⁻¹, y aunque durante los primeros días se observó una respuesta adecuada del proceso, con un leve incremento de la biomasa y un porcentaje de oxidación de amonio a nitrito estabilizado, a partir del día 580 la pérdida de biomasa fue muy acusada, lo que produjo un claro descenso del rendimiento de nitrificación. Con el objetivo de mejorar el grado de nitrificación en poco tiempo se procedió a controlar el pH del reactor en 7.7, mediante la adición de ácido clorhídrico HCl (0.5M). Sin embargo, después de casi 25 días con control externo de pH, el proceso no repuntó ni mejoró el grado de nitrificación, manteniéndose el porcentaje de oxidación de amonio a nitrito en un 25%.

Para confirmar los resultados obtenidos, el caudal de alimentación se disminuyó en la etapa 8 al mismo valor que el empleado en la etapa 6 (4 L d⁻¹). Como se puede observar en la Figura 4.24 en esta etapa en la que no hubo control externo de pH, se produjo una clara recuperación del proceso incrementándose la concentración de biomasa, y alcanzando un grado de nitrificación en torno al 40%. Aunque en las etapas 6 y 8 el caudal afluente y el TRH fueron idénticos, el TRC fue menor en la etapa 8 por la menor evaporación que tuvo lugar, lo que

explica las diferencias observadas en los valores de las concentraciones y rendimientos de ambas etapas.

Durante la etapa 9 se evaluó el rendimiento y estabilidad del proceso con un caudal de alimentación intermedio entre los utilizados en las etapas 6 y 7, situándose el TRH y TRC en 1.5 y 1.75 días, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 4.24, durante la etapa 9 el porcentaje de oxidación de amonio a nitrito se mantuvo en torno al 43% y se estableció la máxima capacidad de tratamiento en 4.5 L d^{-1} de caudal afluente o el mínimo TRC en 1.75 días con el que se puede operar el reactor a 30°C .

Una vez determinada la máxima capacidad de tratamiento se incrementó la temperatura a 35°C con objeto de conseguir un mayor grado de nitrificación. Así, en la etapa 10 se mantuvieron las mismas condiciones de operación que en la etapa 9, siendo la mayor temperatura la única diferencia entre ambas etapas. El incremento en la temperatura ocasionó que el rendimiento de la nitrificación aumentara hasta el 50%. Como se puede observar en la Tabla 4.9, a pesar de operar el proceso a una temperatura mayor, el porcentaje de evaporación en las etapas 9 y 10 fue similar. En la siguiente etapa (etapa 11) se incrementó el caudal afluente hasta 5 L d^{-1} (valor que el reactor no pudo mantener cuando la temperatura de operación fue de 30°C) y el rendimiento de nitrificación se mantuvo en torno al 55%. Sin embargo, el incremento del caudal de alimentación realizado durante la etapa 12 ocasionó que el porcentaje de nitrificación disminuyera al 30% a causa de la pérdida de biomasa del reactor. El rendimiento no se consiguió recuperar ni con la instalación de un sistema de control externo de pH que mantuvo el pH en 7.7. Por tanto, se estableció la máxima capacidad de tratamiento en 5.0 L d^{-1} de caudal afluente o el mínimo TRC en 1.5 días con el que puede operarse el sistema a 35°C .

El seguimiento microbiológico realizado aplicando la técnica de hibridación in situ FISH reveló que la población de microorganismos desarrollada en todas las etapas evaluadas, correspondió prácticamente en su totalidad ($>95\pm 3\%$) a bacterias amonioxidantes de las especies *Nitrosomonas eutropha* y *Nitrosomonas europaea*, hibridada con la sonda Nse1472.

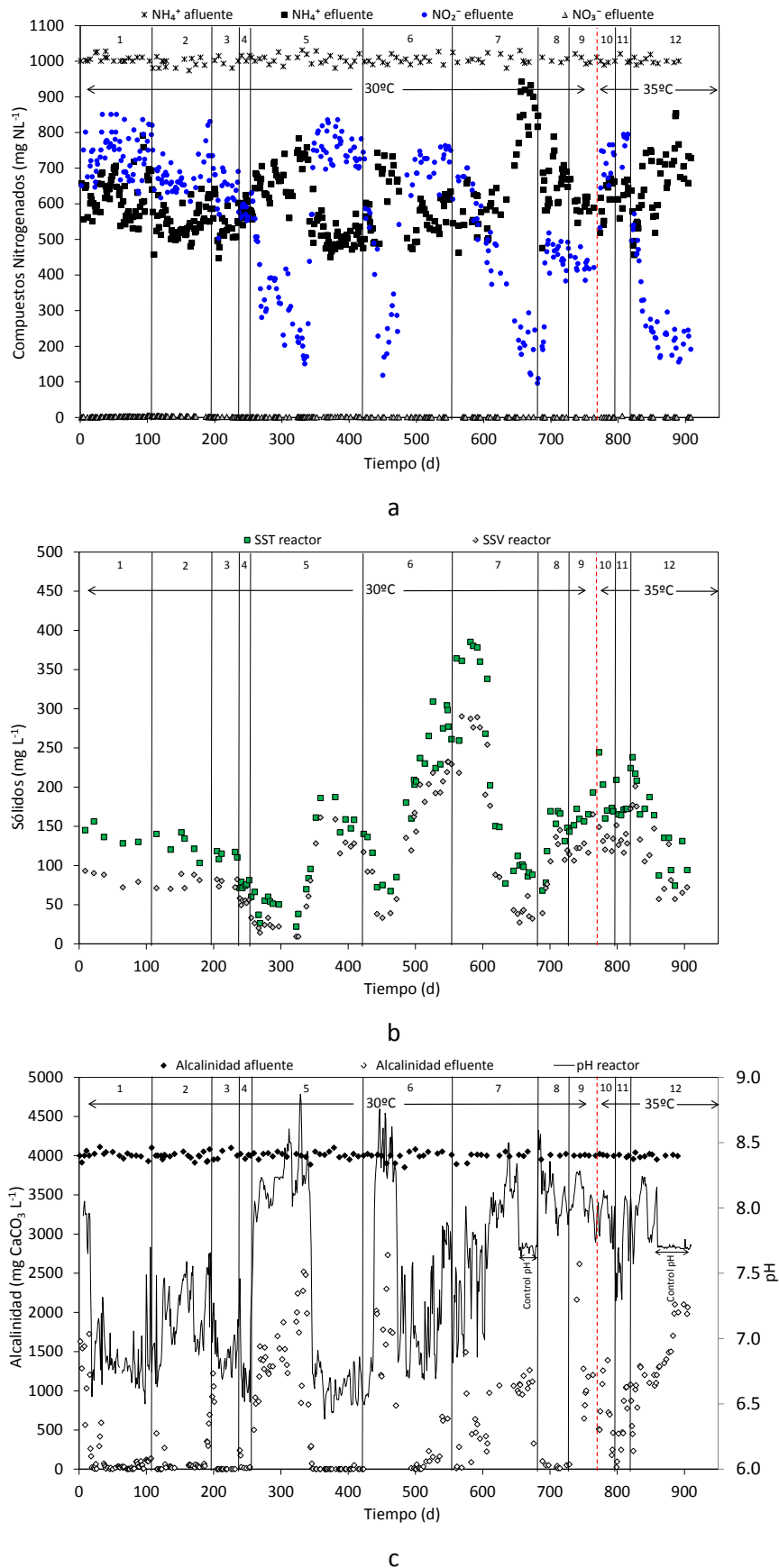


Figura 4.24. Evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados (a); Sólidos Suspendidos Totales, SST y Sólidos Suspendidos Volátiles, SSV (b); alcalinidad y pH (c) durante la operación del proceso de nitrificación parcial R2.

Los resultados obtenidos indican que se puede alcanzar una operación estable del proceso de nitrificación parcial, con rendimientos en torno al 50%, operando el reactor SHARON con tiempos de retención celular iguales a 1.75 días a 30°C y 1.5 días a 35°C. Estos valores son ligeramente superiores a los reportados en la bibliografía (Van Dongen *et al.*, 2001; Fux, 2003), donde con TRC iguales a 1 día y 35°C se consiguen obtener iguales rendimientos en nitrificación, potenciando el desarrollo y permanencia de los organismos AOB en el sistema, mientras que las bacterias NOB son expulsadas. Esta diferencia puede ser debida a las características del sobrenadante empleado como afluente en cada estudio.

Un aspecto importante de la aplicación del proceso SHARON de nitrificación parcial es su posible acople con un proceso posterior de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX), que permitiría eliminar el nitrito y el amonio presentes en el efluente del reactor SHARON. El afluente al proceso ANAMMOX requiere de una relación molar entre las concentraciones de nitrito y amonio ($\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$) en torno a 1.3. (ver Ecuación 1.10, apartado 1.2.2.2).

En la Figura 4.25 se encuentra la relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ obtenida en la corriente efluente del proceso SHARON durante las 12 etapas en las que se evaluó el efecto del tiempo de retención hidráulico sobre la actividad de los organismos AOB. Los resultados obtenidos muestran que con una temperatura de 35°C y tiempos de retención celular iguales a 1.75 días (etapa 10) y 1.5 días (etapa 11) se obtuvo un afluente adecuado para el proceso ANAMMOX, mientras que cuando se operó el proceso a 30°C, únicamente para TRC de 2.1 días o mayores (etapas de la 1 a la 6) se consiguió una relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ cercana a la buscada. En las etapas 1 a 6, donde el sistema alcanzó a estabilizarse, la relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ fue la óptima en torno a 1.3; a excepción de la alta relación alcanzada durante la etapa 5, causada posiblemente por el incremento en la concentración de biomasa en el reactor.

Debido a que uno de los factores más importantes para acoplar los procesos SHARON y ANAMMOX es la obtención de una relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ en torno a 1.3 en el efluente del reactor SHARON, resulta conveniente establecer estrategias de control que permitan reducir la variabilidad de las concentraciones de nitrito y amonio obtenidas durante el proceso de nitrificación parcial. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, el proceso de nitrificación parcial se consigue mediante el establecimiento de determinados parámetros de operación, como el TRC y la temperatura principalmente. No obstante, la estabilidad del proceso va a depender principalmente de la población de organismos AOB aclimatada, la supresión de los organismos NOB del sistema y las características y variabilidad de la corriente afluente al proceso.

En este sentido, se han formulado algunas estrategias de control para la obtención de un efluente con una relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ adecuada y estable en el tiempo, cuando se pretende su acople al proceso ANAMMOX. Volcke (2006) formuló y evaluó una estrategia de control mediante simulación que consistió en el control de la concentración de oxígeno disuelto a través del ajuste del caudal de aire inyectado en el reactor, en combinación con el control del pH del medio mediante la dosificación de ácido o base. Por otro lado, Jubany *et al.* (2009) evaluaron a escala piloto una estrategia de control que consistió en ajustar la carga de nitrógeno amoniacal variando el caudal afluente al proceso SHARON, esta variación se estableció a partir de la determinación *on-line* de la velocidad de consumo de oxígeno (*OUR*) en el reactor. En el caso en el que en el efluente del proceso SHARON la relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ sea superior a 1.3, como en la etapa 5, la adición directa sobre el reactor ANAMMOX de la corriente afluente al proceso SHARON podría suplir la concentración de amonio necesaria para satisfacer la relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ del proceso de oxidación anaerobia de amonio (Fux *et al.*, 2002).

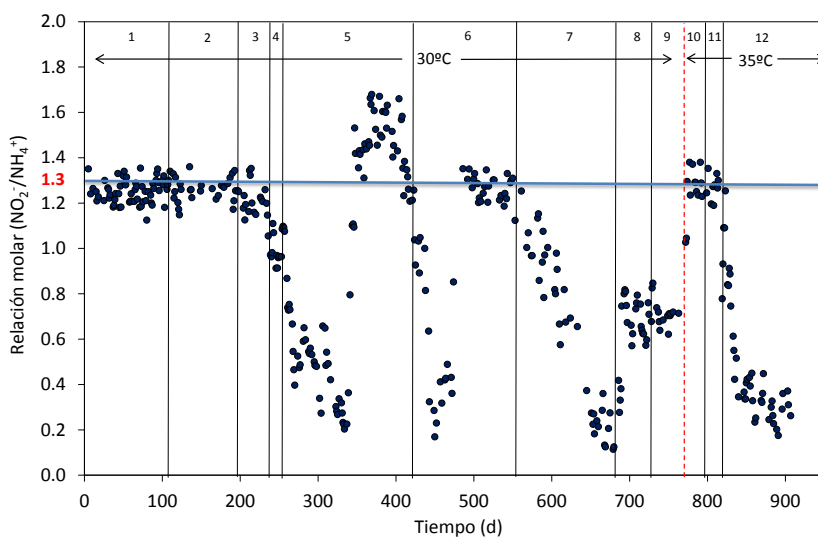


Figura 4.25. Relación molar $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ obtenida en la corriente efluente del proceso SHARON de nitrificación parcial a diferentes valores de TRH, TRC y temperatura.

4.1.3 Criterios y recomendaciones para la puesta en marcha y operación estable de un proceso de nitrificación parcial

A partir de los conocimientos adquiridos acerca de la puesta en marcha del reactor SHARON y, de los factores ambientales y los parámetros de operación que afectan la actividad de los organismos amonioxidantes (AOB) durante la evaluación del proceso de nitrificación parcial, se proponen una serie de criterios y recomendaciones para la puesta en marcha y operación de este proceso, orientada a optimizar el tiempo necesario para alcanzar su puesta a punto, y mantener su estabilidad.

Los criterios que se proponen no sólo contemplan aspectos generales, en cuanto a parámetros de operación se refiere, sino que establece como aspecto importante el conocimiento de las especies de organismos AOB involucrados.

1. Inóculo. Para la inoculación del reactor SHARON se puede emplear biomasa procedente de un sistema convencional de fangos activados en el que se lleve a cabo la eliminación biológica de nitrógeno. Los principales objetivos durante la puesta en marcha del proceso se centran en la aclimatación bacteriana a altas concentraciones de N-amoniaco, y la supresión del proceso de oxidación de nitrito mediante la eliminación de los organismos nitritoxidantes (NOB) del reactor.

Como se ha observado, los organismos amonioxidantes (AOB) predominantes en sistemas de tratamiento convencional de agua residual corresponden principalmente a la especie *Nitrosomonas oligotropha spp.*, mientras que en el caso de procesos como el SHARON los organismos corresponden principalmente a las especies *Nitrosomonas europaea spp.* y *Nitrosomonas eutropha spp.*, por tanto se espera un cambio poblacional. Este cambio se produce como consecuencia de las diferentes características de operación de cada proceso, entre las que se destacan la elevada temperatura (> 25°C) y las altas concentraciones de N-amoniaco (> 500 mgN L⁻¹).

Los resultados obtenidos en las estrategias de puesta en marcha evaluadas (apartado 4.1.1) muestran que utilizando como inóculo biomasa procedente de una EDAR convencional urbana es posible tanto la adaptación progresiva de la biomasa a altas concentraciones de nitrógeno amoniaco, como la imposición directa de la biomasa a altas concentraciones de nitrógeno amoniaco. Aunque en este último caso se requiere operar el reactor con tiempos de retención celular (TRC) más elevados que permitan el desarrollo de los organismos AOB específicos de este tipo de sistemas de tratamiento con elevada concentración de nitrógeno amoniaco.

2. Tiempo de retención celular (TRC) y tiempo de retención hidráulico (TRH). En un reactor operado en modo continuo y sin recirculación de fangos el TRC es igual al TRH. Sin embargo, como el proceso se lleva a cabo a elevada temperatura (habitualmente $> 25^{\circ}\text{C}$), el efecto de la evaporación es significativo, provocando que el TRC sea mayor que el TRH. En cualquier caso, cada cambio en el TRH provocará un cambio en el TRC. Para poder cuantificar la evaporación y conocer con precisión el TRC con el que se está operando, es fundamental realizar un seguimiento período de los caudales de entrada y salida del reactor SHARON.

El control durante la puesta en marcha de estos dos parámetros es fundamental debido principalmente a la necesidad de favorecer el desarrollo de los organismos AOB y limitar el crecimiento de los organismos NOB. Al tratarse de organismos autótrofos, su velocidad de crecimiento es significativamente menor que la de los organismos heterótrofos, pero la elevada temperatura de operación del proceso SHARON permite que con TRC relativamente bajos del orden de 1.5-2 días pueda establecerse el proceso (Hellinga *et al.*, 1998). Aunque durante la operación del proceso se recomienda trabajar con TRC menores de 1.5 días y una temperatura de 35°C (Van Dongen *et al.*, 2001), la imposición directa de bajos TRC durante la puesta en marcha ocasiona que el funcionamiento del proceso se torne inestable (Van Hulle *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que realizar la puesta en marcha del proceso SHARON con TRC relativamente altos (en torno a 7 días) potencia el desarrollo de los organismos AOB a la vez que se consigue limitar el crecimiento de los organismos NOB en el sistema, dándole una relativa estabilidad al proceso de oxidación de amonio a nitrito. Una vez alcanzada la puesta en marcha del proceso, los resultados obtenidos mostraron que se puede alcanzar un proceso de nitrificación parcial estable, con rendimientos en torno al 50%, operando el reactor SHARON a un TRC de 1.75 días y temperatura de 30°C , e incluso es posible trabajar a un TRC de 1.5 días cuando la temperatura de operación del proceso es 35°C (apartado 4.1.2.6).

3. Oxígeno disuelto (OD). La concentración de OD en el reactor es un parámetro de operación muy importante para los organismos amonioxidantes (AOB) y nitritoxidantes (NOB). La afinidad por el oxígeno que presentan estos grupos de bacterias nitrificantes puede variar en función de aspectos como: especies de organismos AOB y NOB involucradas, tipo de proceso y grado de aclimatación al licor mezcla. Diversas investigaciones han demostrado que los organismos NOB presentan menor afinidad por el oxígeno que los organismos AOB en sistemas convencionales de fangos activados, lo que supone a priori que la operación del proceso SHARON a valores relativamente bajos de OD podría llevar a limitar el crecimiento de los

organismos NOB, permitiendo la obtención del proceso de nitrificación parcial (Sánchez *et al.*, 2001; Guisasola *et al.*, 2005). Sin embargo, debido a que las especies de organismos AOB *Nitrosomonas europaea spp.* y *Nitrosomonas eutropha spp.* fueron identificadas como las más abundantes en este tipo de procesos de eliminación de nitrógeno amoniacal de corrientes de agua residual con elevada concentración de amonio, no es recomendable operar el proceso a concentraciones de oxígeno disuelto inferiores a $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, ya que estas especies de AOB presentan baja afinidad por oxígeno disuelto, siendo el $1.45 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ el valor de la concentración de oxígeno disuelto que reduce al 50% su velocidad de crecimiento (Jiménez, 2010). Para incrementar la velocidad de crecimiento de los organismos AOB se podría operar el proceso con concentraciones OD superiores a $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Este incremento en la concentración de OD supone un coste económico en la operación del reactor, por lo que en principio sería recomendable realizarlo en aquellos casos en que sea necesario compensar reducciones en el tiempo de retención celular (TRC), realizadas por tener que tratar más caudal. Trabajar con altas concentraciones de oxígeno disuelto podrían permitir la proliferación de organismos NOB, pero en un reactor SHARON éstas se encuentran inhibidas por otros factores como la salinidad, concentración de ácido nitroso, etc.

4. pH. El pH es considerado como uno de los factores clave durante la puesta en marcha y operación del proceso. Este parámetro regula el equilibrio químico entre el sustrato de los organismos AOB ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) y el sustrato de los organismos NOB ($\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$), y es además, por sí mismo inhibidor del proceso a valores relativamente altos y bajos.

Los resultados de este estudio muestran que no es necesario realizar un control externo de pH ni para la puesta en marcha ni para la operación del reactor. Controlar el pH mediante la adición de ácido o base se debe evitar siempre que se pueda debido al incremento en costes económicos que supone su utilización. La propia capacidad de autorregulación bacteriana, y la relación molar entre la alcalinidad y el amonio que se encuentra en la corriente del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos ($\text{HCO}_3^-/\text{N-NH}_4$ en torno a 1) es suficiente para alcanzar una nitrificación parcial estable. Es cierto, que si por cualquier motivo la relación molar $\text{HCO}_3^-/\text{N-NH}_4$ del agua residual afluente al reactor SHARON fuera baja, el proceso de oxidación de amonio se detendría por acidificación del licor mezcla. Sin embargo, la composición y características de esta corriente de sobrenadante no suelen fluctuar demasiado debido al alto TRC con el que se opera el proceso de digestión anaerobia.

Los resultados del estudio del efecto del pH sobre la actividad de los organismos AOB presentes en el reactor SHARON (apartado 4.2.1.4) muestran que el rango de pH en el que la actividad de estos organismos es máxima se encuentra entre 7.4-7.8. Además, la operación del proceso a valores de pH superiores al rango óptimo reduce la actividad de los organismos AOB de manera más severa que si se operara el proceso a valores de pH por debajo del pH óptimo.

5. Temperatura. La temperatura es considerada como uno de los factores ambientales más importantes en los procesos de eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales. Dado que el afluente del proceso SHARON es la corriente de sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos (que tiene una temperatura en torno a 35°C - rango mesofílico) tras pasar por el proceso de deshidratación, en el que se enfría hasta una temperatura próxima a 30°C, la elevada temperatura que recibe el reactor hace que la velocidad de crecimiento de las diferentes bacterias sea muy superior a la que tienen en la línea de aguas de una EDAR.

Los resultados de la puesta en marcha utilizando como inóculo biomasa procedente de un proceso convencional de fangos activados (aclimatada a 20°C) muestran que es posible tanto un incremento progresivo de la temperatura como la imposición directa a 30°C (apartado 4.1.1). Por otro lado, los resultados del estudio realizado para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB involucrados en el reactor SHARON (apartado 4.1.2.5) indicaron que el rango de temperatura en el que la actividad de los organismos AOB es óptima (superior al 80%) se sitúa entre 35-40°C. A temperaturas superiores a 40°C la actividad de los organismos AOB no es estable y desciende drásticamente. Asimismo, temperaturas de operación inferiores a 25°C conllevan a reducciones de la actividad de AOB superiores al 40%.

6. Sustrato e inhibidores. En este trabajo se ha confirmado que el sustrato de los organismos AOB presentes en el reactor SHARON es el amoníaco (NH_3). Su concentración, tal y como se comentó, va a depender del pH y la temperatura. La operación del proceso en un rango de pH entre 6.5 y 8 asegura sustrato suficiente para el desarrollo de los organismos AOB, debido a la elevada temperatura de operación (30°C) y la elevada concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente de sobrenadante de la digestión anaerobia (cuyo rango habitual es 500 - 2000 mg N L⁻¹). La concentración de amoníaco en la que la actividad de los organismos AOB es del 50% se determinó en 0.32 mg N-NH₃ L⁻¹. En este trabajo también se comprobó que el amoníaco a altas concentraciones no ejerce efecto inhibitorio sobre la actividad de los organismos AOB, sino que esta inhibición es debida a la alta salinidad. Además, quedó demostrado que en las condiciones de operación normales del proceso no hay efecto adverso

por alta salinidad. Por otro lado, el ácido nitroso (HNO_2) inhibe la actividad de los organismos AOB. La concentración de ácido nitroso que provoca una disminución del 50% de su actividad es de $1.32 \text{ mg N-HNO}_2 \text{ L}^{-1}$. Al igual que con el amoníaco, la concentración de ácido nitroso dependerá del pH y la temperatura. La operación del proceso SHARON en el rango de pH entre 6.5 y 8 no supone un incremento considerable de la concentración de HNO_2 durante el tratamiento de la corriente de sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos.

7. Seguimiento microbiológico. Las técnicas microbiológicas y moleculares para la identificación y cuantificación de los organismos presentes en procesos de depuración de agua residual son herramientas muy útiles que apoyan la toma de decisiones en las EDARs. En particular, la aplicación de la técnica de hibridación *in situ* FISH es muy útil para identificar y cuantificar los organismos amonioxidantes y nitritoxidantes en un reactor SHARON. Un seguimiento periódico al proceso mediante la aplicación de esta técnica sería recomendable para estudiar los cambios en la estructura de las poblaciones de organismos AOB, y confirmar la ausencia de los organismos NOB en las fases de puesta en marcha y operación del proceso. Las sondas de hibridación habitualmente empleadas para la identificación de los organismos AOB y NOB se encuentran recogidas en la Tabla 3.7 (apartado 3.3.2), y además se encuentra detallado el método de cuantificación propuesto por Borrás (2008), que permite realizar el seguimiento microbiológico al proceso.

Tal y como se comentó, los organismos AOB identificados como más abundantes en un reactor SHARON corresponde con las especies *Nitrosomonas europaea spp.* y *Nitrosomonas eutropha spp.* Estos organismos tienen una baja afinidad por el sustrato, por lo que la aplicación del proceso SHARON para el tratamiento de corrientes de agua residual con elevada concentración de nitrógeno amoniacal, como es el caso del sobrenadante procedente de la deshidratación de fangos digeridos anaeróbicamente es muy atractiva, debido a que al ser una corriente de recirculación a cabeza de planta, en su tratamiento interesa más obtener un alto porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal que un efluente de alta calidad. Asimismo, estas especies mostraron alta tolerancia a la presencia de nitrito y ácido nitroso, otorgándoles el potencial de aplicación sobre procesos de eliminación de nitrógeno vía nitrito.

4.2 ESTUDIO DEL PROCESO SHARON DE NITRITACIÓN Y DESNITRITACIÓN

4.2.1 Puesta en marcha y seguimiento de la evolución del proceso

Se evaluaron tres estrategias para la puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito. En la primera de las estrategias se empleó como inóculo biomasa procedente del reactor SHARON de nitrificación parcial, y se pretendía conseguir el desarrollo de una población de organismos desnitrificantes en presencia de elevadas concentraciones de amonio y nitrito. En las otras dos estrategias de puesta en marcha se empleó como inóculo fango activo procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia). En esta estación depuradora se elimina el nitrógeno amoniacal de manera biológica vía nitrato.

4.2.1.1 Puesta en marcha I: temperatura 30°C e inóculo procedente de un proceso de nitrificación parcial

La Figura 4.26 muestra la evolución de los compuestos nitrogenados durante los dos períodos que componen la estrategia de puesta en marcha del proceso empleando biomasa procedente del reactor SHARON de nitrificación parcial. Durante el Período I el funcionamiento del reactor se llevó a cabo mediante 12 ciclos de operación al día, en cada uno de los cuales se alternaron etapas aerobias y anóxicas para potenciar el desarrollo de los organismos desnitrificantes sin afectar la actividad de los organismos AOB presentes en el reactor. Del tiempo total de duración de cada ciclo (120 minutos), se destinó para la etapa aerobia un 66.6% (80 minutos) y para la etapa anóxica un 33.6% (40 minutos).

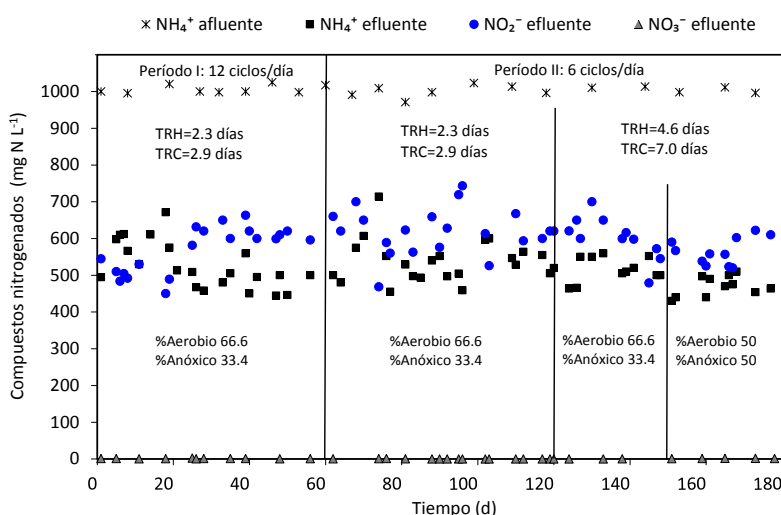


Figura 4.26. Evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados durante la puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito empleando como inóculo fango activado procedente de un reactor SHARON de nitrificación parcial.

Tal y como se comentó en el apartado 3.1 de materiales y métodos, se empleó metanol (CH_3OH) como fuente de carbono orgánico para llevar a cabo la desnitrificación, el cual fue adicionado de manera independiente a la corriente afluyente al reactor SHARON, empleando un sistema de dosificación de alta precisión marca *Liquino*.

Inicialmente se calculó la concentración de materia orgánica necesaria para desnitrificar el nitrito continuamente producido como resultado del proceso de nitrificación parcial por parte de los organismos AOB. A partir de la Ecuación 1.9 (apartado 1.2.2) se puede establecer que por cada gramo de nitrito reducido (medido como nitrógeno, N) es necesario degradar 1.14 gramos de metanol (CH_3OH), equivalente a 1.73 gramos de materia orgánica expresada como DQO. Como resultado de la operación en continuo del proceso SHARON la concentración de nitrito producida al día se estimó en 1500 mg N- NO_2 (Ecuación 4.9). Calculando la necesidad de materia orgánica a partir de la relación 1.73 g DQO/g N- NO_2 , la concentración de DQO necesaria para desnitrificar el nitrito producido al día por la oxidación continua de nitrógeno amoniacal se estimó en 2595 mg DQO, por lo que era necesario adicionar 216 mg DQO en cada ciclo de operación (12 ciclos de operación al día), y teniendo en cuenta el volumen del reactor SHARON (7 litros), esto supone la adición de 30.8 mg DQO L^{-1} en cada ciclo de operación del proceso.

Con el objetivo de reducir al máximo la dilución del licor mezcla se preparó una disolución de metanol con una concentración de 70000 mg DQO L^{-1} , dando como resultado que el volumen de metanol necesario para desnitrificar el nitrito producido era de 3 ml por cada ciclo de operación. Sin embargo, durante los primeros 20 días de operación se adicionó una tercera parte de la materia orgánica necesaria para desnitrificar el nitrito producido (10.3 mg DQO L^{-1} ciclo $^{-1}$) para no afectar la actividad de los organismos AOB por presencia de elevadas concentraciones de metanol. En la Figura 4.26 se puede observar que el porcentaje de nitrificación continuó siendo del 50% sin detectarse actividad desnitrificante en el reactor SHARON: el sumatorio de los compuestos nitrogenados en las corrientes afluyente y efluente del proceso SHARON fue similar.

$$\frac{\text{mg N} - \text{NO}_2}{\text{día}} = Q_{\text{afluyente}} \cdot [\text{N} - \text{NH}_4]_{\text{afluyente}} \cdot \% \text{ nitrificación} \quad 4.9$$

Donde **Q_{afluyente}** es el caudal afluyente al reactor SHARON (3 L d^{-1})

[N-NH₄]_{afluyente} es la concentración amonio en la corriente afluyente al reactor (1000 mg N-NH₄ L^{-1}).

% nitrificación del proceso al inicio de la puesta en marcha (50%).

A partir del día 20 de operación la concentración de materia orgánica se incrementó a 20.6 mg DQO L⁻¹ en cada ciclo. Sin embargo, los resultados obtenidos no indicaron actividad desnitrificante en el reactor SHARON. Finalmente, se procedió a incrementar la concentración de materia orgánica a lo estrictamente necesario por estequiometría para desnitrificar el nitrito producido (30.8 mg de DQO L⁻¹ ciclo⁻¹) a partir del día 40 de operación. Los resultados obtenidos no indicaron actividad desnitrificante en el reactor.

Durante el Período II de la estrategia de puesta en marcha I se disminuyó el número de ciclos de operación, de 12 ciclos al día en el Período I se pasó a 6 ciclos de operación al día, y la cantidad de materia orgánica se fijó en 61.8 mg DQO L⁻¹ por cada ciclo de operación. Durante la primera etapa de este período de operación (desde el día 60 hasta el día 120 en la Figura 4.26) lo que se pretendió fue potenciar el desarrollo de los organismos desnitrificantes empleando ciclos de duración prolongada (ciclos de 4 horas de duración) y operación estable. En cada ciclo de operación la duración de la etapa aerobia fue de 160 minutos y la duración de la etapa anóxica fue de 80 minutos. A pesar de mantener estas condiciones de operación durante 2 meses no se detectó actividad desnitrificante en el reactor SHARON.

Durante la última etapa del Período II de operación (desde el día 120 al día 180 en la Figura 4.26), se disminuyó el caudal afluente al reactor SHARON (de 3 L d⁻¹ en el Período I a 1.5 L d⁻¹ en el Período II), dando como resultado la operación del proceso con un TRH de 4.6 días, y al tener en cuenta el efecto de la evaporación descrito en el apartado 4.1.1, el TRC se situó en 7 días. La cantidad de materia orgánica adicionada durante este Período II se fijó en 30.8 mg de DQO L⁻¹ por cada ciclo de operación debido a la disminución del caudal afluente al proceso. Los resultados obtenidos indican que a pesar de incrementar el TRH y el TRC no fue posible desarrollar los organismos desnitrificantes en el reactor SHARON, incluso con un aumento del tiempo de duración de la etapa anóxica (a partir del día 150 en la Figura 4.26) no fue posible obtener el proceso de desnitrificación a partir de nitrito en el proceso. Durante este último período de operación la duración de la etapa aerobia descendió desde un 66.6% (160 minutos) hasta un 50% (120 minutos), y la duración de la etapa anóxica se incrementó desde un 33.4% (80 minutos) hasta un 50% (120 minutos).

Los resultados obtenidos indican que no es posible desarrollar una población de organismos desnitrificantes en un reactor SHARON a partir de biomasa procedente de un proceso de nitrificación parcial. Como principal causa se puede considerar la elevada concentración de nitrito en el licor mezcla del reactor (500 mg N-NO₂ L⁻¹) y, por consiguiente de ácido nitroso (HNO₂). La concentración de ácido nitroso a pH 7.5 (pH medio del licor mezcla durante esta

estrategia de puesta en marcha) y temperatura de operación de 30°C se estimó en 0.031 mg $\text{HNO}_2\text{-N L}^{-1}$, calculada a partir de las Ecuaciones 3.6, 3.7 y 3.8 descritas en el apartado de materiales y métodos 3.2.1.4.

4.2.1.2 Puesta en marcha II: temperatura 30°C e inóculo procedente de un proceso de fangos activados

La Figura 4.27 muestra la evolución de los compuestos nitrogenados en las corrientes afluente y efluente de proceso SHARON a lo largo de la segunda estrategia de puesta en marcha. En esta estrategia de puesta en marcha se empleó como inóculo biomasa procedente de un proceso de fangos activados con eliminación biológica de nitrógeno vía nitrato. La metodología seguida tuvo como objetivo alcanzar la puesta en marcha del proceso manteniendo una baja concentración de nitrito en el licor mezcla del reactor SHARON. Por lo tanto, la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluente al proceso se incrementó de manera progresiva a lo largo del periodo experimental. La temperatura del reactor se mantuvo fija en 30°C mientras que el pH fue un parámetro no controlado en el proceso. Se fijó en 50 mg DQO L^{-1} la concentración de materia orgánica adicionada en cada ciclo de operación durante esta estrategia de puesta en marcha. El proceso se operó durante esta estrategia de puesta en marcha con 6 ciclos de operación: la duración de la etapa aerobia fue de 160 minutos (66.6%) y la etapa anóxica de 80 minutos (33.4%).

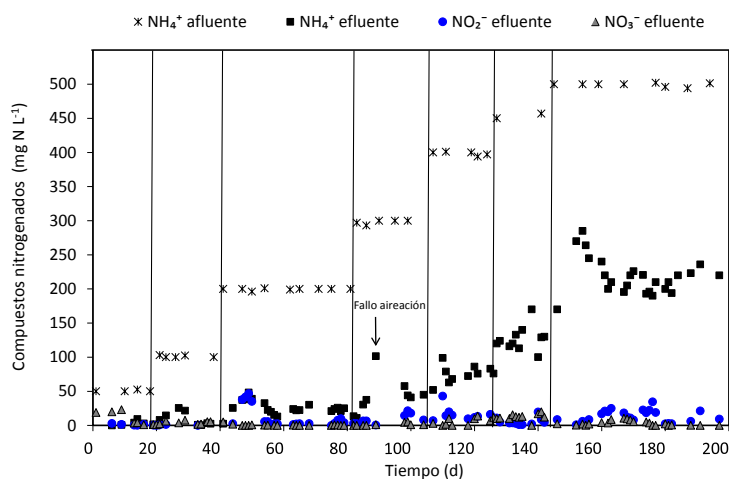


Figura 4.27. Evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados durante la puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito empleando como inóculo fango activado procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia). Temperatura de operación 30°C.

Tal y como muestra la Figura 4.27, al inicio de la puesta en marcha se detectó nitrato en la corriente efluente del proceso SHARON como consecuencia de las poblaciones de organismos AOB y NOB presentes en el inóculo empleado. Sin embargo, a partir del día 10 se puede observar en la Figura 4.27 que el nitrato fue reducido. El análisis de las poblaciones de organismos NOB mediante la aplicación de la técnica de hibridación *in situ* FISH, realizado el día 15, permitió confirmar que el porcentaje de organismos NOB era despreciable en el reactor SHARON. Los resultados indicaron el porcentaje de organismos NOB pertenecientes al *phylum Nitrospirae* (sonda FISH *Ntspa712*) fue inferior al 0.1%, en comparación con el total de bacterias identificadas con la sonda general *EUBmix*, y además no se detectaron organismos NOB de la especie *Nitrobacter* (sonda NIT3).

A partir del día 20 (Figura 4.27) la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente al proceso se incrementó a 100 mg N-NH₄ L⁻¹, obteniéndose un porcentaje de eliminación de nitrógeno superior al 98%. Hacia el día 40 de operación se incrementó nuevamente la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente a 200 mg N-NH₄ L⁻¹, detectándose hacia el día 50 de operación una acumulación de amonio y nitrito en el licor mezcla del reactor, en torno a 45 mg N-NH₄ L⁻¹ y 46 mg N-NO₂ L⁻¹, respectivamente. Posteriormente, estas concentraciones descendieron hasta situarse de manera estable a partir del día 60 en torno a 25 mg N-NH₄ L⁻¹ y 3 mg N-NO₂ L⁻¹, respectivamente. El porcentaje de eliminación de nitrógeno alcanzado cuando la concentración de amonio en la corriente afluyente fue de 200 mg N-NH₄ L⁻¹ se situó en torno al 86%.

A partir del día 80 y hasta el día 105 de operación (Figura 4.27) la concentración de amonio en la corriente afluyente fue de 300 mg N-NH₄ L⁻¹. Se observa en la figura la acumulación de amonio en el licor mezcla del reactor ocasionada por un fallo en el suministro de aire al proceso que afectó la actividad de los organismos AOB por déficit de aceptor de electrones (O₂). Tras solucionar el fallo, la concentración de amonio se situó en torno a 45 mg N-NH₄ L⁻¹, dando como resultado que el porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal estuviera en torno al 85%. Valor similar al obtenido en la etapa de operación previa del proceso.

Durante los períodos de operación en los que la concentración de nitrógeno amoniacal se mantuvo en 400 mg N-NH₄ L⁻¹ (desde el día 106 hasta el día 125) y 450 mg N-NH₄ L⁻¹ (desde el día 126 hasta el día 145) se alcanzaron porcentajes de eliminación de nitrógeno amoniacal en torno al 79% y 70%, respectivamente. Finalmente, en el último de los períodos la concentración de nitrógeno amoniacal se incrementó a 500 mg N-NH₄ L⁻¹, detectándose un incremento en la concentración de amonio en el licor mezcla del reactor al inicio de este

período: el día 154 se alcanzó una concentración de amonio de $258 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$. A partir del día 161 la concentración de amonio fue estable en torno a $210 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$, por lo que el porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal se situó en torno al 58%.

4.2.1.3 Puesta en marcha III: temperatura 35°C e inóculo procedente de un proceso de fangos activados

La Figura 4.28 muestra la evolución de los compuestos nitrogenados en las corrientes afluente y efluente de proceso SHARON a lo largo de la tercera estrategia de puesta en marcha. Al igual que en la estrategia de puesta en marcha anterior, en esta estrategia se empleó como inóculo biomasa procedente de un proceso de fangos activados con eliminación biológica de nitrógeno vía nitrato. Sin embargo, durante esta estrategia de puesta en marcha el proceso fue operado manteniendo la temperatura en 35°C . La concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluente al proceso se incrementó de manera progresiva a lo largo del periodo experimental, partiendo desde $50 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ hasta $500 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$. Se emplearon 6 ciclos de operación al día para asegurar la alternancia de las etapas aerobias y anóxicas: la duración de la etapa aerobia fue de 160 minutos (66.6%) y la etapa anóxica de 80 minutos (33.4%). El pH fue un parámetro no controlado en el proceso. Además, la concentración de materia orgánica adicionada en cada ciclo de operación durante esta estrategia de puesta en marcha se fijó en 50 mg DQO L^{-1} .

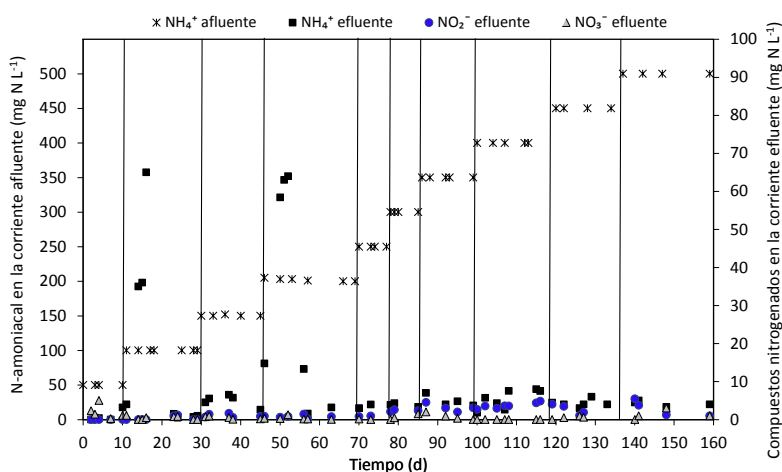


Figura 4.28. Evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados durante la puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito empleando como inóculo fango activado procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia). Temperatura de operación 35°C .

Tal y como se puede observar en la Figura 4.28, el porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal durante prácticamente todo el periodo de puesta en marcha fue superior al 95%, a

excepción de los días 15 y 50 de operación, en los cuales el porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal fue de 35% y 65%, respectivamente. El incremento de la concentración de amonio durante estos días de operación fue debido a fallos de aireación registrados en el reactor SHARON.

En las dos estrategias de puesta en marcha empleando fango procedente de un proceso de fangos activados con eliminación biológica de nitrógeno vía nitrato fue posible conseguir un proceso de nitrificación (oxidación de amonio a nitrato), eliminando a los organismos NOB del reactor SHARON. Además, fue posible desarrollar una población de organismos desnitrificantes a partir de nitrito cuando se lleva a cabo la puesta en marcha del proceso incrementando la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente al proceso de manera progresiva. Por otro lado, la puesta en marcha del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito a temperatura de 35°C fue más efectiva que la puesta en marcha del proceso a una temperatura de 30°C. Estos resultados se encuentran respaldados con los resultados obtenidos en el apartado 4.1.2.5, en donde se evaluó el efecto de la temperatura sobre la actividad de los organismos AOB, en los cuales se estableció que el rango de temperatura en el que la actividad de los organismos es óptima (>80% de actividad) oscila entre 35°C y 40°C, y que a temperaturas de 30°C la actividad de los organismos AOB puede reducirse hasta en un 30%.

4.2.2 Monitorización del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito

La etapa de monitorización consistió en analizar numerosos ciclos de operación con el objetivo de establecer relaciones entre la dinámica de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito y la evolución de los perfiles de pH, potencial redox y oxígeno disuelto a lo largo de las etapas aerobias y anóxicas de cada ciclo de operación. Se analizaron tanto ciclos correspondientes a situaciones de operación en las que el proceso estuvo estable y con porcentajes de eliminación de nitrógeno elevados (superiores al 95%), como ciclos de operación en los que el proceso SHARON estuvo inestable y presentó bajos porcentajes de eliminación de nitrógeno (menores al 50%). La información recopilada sirvió para establecer una estrategia de monitorización del proceso SHARON, encaminada a conocer el funcionamiento y evolución del proceso, y permitir una rápida actuación ante fallos. Este último aspecto resulta importante en las explotaciones depuradoras de agua residual, y en general en cualquier proceso industrial, debido a que la rápida detección y actuación oportuna ante fallos supone reducir pérdidas económicas.

4.2.2.1 Análisis de la información proporcionada por las sondas instaladas

El análisis de los perfiles de pH, potencial redox y oxígeno disuelto se realizó a lo largo del período experimental en el que la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente fue incrementada progresivamente desde 50 hasta 500 mg N-NH₄ L⁻¹. Este período corresponde con la puesta en marcha del proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito empleando como inóculo fango activado procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet con eliminación de nitrógeno amoniacal siguiendo la ruta del nitrato. La información detallada de esta estrategia de puesta en marcha se encuentra recogida en el apartado 4.2.1.

- **Evolución de los perfiles de pH y potencial redox en situaciones de estabilidad del proceso biológico**

Cuando las condiciones de operación permiten que el proceso biológico se encuentre en condiciones estables, el pH experimenta claras variaciones a lo largo de cada ciclo de operación en el que se alternan una etapa aerobia y otra anóxica. En condiciones aerobias el pH puede verse afectado por dos procesos. El primero de ellos es el proceso de oxidación de amonio a nitrito (nitritificación) que ocasiona que el pH descienda por la acidificación del medio a causa de la producción de protones (H⁺), de acuerdo con la Ecuación 1.1 (apartado 1.2.1.1.1). El segundo proceso corresponde con la desabsorción de dióxido de carbono (CO₂) del medio acuoso, el cual afecta al equilibrio del ácido carbónico (ver Ecuación 1.6, apartado 1.2.1.1.1) y, por tanto, ocasiona que el pH ascienda. Como resultado de la combinación de estos dos procesos se obtiene un efecto neto cuyo resultado es un descenso de pH. Por otro lado, en condiciones anóxicas el pH asciende debido a la recuperación de la alcalinidad durante el proceso de desnitrificación, de acuerdo con la Ecuación 1.7 (apartado 1.2.1.1.2). Los moles de protones (H⁺) producidos durante la nitritificación son parcialmente neutralizados debido a la reducción del nitrito a compuestos gaseosos de nitrógeno.

Por otro lado, el perfil de potencial redox varía en función de la disponibilidad de aceptores de electrones en el medio. Es así como en un ciclo de operación en el que se alternan una etapa aerobia y otra anóxica, el potencial redox asciende rápidamente debido a la presencia de oxígeno disuelto en el medio al inicio de la etapa aerobia, y posteriormente éste se estabiliza cuando la concentración de oxígeno disuelto es constante en el medio acuoso. En el período de transición hacia condiciones anóxicas el perfil de potencial redox disminuye progresivamente a medida que el oxígeno es consumido, y continua descendiendo a medida que los nitritos y los nitratos son reducidos como consecuencia del proceso de desnitrificación.

La Figura 4.29 muestra la variación de la concentración de los compuestos nitrogenados (NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^-) y la dinámica anteriormente descrita de los perfiles de pH y potencial redox a lo largo de un ciclo de operación. El ciclo representado en esta figura corresponde al día 80 (ver Figura 4.29), en el que el porcentaje de eliminación de nitrógeno fue superior al 95%. Como se puede observar en la Figura 4.29, durante la etapa aerobia el pH desciende siguiendo exactamente la misma tendencia que el amonio. Hasta la primera hora de ciclo la caída del pH es acusada, y luego se estabiliza. Esta situación es debido a que al comienzo del ciclo la concentración de amonio es más alta, ya que durante la etapa anóxica del ciclo anterior el amonio se acumulaba en el reactor puesto que entraba junto con el afluente, pero al no airear (ya que es etapa anóxica) el amonio no era oxidado. Este amonio acumulado es nitrificado al comenzar la etapa aerobia, provocando un descenso acusado del pH. Una vez consumido el amonio acumulado se alcanza una concentración relativamente constante de amonio en el reactor, resultante de la concentración aportada por el afluente y la oxidada por los organismos AOB. Esta situación es muy diferente de la que ocurre en un reactor operado en modo SBR, en el que al no entrar continuamente amonio al reactor, sino sólo al inicio del ciclo (etapa de llenado), éste se consume completamente. Durante este período de estabilidad de pH los organismos AOB continúan oxidando el nitrógeno amoniacal que entra a través de la corriente afluente al sistema, y como consecuencia la concentración de nitrito (NO_2^-) continúa incrementándose a lo largo de toda la etapa aerobia.

En la Figura 4.29 también se puede apreciar fluctuaciones de pH durante la etapa aerobia, que son consecuencia de la desabsorción de dióxido de carbono (CO_2) durante los períodos en los que el sistema de aireación está conectado.

Tal y como se comentó, durante la etapa anóxica el amonio se acumula a lo largo de toda la etapa ya que entra junto con el afluente al reactor. Esto ocasiona que haya amonio acumulado al inicio del siguiente ciclo de operación. Por su parte, el pH se incrementa debido a la recuperación de alcalinidad durante el proceso de desnitrificación a partir de nitrito. Posteriormente y tras el agotamiento del nitrito, el pH se estabiliza ($\text{pH}_{\text{constante}}$). En la Figura 4.30 se puede observar que el punto en el que el pH se estabiliza cuando termina el proceso de desnitrificación ($\text{pH}_{\text{constante}}$) coincide con el pH al inicio de la etapa aerobia. Es decir, el pH en la etapa anóxica asciende en similar magnitud al descenso que éste experimentó en la etapa aerobia previa. Esta situación es consecuencia de la relación equimolar entre la alcalinidad y el nitrógeno amoniacal presente en la corriente del sobrenadante procedente de la deshidratación de fangos digeridos anaeróticamente, que junto a los procesos de nitrificación

y desnitrificación, compensan el descenso y el aumento del pH durante la etapa aerobia y anóxica en cada ciclo de operación, respectivamente.

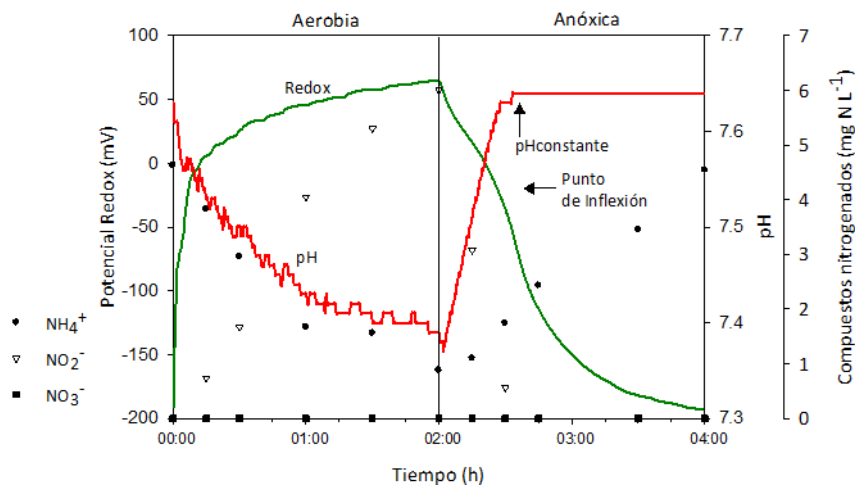


Figura 4.29. Perfiles típicos de la concentración de los compuestos nitrogenados y los registros on-line de pH y potencial redox en un ciclo operación.

En el caso del potencial redox, se puede observar en la Figura 4.29 como éste se incrementa durante la etapa aerobia debido a la disponibilidad de aceptores de electrones: oxígeno disuelto (OD) y nitrito (NO_2^-). Durante la etapa anóxica el potencial redox desciende debido a la ausencia de oxígeno en el medio y a la reducción del nitrito durante el proceso de desnitrificación. En la dinámica del perfil del potencial redox representada en esta figura se puede observar como tras el agotamiento del nitrito la velocidad de descenso del potencial redox aumenta, mostrando claramente un punto de inflexión en el perfil del potencial redox, comúnmente conocido como “*nitrate/nitrite knee*”. Plisson-Saune *et al.* (1996) atribuyeron este incremento repentino de la velocidad de descenso del potencial redox al inicio de la producción de sulfuro (S_2^-) por parte de los organismos sulfato reductores. Según estos autores, la producción de sulfuro (S_2^-) se inicia tras el agotamiento del nitrato (NO_3^-), debido a que éste resulta inhibitorio de su actividad. Esta inhibición podría también ser debida a la presencia de nitrito (NO_2^-) de acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación.

Tal y como se muestra en la Figura 4.29 los puntos de estabilización de pH ($\text{pH}_{\text{constante}}$) y de incremento de la velocidad de descenso del potencial redox (punto de inflexión) coinciden, confirmando de manera independiente el cese de la desnitrificación. Es importante destacar que cuando se analiza la información procedente del sensor de pH, se puede identificar cuando se produce el cese de la desnitrificación, pero el cese puede ser consecuencia tanto del agotamiento de toda la materia orgánica para desnitrificar como de la reducción total del nitrito presente en el licor mezcla del reactor; mientras que cuando se incrementa la velocidad

de descenso del potencial redox el motivo es la reducción total del nitrito. No obstante, este punto de inflexión en el perfil del potencial redox no fue claramente observado en todos los ciclos analizados en los que el nitrito se agotó, por lo que su empleo como parámetro de monitorización y control, al menos en procesos en continuo, no es demasiado fiable. A modo de ejemplo en la Figura 4.30 se muestra la evolución del pH y potencial redox en dos ciclos en los que el punto de inflexión en el perfil del potencial redox no fue detectado durante la evolución de la etapa anóxica, a pesar de que el pH se estabilizó en el momento en el que el nitrito fue completamente reducido, lo cual fue confirmado mediante determinaciones analíticas realizadas en el laboratorio.

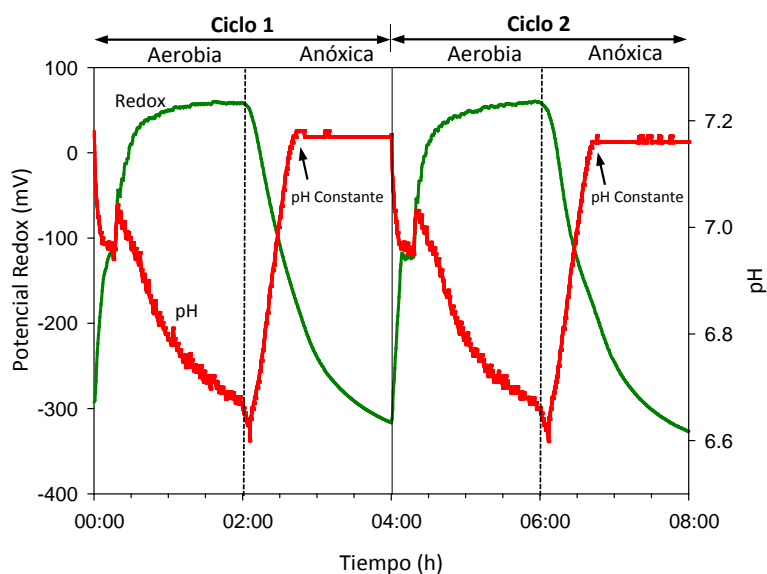


Figura 4.30. Evolución de los perfiles de pH y potencial redox en dos ciclos de operación en los que el nitrito se agotó cuando el pH se estabilizó, pero no se observó el punto de inflexión en el perfil del potencial redox.

Durante el período experimental que comprende los 160 días en los que la concentración de nitrógeno amoniacal se incrementó desde 50 hasta 500 mg N-NH₄ L⁻¹ (Figura 4.28), se observó que la disminución de pH durante la etapa aerobia y el correspondiente incremento de pH durante la siguiente etapa anóxica se hacía mayor conforme se aumentaba la concentración de nitrógeno amoniacal en el afluente. Con esta dinámica de evolución de pH se definieron dos variables $\Delta\text{pH}_{\text{AE}}$ y $\Delta\text{pH}_{\text{AX}}$, las cuales se calculan a partir del registro de pH en cada ciclo de operación. El $\Delta\text{pH}_{\text{AE}}$ se calcula como la diferencia entre el pH al inicio y al final de la etapa aerobia en cada ciclo de operación, y el $\Delta\text{pH}_{\text{AX}}$ se calcula como la diferencia entre el pH al final y al inicio de la etapa anóxica en cada ciclo de operación. A modo de ejemplo en la Figura 4.31 se muestra un perfil de pH durante un ciclo de operación y los ΔpH calculados.

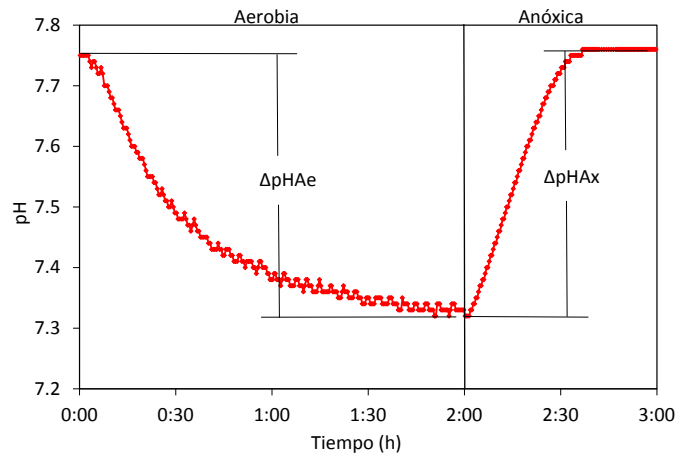


Figura 4.31. Evolución de un perfil de pH durante las etapas aerobia y anóxica de un ciclo de operación en el que se muestra la forma de calcular las variables $\Delta pHAe$ y $\Delta pHAX$.

En la Figura 4.32a se encuentra representado el valor promedio del $\Delta pHAe$ frente a la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente. En esta figura se observa claramente que a medida que la concentración de nitrógeno amoniacal se incrementó el $\Delta pHAe$ se hizo mayor. Este análisis fue realizado empleando la información procedente de períodos en los que la evolución del proceso permaneció estable, con porcentajes de eliminación de nitrógeno amoniacal superiores al 95%. Estos resultados sugieren que bajo condiciones estables de operación y evolución del proceso el grado de nitrificación podría ser estimado mediante la monitorización del descenso de pH durante la etapa aerobia.

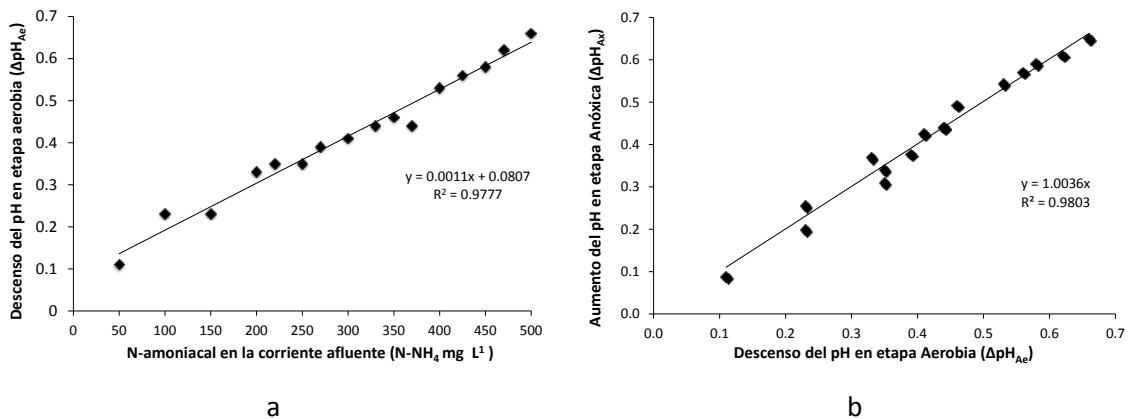


Figura 4.32. a) Relación entre el descenso de pH durante la etapa aerobia ($\Delta pHAe$) y la concentración de nitrógeno amoniacal en el afluyente del proceso; b) Relación entre el descenso de pH durante la etapa aerobia ($\Delta pHAe$) y el correspondiente incremento de pH durante la siguiente etapa anóxica ($\Delta pHAX$) en cada ciclo de operación.

En la Figura 4.32b se encuentra representada la relación entre el descenso de pH durante la etapa aerobia ($\Delta pHAe$) y el incremento de pH durante la siguiente etapa anóxica ($\Delta pHAX$) en cada ciclo de operación. En esta figura se puede observar que el $\Delta pHAe$ y el $\Delta pHAX$ variaron en igual proporción debido a que el grado de oxidación de amonio durante la etapa aerobia se

correspondió con el grado de reducción de nitrito durante la etapa anóxica. La comparación entre el $\Delta\text{pH}_{\text{Ae}}$ y el $\Delta\text{pH}_{\text{AX}}$ durante un ciclo de operación ofrece información acerca del funcionamiento en conjunto de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito. Así por ejemplo, un proceso de desnitrificación incompleto por déficit de materia orgánica podría detectarse cuando en un ciclo de operación la diferencia entre el descenso del pH en condiciones aerobias sea mayor al incremento del pH en condiciones anóxicas ($\Delta\text{pH}_{\text{Ae}} - \Delta\text{pH}_{\text{AX}} > 0$).

- **Evolución de los perfiles de pH y potencial redox en condiciones de exceso y déficit de materia orgánica**

Para llevar a cabo el proceso de desnitrificación en corrientes de agua residual con baja concentración de materia orgánica, como es el caso del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos (relación $\text{DQO}/\text{N-NH}_4 < 1$), es preciso emplear una fuente de carbono orgánico externa. Las fuentes de carbono orgánico externas habitualmente utilizadas son el metanol, el etanol y el ácido acético. Sin embargo, con el objetivo de reducir costes económicos, y dependiendo del esquema y las características de operación de la EDAR, es posible emplear la corriente afluyente de agua residual y la corriente procedente de la elutriación de fango primario, las cuales poseen materia orgánica para llevar a cabo el proceso de desnitrificación. Otra alternativa sería la utilización de subproductos de la industria, como es el caso de las vinazas procedentes de los procesos de fermentación industrial para la obtención de alcoholes principalmente, las cuales poseen una elevada concentración de materia orgánica, y al ser un residuo de este tipo de industria requiere de una gestión ambiental adecuada.

Para el proceso de desnitrificación vía nitrito en el reactor SHARON se empleó metanol (CH_3OH) como fuente de carbono orgánico externa, el cual fue dosificado al inicio de cada etapa anóxica. Se decidió que la adición de metanol fuera realizada al inicio de cada etapa anóxica con el objetivo de obtener la máxima velocidad de desnitrificación desde el principio de la etapa.

En consecuencia, en la operación del proceso SHARON es importante considerar que la adición en exceso de materia orgánica supondría un incremento en costes de operación, mientras que el déficit de materia orgánica ocasionaría que el proceso de desnitrificación estuviera limitado y no eliminara todo el nitrito generado. Por estos motivos es fundamental optimizar la dosificación de la fuente de carbono orgánico externa.

A continuación se presenta el análisis realizado de la evolución de los perfiles de pH y potencial redox, primero en situaciones de exceso de materia orgánica y posteriormente en situaciones de déficit de materia orgánica.

a) Evolución de los perfiles de pH y potencial redox en situaciones de exceso de materia orgánica

Para comprobar como se reflejaba en la forma de los perfiles de pH y potencial redox el hecho de que en el licor mezcla del reactor SHARON hubiera más materia orgánica de la estrictamente necesaria para desnitrificar el nitrito producido durante un ciclo de operación estable, se procedió inicialmente a determinar la concentración de nitrito al final de la etapa aerobia y, posteriormente a dosificar una cantidad de materia orgánica (metanol) tres veces superior a la que correspondiera estequiométricamente según la reacción de eliminación de nitrógeno vía nitrito (Ecuación 1.9, apartado 1.2.2).

La Figura 4.33a muestra la evolución de los perfiles de pH y potencial redox a lo largo de dos ciclos de operación (Ciclo 1 y Ciclo 2) en los cuales el metanol fue adicionado en exceso al inicio de las dos etapas anóxicas representadas. Como se puede observar en esta figura la adición en exceso de metanol al inicio de la etapa anóxica en el ciclo 1 (C_1) no ocasionó ninguna alteración del comportamiento típico de los perfiles de pH y potencial redox en la etapa anóxica de este ciclo: el pH se incrementó debido a la recuperación de la alcalinidad durante el proceso de desnitrificación del nitrito producido durante la etapa aerobia previa, mientras que el potencial redox descendió a causa del agotamiento progresivo de los aceptores de electrones disponibles en el licor mezcla del reactor. También en la Figura 4.33a se puede observar que la primera adición de materia orgánica (C_1) tampoco causó variaciones atípicas en el comportamiento de los perfiles de pH durante la etapa aerobia del ciclo 2: el acusado descenso del pH durante la primera parte de la etapa se produjo como consecuencia de la oxidación del amonio acumulado durante la etapa anóxica del ciclo 1. Sin embargo, el potencial redox durante la etapa aerobia del ciclo 2 sí que mostró un comportamiento claramente diferente al habitual. En la Figura 4.33b se encuentra representada la primera hora de evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante el ciclo 2. Tal y como muestra esta figura, al poner en marcha la aireación el potencial redox experimentó un incremento significativo debido a la sensibilidad de éste a la disponibilidad de aceptores de electrones en el medio, en este caso oxígeno. Tras cuatro minutos de operación en condiciones aerobias la velocidad de ascenso del potencial redox se redujo y, posteriormente, experimentó un nuevo incremento, mostrando un claro punto de inflexión (hacia los doce minutos de la etapa

aerobia), y estabilizándose nuevamente debido a que la concentración de oxígeno disuelto en el licor mezcla del reactor permaneció constante.

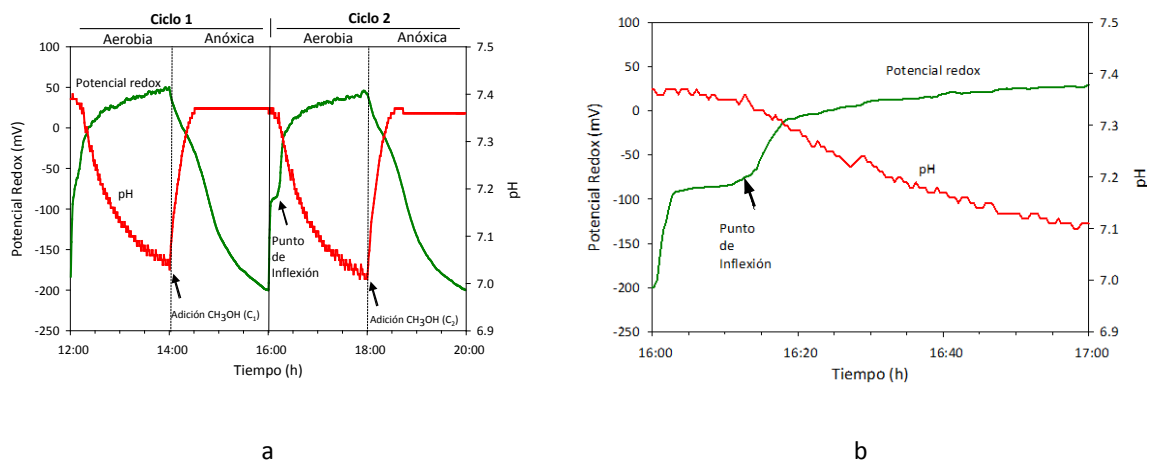


Figura 4.33 a) Evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante dos ciclos de operación en los que se adicionó exceso de metanol al inicio de las etapas anóxicas de cada ciclo (C1 y C2); b) Evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante la primera hora de operación del ciclo 2.

Aunque algunos autores (Ra *et al.*, 1998; Kim y Hao, 2001) atribuyen la presencia de este punto de inflexión identificado en el perfil del potencial redox durante la etapa aerobia a la finalización del proceso de nitrificación, los resultados obtenidos en este trabajo indican que no puede relacionarse con el final de la oxidación de amonio, puesto que de acuerdo con las analíticas realizadas no sólo en este ciclo de operación sino en varios ciclos en los que se adicionó materia orgánica en exceso, en este punto aún hay N-amoniaco disponible. Por otro lado, Won *et al.* (2011) establecieron que esta variación del potencial redox al inicio de la etapa aerobia puede ser consecuencia del desequilibrio entre la velocidad de consumo de oxígeno por parte de los microorganismos y la velocidad de aireación del proceso, causado posiblemente por la rápida oxidación de la materia orgánica fácilmente biodegradable disponible en el reactor.

Dado que el punto de inflexión en el perfil del potencial redox durante la etapa aerobia sólo apareció en aquellos ciclos en los que se dosificó materia orgánica en exceso en el ciclo anterior, parece evidente que su presencia es un claro indicador del exceso de materia orgánica dosificada. Los resultados de la operación en continuo del reactor SHARON indican que cuanto mayor es la dosificación de materia orgánica en exceso, más tiempo tarda en aparecer este punto de inflexión, por lo que en cada ciclo de operación el tiempo que transcurre desde el inicio de la etapa aerobia hasta que éste aparece podría emplearse como indicador indirecto de exceso de materia orgánica dosificada en el ciclo previo de operación.

b) Evolución de los perfiles de pH y potencial redox frente a situaciones de déficit de materia orgánica

Para conocer la evolución de los perfiles de pH y potencial redox en el licor mezcla del reactor SHARON en situaciones en las que el nitrito producido no es completamente reducido por déficit de materia orgánica, se procedió a determinar la concentración de nitrito al final de la etapa aerobia y, posteriormente, realizar dos dosificaciones de materia orgánica: la primera dosificación al inicio de la etapa anóxica (A_1) y la segunda dosificación en la mitad de la etapa anóxica (A_2). En cada una de estas dosificaciones se adicionó la mitad de la materia orgánica necesaria para llevar a cabo la desnitrificación del nitrito presente en el licor mezcla medido al final de la etapa aerobia, de acuerdo con la estequiometría de la reacción de eliminación de nitrógeno vía nitrito (Ecuación 1.9, apartado 1.2.2).

La Figura 4.34 muestra la evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante un ciclo de operación en el que se realizaron las dos adiciones de metanol (A_1 y A_2) durante la etapa anóxica. En esta figura se puede observar que tras la primera adición de metanol (A_1) se inició la reducción del nitrito, causando un incremento de pH y un descenso del potencial redox. Posteriormente, se detiene el proceso de desnitrificación, el cual quedó reflejado en la estabilización del pH y de la concentración de nitrito. El análisis de la evolución del perfil de pH durante el ciclo de operación representado en la figura indicó la interrupción del proceso de desnitrificación: el incremento del pH durante la etapa anóxica (ΔpH_{Ax}) fue menor al descenso del pH durante la etapa aerobia (ΔpH_{Ae}). El pH en la etapa aerobia descendió desde 7.75 hasta 7.3 ($\Delta pH_{Ae}=0.45$), mientras que éste en la etapa anóxica y tras la primera adición de metanol se incrementó desde 7.3 hasta 7.55 ($\Delta pH_{Ax1}=0.25$). La determinación analítica de la concentración de nitrito medida en este instante de tiempo (11:00) fue de $5.9 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$, confirmando que el proceso de desnitrificación no había reducido todo el nitrito producido durante la etapa aerobia anterior. Por tanto, el proceso de desnitrificación estaba detenido como consecuencia del déficit de materia orgánica al que fue sometido el proceso al consumirse el metanol adicionado al inicio de la etapa anóxica (A_1) para reducir una parte del nitrito.

Tras la segunda adición de metanol (A_2) la velocidad de desnitrificación aumentó, y al cabo de 30 minutos el nitrito fue completamente reducido. Los perfiles de pH y potencial redox retomaron su dinámica típica de cuando está teniendo lugar el proceso de desnitrificación, es decir, incremento de pH y descenso del potencial redox, hasta el punto en el que el nitrito fue completamente reducido. La finalización del proceso de desnitrificación quedó reflejada en la estabilización del perfil de pH y el punto de inflexión en el perfil del potencial redox, y confirmada con la determinación analítica de la concentración de nitrito que fue de 0.1 mg N-

NO_2^- L^{-1} . Por otra parte, de acuerdo con los resultados representados en la Figura 4.32, el hecho de que el incremento de pH en la etapa anóxica tras la segunda adición de materia orgánica ($\Delta\text{pH}_{\text{Ax}}=0.46$) coincida con el descenso de pH en la etapa aerobia ($\Delta\text{pH}_{\text{Ae}}=0.45$) también es un indicador de la finalización del proceso de desnitrificación.

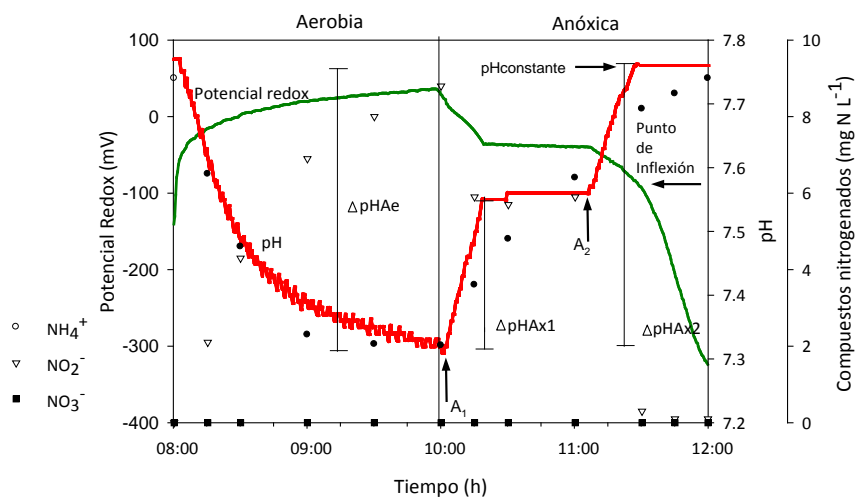


Figura 4.34. Evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante un ciclo de operación en el que hubo un déficit de materia orgánica tras la primera adición de metanol. A1 y A2 corresponden con los momentos en los que se realizaron la primera y la segunda adición de materia orgánica, respectivamente.

- **Evolución de perfiles de pH, potencial redox y oxígeno disuelto como indicadores de fallos en el proceso**

En este apartado se describen diversas situaciones en las que el funcionamiento de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito se vieron afectados por fallos provocados, los cuales fueron claramente identificados mediante el seguimiento y análisis exhaustivo realizado a los perfiles de pH, potencial redox y oxígeno disuelto. Por tanto, el análisis de la información aportada por los sensores de pH, potencial redox y oxígeno disuelto ha resultado de gran utilidad práctica para identificar fallos en el funcionamiento del proceso.

a) Fallo de la medida de la concentración de oxígeno disuelto (OD) en el reactor

La concentración de oxígeno disuelto en el reactor SHARON es un parámetro fundamental para que los organismos AOB puedan realizar el proceso nitrificación durante la etapa aerobia de cada ciclo de operación. La medida del oxígeno disuelto en el reactor podría estar afectada entre otros factores por la descalibración del sensor, por insuficiente capacidad del sistema de aireación, y en algunos casos también podría estar afectada por la acumulación de burbujas de aire en el cabezal del sensor. Por estos motivos, el tipo de sonda de OD empleada, su emplazamiento en el reactor, así como su mantenimiento son aspectos a tener en cuenta durante la puesta en marcha y operación del proceso SHARON.

La Figura 4.35 muestra la evolución de los perfiles de potencial redox y oxígeno disuelto durante un ciclo de operación en el que se produjo un fallo en la medida de la concentración de oxígeno disuelto en el reactor como consecuencia de la acumulación de burbujas de aire en el cabezal del sensor. Se puede observar que durante la etapa aerobia el oxígeno disuelto medido en el reactor alcanzó una concentración de $7 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Posteriormente esta concentración descendió de manera progresiva situándose en valores inferiores a lo establecido como consigna en el sistema de control de oxígeno ($2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), lo que provocó la activación del sistema de aireación. Tras la puesta en marcha de la aireación las burbujas de aire acumuladas en el cabezal del sensor fueron desplazadas y la concentración de OD real en el reactor era cercana a cero. La duración prolongada de este fallo provocaría que el proceso de nitrificación se detuviera como consecuencia del déficit de oxígeno disuelto en el reactor, por lo que su detección oportuna es fundamental para asegurar la estabilidad del proceso. Este tipo de fallo podría ser fácilmente detectado siguiendo la evolución del perfil del potencial redox, que muestra claramente un descenso de su valor en la etapa aerobia cuando se produce una disminución de la concentración de OD en el reactor.

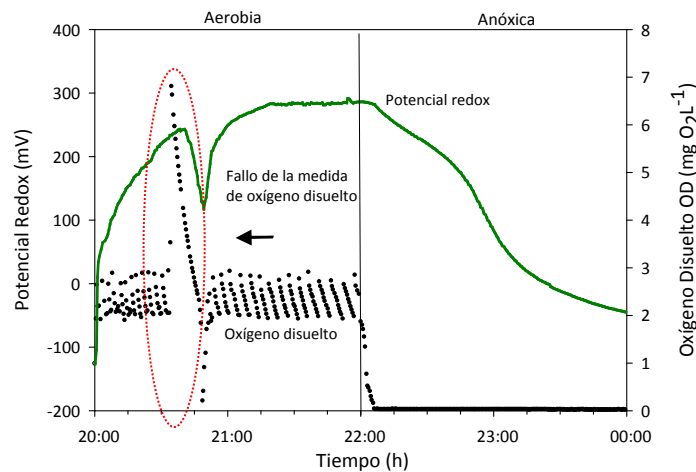


Figura 4.35. Evolución de los perfiles de potencial redox y oxígeno disuelto (OD) durante un ciclo de operación en el que se produjo un fallo en la medida de oxígeno disuelto en el reactor.

b) Fallo causado por la dosificación de materia orgánica durante la etapa aerobia

Con el objetivo de determinar como se reflejaba en la forma de los perfiles de pH y potencial redox el hecho de que durante la etapa aerobia se dosificara materia orgánica sobre el licor mezcla del reactor SHARON, se procedió a simular un fallo de proceso adicionando metanol (50 mg DQO L^{-1}) en la mitad de la etapa aerobia de un ciclo de operación.

La Figura 4.36 muestra la evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante el ciclo de operación en el que se provocó un fallo por dosificación de materia orgánica durante la etapa

aerobia, así como el instante en el que se realizó esta dosificación (17:00). En esta figura se puede observar que tras la adición de materia orgánica el potencial redox descendió y el pH se incrementó como consecuencia del elevado consumo de oxígeno disuelto (aceptor de electrones) por parte de los organismos heterótrofos para oxidar la materia orgánica disponible en el licor mezcla del reactor, y de la elevada desabsorción de CO_2 . Posteriormente, el pH y el potencial redox se estabilizaron, y hacia el final de la etapa aerobia el pH volvió a descender y el potencial redox a incrementar debido a que antes de terminar la etapa aerobia el metanol dosificado fue oxidado completamente (5 minutos antes de finalizar la etapa aerobia). El patrón de incremento de pH y descenso del potencial redox durante la etapa aerobia podrían emplearse como indicadores de un fallo en la dosificación de materia orgánica en esta etapa.

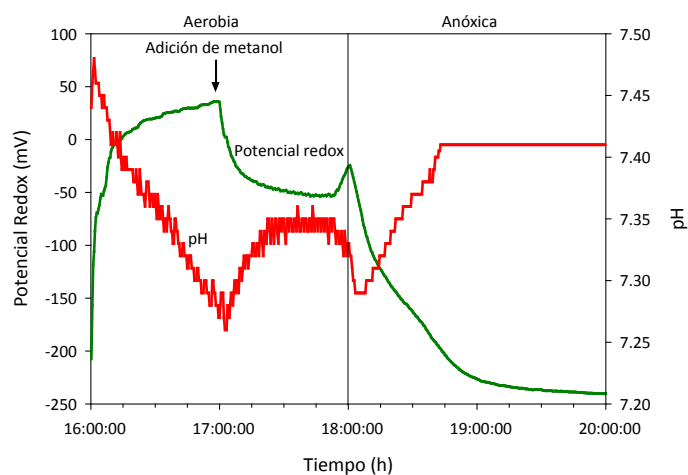


Figure 4.36. Evolución de los perfiles de pH y potencial redox en un ciclo de operación con adición de metanol durante la etapa aerobia.

c) Fallo causado por excesiva velocidad de agitación

La excesiva velocidad de agitación en el reactor podría causar que la concentración de oxígeno disuelto se incremente a causa de la reaireación superficial. Esta situación sería especialmente inadecuada durante la etapa anóxica del proceso debido a que bajas concentraciones de oxígeno disuelto podrían llegar a ser suficientes para iniciar el proceso de nitrificación.

La Figura 4.37 muestra la evolución de los perfiles de pH, potencial redox y oxígeno disuelto durante un ciclo de operación en el que se experimentó una excesiva velocidad de agitación. En esta figura se puede observar que la concentración de oxígeno disuelto se incrementó hasta $0.3 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ al final de la etapa anóxica. El fenómeno de reaireación superficial quedó claramente reflejado en el incremento del potencial redox y el descenso del pH en condiciones anóxicas como consecuencia de la disponibilidad de aceptores de electrones en el medio (O_2 y

NO_2^-) y la oxidación de amonio (producción de H^+). En el caso en el que el proceso alcanzara condiciones anaerobias sería posible atribuir el descenso del pH a la producción de ácidos durante la fermentación (Tanwar *et al.*, 2008). Sin embargo, al comparar el comportamiento del pH con el del potencial redox, y disponer en este caso de mediciones de oxígeno disuelto, se puede confirmar la presencia del oxígeno en el licor mezcla del reactor durante la etapa anóxica. El patrón de incremento del potencial redox y descenso del pH durante la etapa anóxica podría ser empleado como indicador del fenómeno de reaireación superficial por excesiva velocidad de agitación.

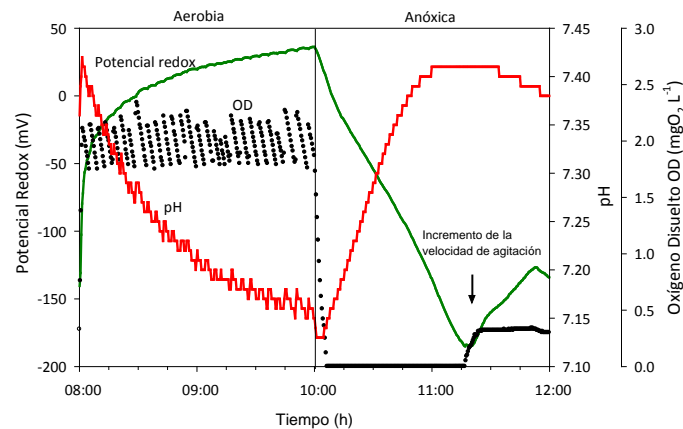


Figura 4.37. Evolución de los perfiles de pH, potencial redox y oxígeno disuelto en un ciclo de operación con excesiva agitación.

4.2.2.2 Desarrollo de una estrategia de monitorización del proceso

A partir del análisis exhaustivo de los registros de los sensores de pH y potencial redox durante la operación del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito se desarrolló una estrategia de monitorización del proceso basada en la información proporcionada por dichos sensores. La aplicación de esta estrategia tiene como objetivos conocer el estado del proceso en cada momento y su evolución con el tiempo, y además ofrecer información que permita identificar fallos operacionales. Esta información también sirvió de base para desarrollar el sistema de control del proceso, el cual se describe detalladamente en el siguiente apartado (4.3.2). El análisis de la información proveniente de los registros de pH y potencial redox durante la etapa aerobia y la etapa anóxica de un ciclo de operación, así como su evolución ciclo a ciclo, se encuentra recogido en la Tabla 4.10 y representado en la Figura 4.38. En esta figura se encuentran esquematizadas diversas situaciones de evolución de pH y potencial redox que permiten conocer el estado y la evolución con el tiempo de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en un reactor SHARON.

Tabla 4.10. Monitorización del estado y la evolución con el tiempo de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en un reactor SHARON a partir del seguimiento de los perfiles de pH y potencial redox.

Situación	pH	En: etapa/ciclo	Potencial redox	En: etapa/ciclo	Indica	Operación
a	Descenso acusado	Inicio etapa aerobia	Incremento acusado	Inicio etapa aerobia	Nitrificación de NH_4^+ acumulado en la fase anóxica del ciclo previo. Nitrificación de NH_4^+ de la corriente afluente. Puesta en marcha de la aireación.	Típica
b	Descenso leve	Inicio y/o durante etapa aerobia	Incremento acusado y posterior estabilidad	Durante etapa aerobia	Nitrificación de NH_4^+ de la corriente afluente. Puesta en marcha de la aireación. Evolución del proceso con una concentración de OD constante. Fallo bomba de alimentación.	Típica Atípica
c	Descenso o incremento	Inicio etapa aerobia	Presencia del punto de inflexión	Inicio etapa aerobia	Oxidación de materia orgánica. Elevada desabsorción de CO_2 .	Atípica
d	Incremento	Durante etapa aerobia	Incremento acusado y posterior estabilidad	Durante etapa aerobia	Cese de la nitrificación.	Atípica
e	Incremento acusado	Durante etapa anóxica	Descenso	Durante etapa anóxica	Desnitrificación.	Típica
f	Incremento leve o perfil plano	Final etapa anóxica	Descenso	Durante etapa anóxica	Final de la desnitrificación. Déficit de materia orgánica.	Típica Atípica
g	Descenso leve	Durante etapa anóxica	Descenso leve y posterior incremento leve	Durante etapa anóxica	Entrada de oxígeno al proceso y nitrificación.	Atípica
h	Incremento y posterior descenso leve	Durante etapa anóxica	Descenso y posterior incremento leve	Durante etapa anóxica	Entrada de oxígeno al proceso y nitrificación.	Atípica
i	Incremento leve	Inicio etapa anóxica	Descenso leve	Inicio etapa anóxica	Fallo dosificación materia orgánica	Atípica
j	$\Delta\text{pH}_{\text{Ae}} = \Delta\text{pH}_{\text{Ax}}$	Ciclo n	Ausencia del punto de inflexión	Inicio etapa aerobia ciclo n+1	Nitrificación y desnitrificación adecuada.	Típica
k	$\Delta\text{pH}_{\text{Ae}} < \Delta\text{pH}_{\text{Ax}}$	Ciclo n	Presencia del punto de inflexión	Inicio etapa aerobia ciclo n+1	Exceso de materia orgánica.	Atípica
l	$\Delta\text{pH}_{\text{Ae}} > \Delta\text{pH}_{\text{Ax}}$	Ciclo n	Ausencia del punto de inflexión	Inicio etapa aerobia ciclo n+1	Desnitrificación incompleta. Déficit de materia orgánica. Variación de la concentración de NH_4^+ en el afluente.	Atípica Típica
m	$\Delta\text{pH}_{\text{Ae}} > \Delta\text{pH}_{\text{Ax}}$	Ciclo n	Presencia del punto de inflexión	Inicio etapa aerobia ciclo n+1	Posible descalibración de las sondas de pH y/o potencial redox. Variación de la concentración de NH_4^+ en el afluente.	Atípica Típica
n	$\Delta\text{pH}_{\text{Ae}} < \Delta\text{pH}_{\text{Ax}}$	Ciclo n	Ausencia del punto de inflexión	Inicio etapa aerobia ciclo n+1	Desnitrificación de NO_2^- acumulado en ciclos anteriores. Déficit de materia orgánica. Variación de la concentración de NH_4^+ en el afluente.	Atípica Típica
o	$\Delta\text{pH}_{\text{Ae}} < \Delta\text{pH}_{\text{Ax}}$	Ciclo n	Presencia del punto de inflexión	Inicio etapa aerobia ciclo n+1	Desnitrificación de NO_2^- acumulado en ciclos anteriores. Exceso de materia orgánica. Variación de la concentración de NH_4^+ en el afluente.	Atípica Típica

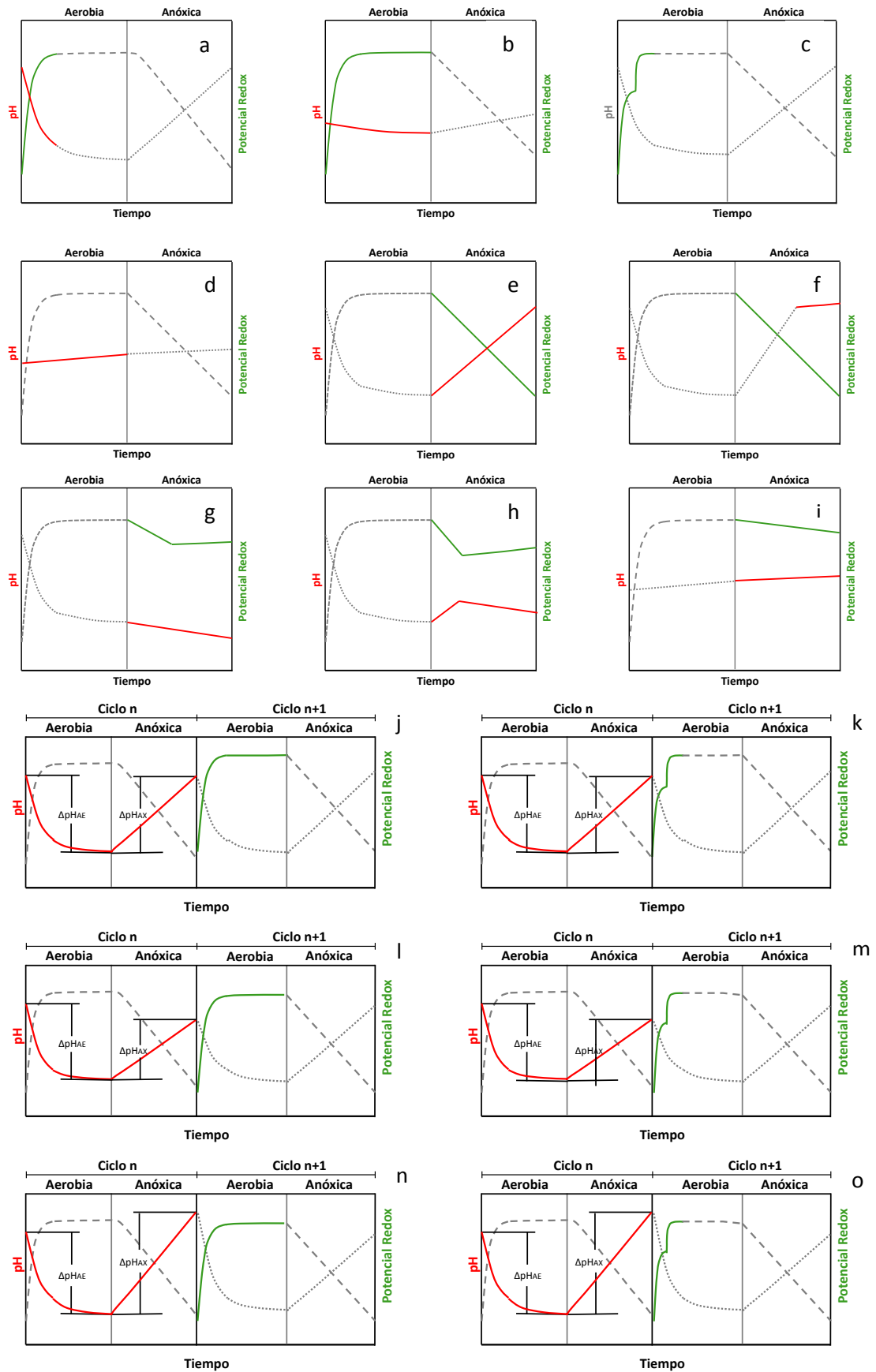


Figura 4.38. Monitorización del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación a partir de la evolución de los perfiles de pH y potencial redox durante las etapas aerobia y anóxica.

- **Análisis del pH y del potencial redox durante la etapa aerobia**

Un descenso de pH durante la etapa aerobia indica que se está llevando a cabo el proceso de nitrificación. Este descenso puede ser acusado o leve en función de la concentración de nitrógeno amoniacal en el licor mezcla del reactor. Es así como el pH experimentará un descenso acusado cuando se lleva a cabo tanto la oxidación del nitrógeno amoniacal que entra continuamente con la corriente afluyente al reactor, como la oxidación del nitrógeno amoniacal acumulado durante la etapa anóxica del ciclo previo de operación. Tal y como muestra la Figura 4.38a, este comportamiento del pH suele ser habitual al inicio de la etapa aerobia debido a que es el período en el que hay disponible una mayor concentración de nitrógeno amoniacal en el licor mezcla del reactor. Por otro lado, el pH experimentará un descenso leve debido a la oxidación del nitrógeno amoniacal que entra continuamente con la corriente afluyente al reactor. En la Figura 4.38a se puede observar que el descenso leve del pH ocurre tras el descenso acusado del mismo, por lo que este comportamiento del pH en reactores operados en continuo es habitual tras el consumo del amonio acumulado durante la etapa anóxica del ciclo previo de operación. Asimismo, el pH experimentará un descenso leve durante toda la etapa aerobia cuando al inicio de ésta no haya suficiente amonio acumulado. Esta baja acumulación de amonio puede ser debido a la corta duración de la etapa anóxica del ciclo previo de operación o a un fallo en el sistema de alimentación del reactor SHARON. En la Figura 4.38b se muestra un descenso leve del pH durante toda la etapa aerobia como consecuencia de la oxidación del amonio que entra continuamente con la corriente afluyente al reactor SHARON.

Un incremento acusado del potencial redox al inicio de la etapa aerobia indica la disponibilidad de un aceptor de electrones en el licor mezcla del reactor, en este caso oxígeno debido a la puesta en marcha de la aireación. Posteriormente, la estabilidad del perfil del potencial redox indica que la concentración de oxígeno disuelto en el licor mezcla del reactor es constante. En las Figuras 4.38a y 4.38b se encuentra representada esta variación del potencial redox durante la etapa aerobia. Este comportamiento del potencial redox durante la etapa aerobia de un ciclo de operación sugiere, a priori, que el proceso de nitrificación se está llevando a cabo de manera normal, al menos en lo que respecta al adecuado patrón de aireación del proceso. Sin embargo, es necesario confirmar la nitrificación mediante el descenso de pH.

La presencia de un punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de la etapa aerobia indica que se está llevando a cabo la oxidación de materia orgánica. En la Figura 4.38c se encuentra representado este punto de inflexión sobre un perfil de potencial redox extraído de un ciclo de operación del proceso. Esta variación del perfil de potencial redox es

consecuencia del elevado consumo de oxígeno disuelto por parte de los organismos heterótrofos para llevar a cabo la oxidación de la materia orgánica disponible en el licor mezcla del reactor, la cual fue adicionada en exceso al inicio de la etapa anóxica del ciclo previo de operación. Por otro lado, en los ciclos analizados no se observó un patrón definido de evolución de pH al inicio de la etapa aerobia en situaciones de exceso de materia orgánica.

Un incremento de pH durante la etapa aerobia indica que el proceso de nitrificación no se está llevando a cabo de manera normal. En la Figura 4.38d se muestra la evolución ascendente del pH en condiciones aerobias, la cual podría ser consecuencia de los siguientes aspectos:

1. Cese de la nitrificación por inhibición de la actividad de los organismos AOB, la cual podría ser consecuencia del efecto adverso de diversos factores ambientales, entre los cuales se encuentran: concentraciones de amonio/amoniaco, nitrito/ácido nitroso, salinidad, pH y temperatura. En el apartado 4.2.1 se encuentra un estudio detallado del efecto que ejercen estos factores ambientales sobre la actividad de los organismos AOB. Por otro lado, el cese de la nitrificación podría ser consecuencia de la pérdida de los organismos AOB del reactor SHARON debido a su forma de operación. En el apartado 4.2.1 también se encuentra un estudio detallado de la influencia que ejercen dos de los parámetros (TRH y TRC) más importantes en la operación de un reactor SHARON.

El cese de la nitrificación también podría ser consecuencia de la presencia en el agua residual de un tóxico para los organismos amonioxidantes que podría causar su inhibición. En el caso en que su presencia sea persistente en el agua residual podría ocasionar la pérdida de estos organismos del reactor SHARON. Sin embargo, sería conveniente confirmar previamente que los factores ambientales y parámetros de operación se encuentran en los valores y rangos adecuados para asegurar la actividad y la permanencia de los organismos AOB en el reactor SHARON.

2. Una corriente de agua residual con elevada alcalinidad podría ocasionar que el pH del proceso SHARON se incremente durante la etapa aerobia. La producción de protones durante la nitrificación no compensaría la elevada alcalinidad presente en el agua residual que entra continuamente al reactor, por lo que el pH del licor mezcla tendería a incrementarse, a pesar de que el proceso de nitrificación se está llevando a cabo. En los procesos de nitrificación-desnitrificación vía nitrito esta situación no sería conveniente debido a que el pH continuaría incrementándose durante la etapa anóxica debido a la elevada alcalinidad en el agua residual afluente y al proceso de desnitrificación, por lo que

sí la situación persiste la actividad de los organismos AOB estará inhibida por pH alto, causando finalmente el cese de la nitrificación.

- **Análisis del pH y del potencial redox durante la etapa anóxica**

Un incremento acusado del pH durante la etapa anóxica indica que se está llevando a cabo el proceso de desnitrificación. Tal y como se comentó, el proceso de desnitrificación recupera alcalinidad incrementando el pH del licor mezcla. Este comportamiento del pH suele estar acompañado de un descenso del potencial redox debido al consumo del aceptor de electrones presente en el licor mezcla del reactor, en este caso el nitrito producido durante la etapa aerobia previa. En la Figura 4.38e se puede observar el incremento pH y el descenso del potencial redox durante la etapa anóxica de un ciclo de operación.

Un incremento leve o estabilidad del perfil de pH durante la etapa anóxica indica el cese de la desnitrificación. Esta situación podría ser consecuencia de: i) desnitrificación completa debido a la reducción total del nitrito presente en el licor mezcla, ii) desnitrificación incompleta causada por déficit de materia orgánica. En la Figura 4.38f se encuentra representada la evolución del pH durante la etapa anóxica de un ciclo de operación. Esta figura muestra que el momento en el que el incremento del pH se hace leve y de perfil plano coincide con el cese de la desnitrificación, y además suele aparecer tras un incremento acusado del mismo durante la etapa anóxica.

Por otro lado, en la Figura 4.38f también se muestra la dinámica de descenso del potencial redox durante la etapa anóxica, la cual indica la reducción de nitrito presente en el licor mezcla del reactor SHARON. A medida que el nitrito es reducido mediante desnitrificación el potencial redox se hace más negativo. Es importante considerar que a pesar de observar un descenso del potencial redox durante la etapa anóxica, valores positivos de éste al final de la etapa anóxica indican disponibilidad de nitrito en el licor mezcla, por lo que en este caso el cese de la desnitrificación identificado mediante el perfil plano de pH sería consecuencia del déficit de materia orgánica. Además, la ausencia del punto de inflexión sobre el perfil del potencial redox (Figura 4.38c) extraído del análisis de la evolución de éste al inicio de la etapa aerobia del ciclo siguiente de operación permitiría confirmar este déficit de materia orgánica.

Un descenso leve del pH acompañado de un descenso y posterior incremento del potencial redox durante la etapa anóxica indican que el proceso de desnitrificación no se está llevando a cabo. Tal y como se comentó, el descenso del pH es consecuencia del proceso de nitrificación, por lo que observar este comportamiento durante la etapa anóxica indicará que hay una

posible entrada de oxígeno al proceso, bien sea por reaireación superficial o por un fallo en el sistema de aireación que ocasionó que éste se pusiera en marcha mientras el reactor se encontraba aún en la etapa anóxica. En la Figura 4.38g se encuentra representado un descenso leve del pH y, un descenso y posterior incremento del potencial redox durante la etapa anóxica. Este comportamiento atípico se encuentra esquematizado en esta figura desde el inicio de la etapa anóxica del ciclo de operación representado. Sin embargo, puede ocurrir en cualquier instante durante la etapa anóxica (Figura 4.38h). En el caso en el que se tenga disponibilidad de registros de la concentración de oxígeno disuelto en el licor mezcla del reactor sería recomendable revisarlos para confirmar la entrada de aire al reactor.

Un incremento leve de pH acompañado de un descenso leve de potencial redox al inicio de la etapa anóxica sugiere que el proceso de desnitrificación estaría limitado por materia orgánica, ocasionado posiblemente por un déficit en la dosificación de ésta al inicio de la etapa anóxica o por un fallo en la dosificación. La Figura 4.38i muestra el comportamiento del pH y del potencial redox al inicio de la etapa anóxica cuando el proceso de desnitrificación se encuentra limitado por materia orgánica. Inicialmente, sería conveniente descartar la ocurrencia del fallo en la dosificación de materia orgánica mediante el registro de ésta. Posteriormente, sería conveniente realizar un análisis de la evolución del pH y del potencial redox durante la etapa aerobia y anóxica del ciclo de operación actual (n) y de los ciclos posteriores de operación (n+1), con el objetivo de confirmar el déficit de materia orgánica.

Análisis del pH y del potencial redox durante ciclos de operación

Con el objetivo de ampliar el conocimiento acerca del estado de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito, a continuación se presenta un análisis del pH y del potencial redox durante las etapas aerobia y anóxica de un ciclo de operación, así como la interpretación que se puede realizar de esta información ciclo a ciclo.

La comparación entre el descenso y el incremento del pH en cada ciclo de operación proporciona información acerca de la producción y el consumo de nitrito por parte de los microorganismos involucrados en los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito, respectivamente. Asimismo, la presencia del punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de cada etapa aerobia indica si la materia orgánica fue dosificada en exceso al inicio de la etapa anóxica del ciclo previo de operación.

La similitud entre el ΔpH_{AE} y el ΔpH_{AX} en cada ciclo de operación indica que el nitrito producido durante la etapa aerobia fue completamente reducido durante la etapa anóxica. Tal y como se

muestra en la Figura 4.38j, cuando la similitud entre los deltas de pH (ΔpH_{AE} y ΔpH_{AX}) coincide con la ausencia del punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de la etapa aerobia del ciclo posterior, indica que los procesos de nitrificación y desnitrificación se están llevando a cabo de forma adecuada y sin exceso de materia orgánica. Por otro lado, tal y como muestra la Figura 4.38k, cuando la similitud de los deltas de pH coinciden con la presencia del punto de inflexión en el perfil de potencial redox al inicio de la etapa aerobia del ciclo posterior, indica que los procesos de nitrificación y desnitrificación se están llevando a cabo de manera adecuada, pero con exceso de materia orgánica.

La determinación del punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de las etapas aerobias permite conocer el patrón de dosificación de materia orgánica realizado ciclo a ciclo. Tal y como se comentó en el apartado 4.3.1.1.2, en los casos en los que se detecte este punto de inflexión, el análisis del tiempo transcurrido desde el inicio de la etapa aerobia hasta el momento en el que se detecta permite conocer, de forma indirecta, la materia orgánica dosificada en exceso al inicio de la etapa anóxica en cada ciclo de operación. Por lo tanto, a medida que este tiempo se hace mayor entre un ciclo de operación (n) y el siguiente (n+1), indica que la adición en exceso de materia orgánica fue cada vez mayor. Por el contrario, a medida que este tiempo se hace menor entre un ciclo de operación y el siguiente, indica que la adición en exceso de materia orgánica fue cada vez menor.

Cuando el ΔpH_{AE} sea mayor que el ΔpH_{AX} en un ciclo de operación indica la reducción incompleta del nitrito producido durante la etapa aerobia, dando lugar a un proceso de desnitrificación incompleto. Además, la ausencia del punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de la etapa aerobia del ciclo siguiente de operación indica que el cese de la desnitrificación fue ocasionado por un déficit de materia orgánica, por lo que el nitrito comenzará a acumularse ciclo a ciclo. En la Figura 4.38l se encuentra representado el comportamiento típico del pH y del potencial redox cuando el proceso de desnitrificación es incompleto ($\Delta pH_{AE} > \Delta pH_{AX}$) debido a un déficit de materia orgánica (ausencia del punto de inflexión en el perfil de potencial redox). Por otro lado, en las situaciones en las que el ΔpH_{AE} sea mayor que el ΔpH_{AX} en un ciclo de operación, y además se detecte el punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de la etapa aerobia del ciclo siguiente de operación, indica un posible fallo en la medida del pH y/o del potencial redox, ocasionado por la descalibración del sensor o deterioro de éste. También este tipo de variación en el perfil del pH podría indicar cambios en la concentración de amonio en la corriente afluente al reactor SHARON. La Figura 4.38m muestra el comportamiento del pH y del potencial redox frente a un posible fallo en la

lectura de los sensores o variaciones en la concentración de amonio en la corriente afluyente del reactor.

Cuando el ΔpH_{AE} sea menor que el ΔpH_{AX} en un ciclo de operación indica la reducción tanto del nitrito producido durante la etapa aerobia, como del acumulado en ciclos previos de operación. En la Figura 4.38n se muestra que cuando este comportamiento de pH coincide con la ausencia del punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de la etapa aerobia del ciclo siguiente de operación indica un déficit de materia orgánica, por lo que sería recomendable incrementar la dosificación. En la Figura 4.38o se muestra que cuando este comportamiento del pH coincide con la presencia de este punto de inflexión en el perfil del potencial redox indica un exceso de materia orgánica, por lo que sería recomendable disminuir la dosificación. Asimismo, en ambos casos podría indicar variaciones en la concentración de amonio en la corriente afluyente al reactor SHARON.

4.2.3 Control del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito

La información recopilada durante la etapa de monitorización se empleó para desarrollar un sistema de control para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito. El sistema de control desarrollado integra dos algoritmos de control independientes que se basan en la información aportada por los sensores de pH y potencial redox.

El primero de los algoritmos permite ajustar de manera automática la duración de las etapas aerobia y anóxica a partir del análisis en tiempo real de la evolución del perfil de pH en cada etapa. El conocimiento técnico del proceso adquirido durante la etapa de monitorización permitió establecer dos puntos de corte sobre el perfil de pH que representan la finalización de los procesos de nitrificación y desnitrificación que ocurren en condiciones aerobias y anóxicas, respectivamente.

El segundo algoritmo cuyo objetivo es optimizar la dosificación de materia orgánica necesaria para el proceso de desnitrificación está basado en la lógica difusa, y emplea la información aportada por los sensores de pH y potencial redox para el control de la dosificación de materia orgánica al inicio de la etapa anóxica en cada ciclo de operación.

4.2.3.1 Control automático de la duración de las etapas aerobia y anóxica

Como se acaba de indicar la evolución del pH a lo largo del ciclo de operación se empleó para diseñar el algoritmo de control para ajustar la duración de las etapas aerobias y anóxicas. Si recordamos como era la evolución del pH y de la concentración de los compuestos nitrogenados a lo largo de un ciclo de operación (Figura 4.39a), ya comentado en detalle en el apartado de monitorización, durante la etapa aerobia hay un descenso de la concentración de amonio hasta que se estabiliza, momento en el cual el amonio acumulado durante la etapa anóxica del ciclo de operación previo ha sido completamente oxidado. En este instante (en torno al minuto 80 en Figura 4.39a) la etapa aerobia debería finalizar debido a que la concentración de amonio en el licor mezcla del reactor SHARON se mantuvo casi constante; mientras que la concentración de nitrito continuó incrementándose progresivamente en el licor mezcla, y saliendo con el efluente del reactor durante el periodo comprendido entre el minuto 80 y el minuto 120. Durante este periodo de tiempo los organismos AOB continuaron oxidando el amonio que entraba continuamente con la corriente afluente.

Por otra parte, durante la etapa anóxica el nitrito producido durante la etapa aerobia del ciclo mostrado en la Figura 4.39a fue desnitrificado, y el instante de tiempo en el que el nitrito fue

completamente reducido (en torno al minuto 160 en Figura 4.39a), que es justo cuando el pH deja de incrementarse y se estabiliza, debe finalizar la etapa anóxica. Tal y como se puede observar en la Figura 4.39a, durante el período comprendido entre el minuto 160 y el minuto 240 se acumuló progresivamente en el reactor el amonio que entraba con la corriente afluente al proceso. Al tratarse de un reactor operado en continuo (RCTA) la concentración de amonio en el efluente del reactor se incrementó empeorando la calidad de tratamiento del proceso SHARON.

La velocidad de descenso y de aumento del pH a lo largo de las etapas aerobia y anóxica fue empleada para determinar la finalización de estas etapas en cada ciclo de operación. Como resultado del análisis de la evolución de este parámetro y su comparación con la evolución de los compuestos nitrogenados en numerosos ciclos de operación, se estableció un punto de corte sobre la variable empleada para representar la velocidad de descenso de pH en condiciones aerobias (durante el proceso de nitrificación), y otro punto de corte sobre la variable empleada para representar la velocidad de aumento de pH en condiciones anóxicas (durante el proceso de desnitrificación). Estos puntos de corte corresponden a cambios significativos en la evolución de esta variable, los cuales están relacionados con la estabilización del pH durante los procesos de nitrificación y desnitrificación.

A continuación se describen las variables empleadas para representar la dinámica del pH durante las etapas aerobia y anóxica, así como los valores de puntos de corte o finalización de etapa establecidos en el sistema de control del proceso SHARON.

- **Etapas Aerobia**

La velocidad de descenso del pH durante la etapa aerobia se representó mediante el cálculo de dos variables: la pendiente móvil del perfil de pH (pH_{MS}) y la media de la pendiente móvil del perfil de pH (pH_{AMS}). El cálculo de la variable pH_{MS} se realizó utilizando 15 valores de pH consecutivos. Tal y como se explicó en el apartado de materiales y métodos, los datos registrados por el sensor de pH se almacenaban en el ordenador cada 30 segundos. En la Figura 4.39b se puede observar que el perfil de la variable pH_{MS} presenta fluctuaciones considerables (ruido en la señal) que interfieren en la detección del punto de corte de interés. Con el objetivo de facilitar la detección de este punto se procedió al filtrado de la señal mediante el cálculo del valor medio de la pendiente móvil del perfil de pH (pH_{AMS}): cada pH_{AMS} se obtuvo a partir del promedio de 15 valores de pH_{MS} . En la Figura 4.40b se puede observar que pH_{AMS} es una señal con menor ruido, y por tanto, sobre esta variable se estableció el punto de corte de la etapa aerobia ($EPpH_{AMS}$), determinado en -0.5 tras el análisis a números ciclos de

operación. Este punto de corte corresponde con la finalización del amonio acumulado en el ciclo previo de operación. Al inicio de la etapa aerobia se está oxidando el amonio acumulado del ciclo previo de operación y el amonio que entra continuamente con el afluente al reactor, por lo que la velocidad de descenso del pH es elevada y por tanto la variable pH_{AMS} es muy negativa. A medida que el amonio acumulado es consumido la velocidad de descenso de pH disminuye y se estabiliza, por lo que el valor de esta variable se hace menos negativo y luego se estabiliza en un comportamiento oscilatorio. La estabilización del pH corresponde con la finalización del amonio acumulado en el ciclo previo de operación, por lo que la etapa aerobia finalizará cuando el valor de pH_{AMS} sea superior a EPpH_{AMS} .

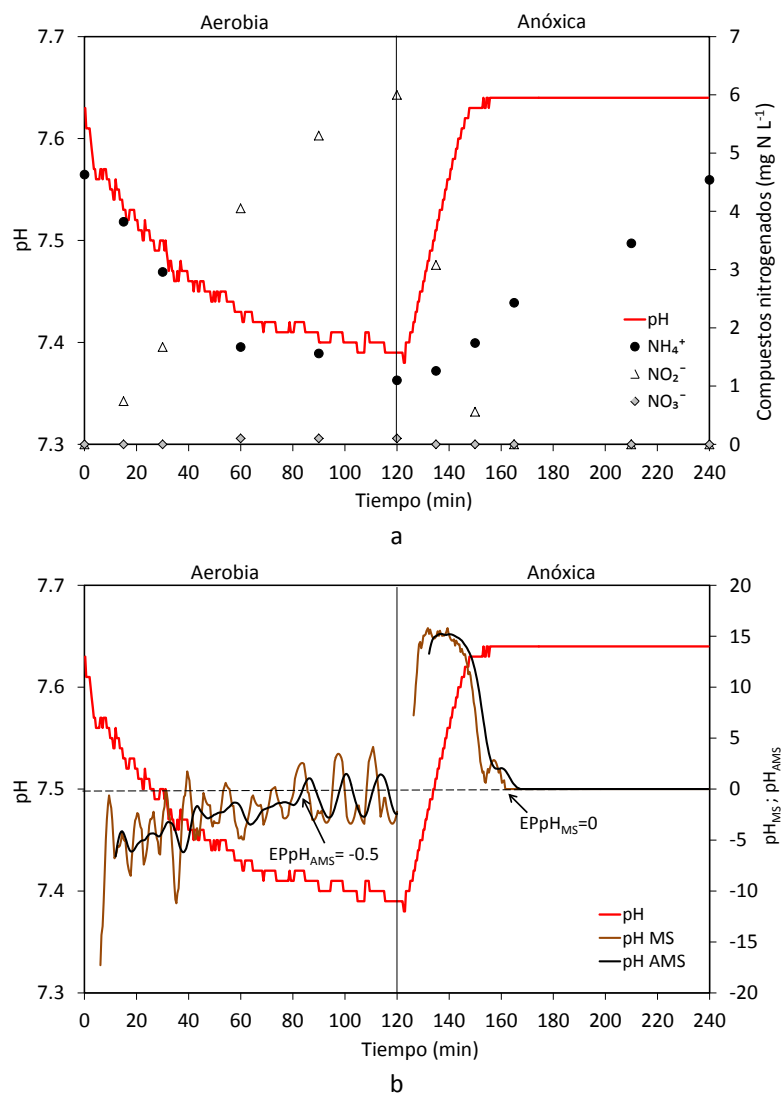


Figura 4.39. Evolución del pH a lo largo de un ciclo de operación junto con: (a) la evolución de las concentraciones de los compuestos nitrogenados y (b) pendiente móvil de pH (pH_{MS}) y promedio de la pendiente móvil de pH (pH_{AMS}) durante las etapas aerobia y anóxica de un ciclo de operación. EPpH_{AMS} y EPpH_{MS} son valores de referencia empleados para identificar la finalización de las etapas aerobia y anóxica, respectivamente.

- **Etapa Anóxica**

La velocidad de aumento de pH durante la etapa anóxica se representó mediante la variable pendiente móvil del perfil de pH (pH_{MS}). Al igual que en la etapa aerobia, el cálculo de esta variable se realizó utilizando 15 valores de pH consecutivos. Debido a que la señal obtenida de pH_{MS} en condiciones anóxicas no presentó fluctuaciones considerables (Figura 4.39b), directamente sobre esta variable se estableció el punto de corte de la etapa anóxica ($EPpH_{MS}$), determinado en 0 (cero) tras el análisis a números ciclos de operación. Este punto de corte corresponde con la finalización del proceso de desnitrificación. Es decir, cuando hay nitrito y materia orgánica en el licor mezcla del reactor la variable pH_{MS} es positiva debido a la elevada velocidad de aumento de pH que ocasiona el proceso de desnitrificación. Cuando el nitrito y/o la materia orgánica son completamente consumidos el pH se estabiliza, y por tanto la variable pH_{MS} será cero.

La validación de los valores de los parámetros establecidos como puntos de finalización de la etapa aerobia ($EPpH_{AMS}$) y de la etapa anóxica ($EPpH_{MS}$), así como el algoritmo de control desarrollado se encuentra en el apartado 4.3.4.

4.2.3.2 Control automático de la dosificación de materia orgánica

Optimizar la dosificación de materia orgánica en el proceso SHARON es fundamental para reducir costes de operación. Como se ha comentado previamente, la estrategia de control para optimizar la dosificación de la materia orgánica se basa en lógica difusa, y emplea la información procedente de los sensores de pH y potencial redox para determinar la cantidad de materia orgánica que se debe dosificar en la etapa anóxica de cada ciclo de operación. La dosificación de la materia orgánica se realiza en cada ciclo al inicio de cada etapa anóxica con el objetivo de desnitrificar el nitrito producido durante la etapa aerobia de dicho ciclo.

El diseño de la estrategia de control para optimizar la dosificación de materia orgánica se basó en los resultados obtenidos durante la monitorización del proceso SHARON (apartado 4.3.1). La información procedente de los sensores de pH y potencial redox instalados en el reactor se relacionó con los parámetros analíticos medidos en el laboratorio (apartado 3.3), los cuales indicaron la evolución de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito llevados a cabo en el reactor SHARON.

A continuación se describe el comportamiento del pH y del potencial redox en situaciones que indican la dosificación adecuada de materia orgánica, así como en situaciones de exceso o déficit de materia orgánica. El sistema de control recibirá esta información y actuará

manteniendo, reduciendo o incrementando la cantidad de materia orgánica a dosificar al inicio de la etapa anóxica del ciclo siguiente de operación.

La dosificación adecuada de materia orgánica queda reflejada en los perfiles de pH y potencial redox cuando el descenso del pH en la etapa aerobia es similar al incremento de pH en la etapa anóxica, y además hay ausencia del punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de la etapa aerobia del ciclo posterior de operación (Figura 4.38j).

La adición en exceso de materia orgánica al inicio de la etapa anóxica de un ciclo de operación puede ser detectada por la presencia de un punto de inflexión ("*bending point*") en el perfil de potencial redox al inicio de la etapa aerobia del ciclo siguiente de operación (Figura 4.38c). El tiempo transcurrido desde el inicio de la etapa aerobia y el momento en el que se produce el punto de inflexión en el perfil del potencial redox está relacionado de manera indirecta con la cantidad de materia orgánica adicionada en exceso al inicio de la etapa anóxica del ciclo previo de operación. El tiempo en el que el punto de inflexión es detectado será mayor cuanto mayor haya sido la cantidad de materia orgánica adicionada en exceso, y por tanto, el sistema de control procederá a reducir, de forma leve o brusca, la cantidad de materia orgánica a dosificar. Asimismo, el seguimiento de este parámetro ciclo a ciclo permite conocer si la acción de control ejecutada (reducción de la dosis de materia orgánica) es adecuada (reducción exacta de materia orgánica) o por el contrario es insuficiente (reducción leve de materia orgánica), permitiendo afinar la respuesta del sistema de control a lo largo de la operación del proceso.

La adición insuficiente de materia orgánica al inicio de la etapa anóxica de un ciclo de operación puede ser detectada comparando el descenso y el incremento del pH durante las etapas aerobias y anóxicas, respectivamente, en cada ciclo de operación. Un déficit de materia orgánica podría ser detectado cuando el descenso del pH en la etapa aerobia sea superior al incremento de pH en la etapa anóxica del mismo ciclo de operación (Figura 4.38i). Por otro lado, el valor del potencial redox medido al final de la etapa anóxica indica el estado de oxidación-reducción en el que se encuentra el licor mezcla en el reactor SHARON. Un déficit de materia orgánica podría ser detectado cuando el valor del potencial redox al final de la etapa anóxica sea positivo o poco negativo. En cualquiera de los casos sería necesario realizar calibraciones periódicas de este parámetro para ajustarlo a las características del licor mezcla del reactor.

Como se comentó en el apartado 1.3.1 de introducción, en un sistema de control por lógica difusa hay cinco etapas características, las cuales se particularizan a continuación para el caso

que nos ocupa. En la Figura 4.40 se encuentra esquematizado el diagrama general que incluye las cinco etapas que integran el sistema de control desarrollado para la dosificación de la materia orgánica al inicio de la etapa anóxica de cada ciclo de operación del proceso SHARON.

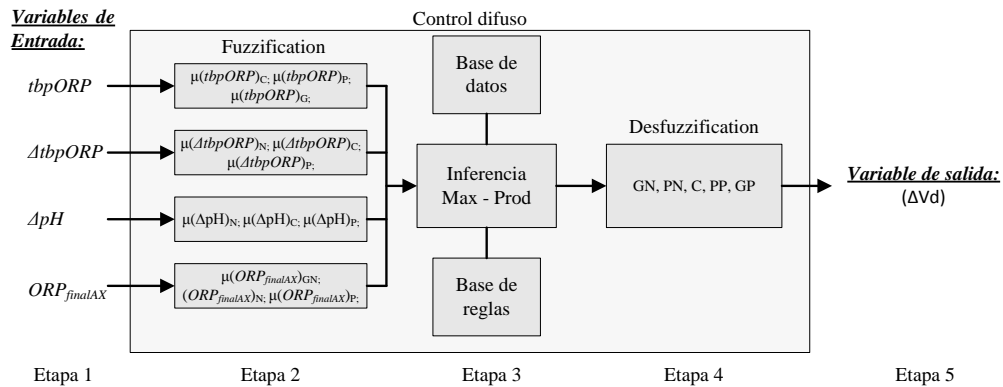


Figura 4.40 Etapas que integran el sistema de control basado en lógica difusa desarrollado para optimizar la dosificación de materia orgánica.

I. Entrada de datos físicos al sistema de control. En esta etapa se introducen al sistema de control los valores de las variables determinadas a partir de los registros *on-line* de pH y potencial redox. A modo de ejemplo, en la Figura 4.41 se encuentra representada la evolución de los perfiles de pH y potencial redox a lo largo de dos ciclos de operación con duración de etapas fija y dosificación en exceso de materia orgánica. En esta figura se encuentran consignadas las variables de entrada al controlador sobre los perfiles de pH y potencial redox a lo largo de los dos ciclos de operación representados.

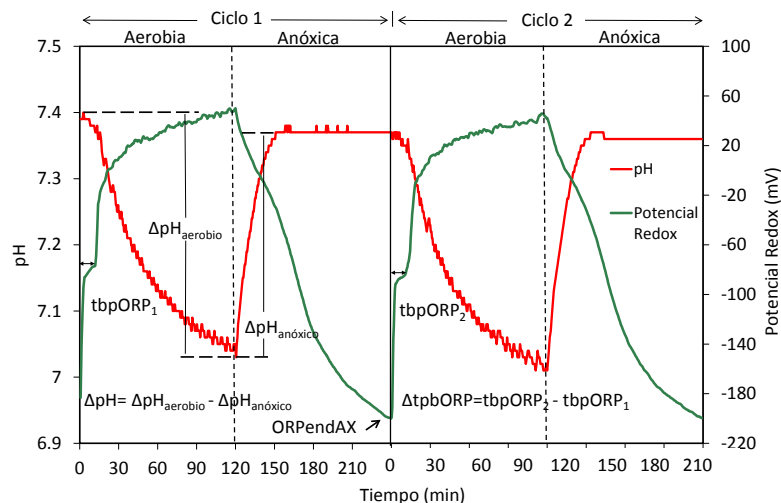


Figura 4.41. Variables de entrada al sistema de control: $tbpORP$, tiempo entre el inicio de la etapa aerobia y el momento en el que se produce el punto de inflexión en el perfil del potencial redox; $\Delta tbpORP$, diferencia entre $tbpORP$ medido en el ciclo actual y $tbpORP$ medido en el ciclo anterior; ΔpH , diferencia entre el $\Delta pH_{aerobio}$ y $\Delta pH_{anóxico}$ en un ciclo de operación; ORP_{endAX} , valor del potencial redox al final de la etapa anóxica.

A continuación se describen las variables de entrada al controlador:

1. **Tiempo transcurrido entre el inicio de la etapa aerobia y el momento en el que se produce el punto de inflexión en el perfil del potencial redox, (*tbpORP*).** La variable *tbpORP* indica de manera indirecta la cantidad de materia orgánica adicionada en exceso, y se relaciona con la operación del proceso de la siguiente manera: cuanto mayor sea el *tbpORP* mayor ha sido el exceso de materia orgánica adicionado al inicio de la etapa anóxica del ciclo previo. Tal y como se comentó, el sistema de control debería adicionar menos materia orgánica al inicio de la etapa anóxica del ciclo de operación actual. La respuesta de la acción de control dependerá de la duración del *tbpORP*, es decir, del tiempo transcurrido desde el inicio de la etapa aerobia y el momento en el que se produce, así cuanto mayor sea el *tbpORP* mayor debe ser la reducción de dosificación. A modo de ejemplo, en la Figura 4.41 se muestran dos puntos de inflexión, denominados *tbpORP₁* y *tbpORP₂*, determinados al inicio de los dos ciclos de operación representados.

El cálculo del *tbpORP* se realizó sobre la curva de la pendiente móvil del potencial redox (ORP_{MS}), la cual representa la evolución del potencial redox durante la etapa aerobia. Por lo tanto, inicialmente se procede al cálculo de la variable ORP_{MS} , para lo cual se emplean 5 valores de potencial redox consecutivos. Los valores de potencial redox eran registrados por el sensor y almacenados en el ordenador cada 30 segundos. En la Figura 4.42a se encuentra representada la evolución del potencial redox y el perfil de la pendiente móvil del potencial redox. Posteriormente, se procede a determinar el *tbpORP* mediante el cálculo del cociente entre la variable ORP_{MS} del instante actual (t) y la variable ORP_{MS} anterior (t-1) y, su comparación con un valor de referencia, denominado Vr_{tbpORP} (Figura 4.42b). Tras el análisis minucioso de numerosos ciclos de operación se estableció que el valor adecuado de Vr_{tbpORP} es igual a 1.05. Por lo tanto, se detectará un *tbpORP* siempre que la diferencia obtenida entre $ORP_{MS}(t)$ y $ORP_{MS}(t-1)$ sea superior a Vr_{tbpORP} (Ecuación 4.10).

$$\text{Cálculo de } \mathit{tbpORP} \quad \text{Si } \frac{ORP_{MS\ t}}{ORP_{MS\ t-1}} > Vr_{tbpORP} \text{ entonces } \mathit{tbpORP} \quad 4.10$$

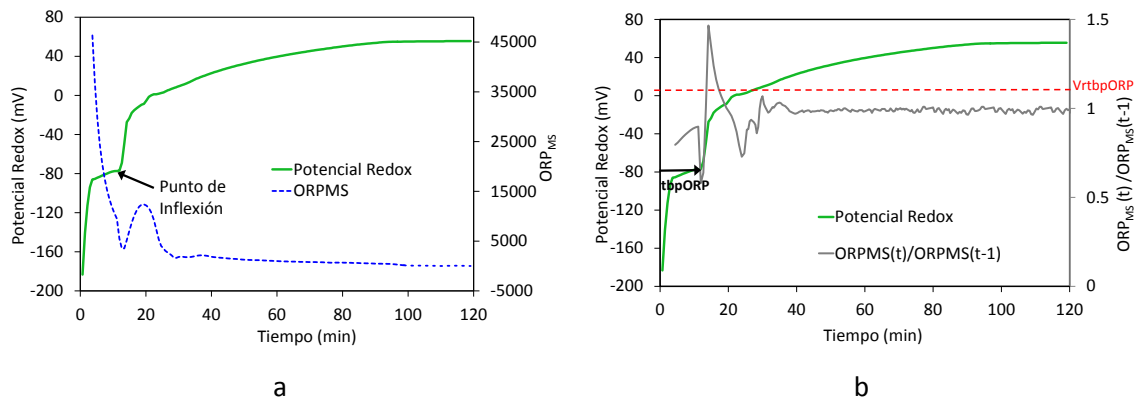


Figura 4.42. Evolución del perfil de potencial redox frente a: (a) perfil de la pendiente móvil del potencial redox (ORPMS) y (b) perfil del cociente entre ORPMS del instante actual (t) y ORPMS anterior (t-1).

2. Diferencia entre el t_{bpORP} calculado en el ciclo actual y el t_{bpORP} calculado en el ciclo anterior (Δt_{bpORP}). La variable Δt_{bpORP} proporciona información acerca de la dosificación de materia orgánica realizada ciclo a ciclo. Tal y como se comentó, mediante el seguimiento a esta variable es posible determinar si la acción de control se realizó de forma adecuada, o si por el contrario esta acción del sistema de control fue demasiado brusca o demasiado suave. Esta información al ser incorporada en el sistema de control permitirá realizar las correcciones correspondientes en la próxima acción del sistema de control. El cálculo de esta variable se encuentra representado en la Figura 4.41 a través de la comparación entre t_{bpORP_1} y t_{bpORP_2} , calculados en los dos ciclos de operación representados (Ecuación 4.11).

Cálculo de Δt_{bpORP}

$$\Delta t_{bpORP} = t_{bpORP_2} - t_{bpORP_1}$$

4.11

La interpretación de esta variable se realiza de la siguiente manera:

- Un valor positivo del Δt_{bpORP} indica que el exceso de la dosificación de materia orgánica en el ciclo actual es mayor que en el ciclo anterior. La acción de control deberá ser brusca para reducir considerablemente la materia orgánica a dosificar al inicio de la etapa anóxico del ciclo siguiente.
- Un valor negativo del Δt_{bpORP} indica que la cantidad de materia orgánica dosificada en el ciclo actual fue menor a la dosificada en el ciclo anterior. No obstante, resulta necesario evaluar la información procedente de las demás variables de entrada al sistema de control para confirmar que la adición de materia orgánica fue la óptima.

3. Diferencia entre el descenso de pH en la etapa aaerobia ($\Delta pH_{\text{aerobio}}$) y el incremento de pH en la etapa anóxica ($\Delta pH_{\text{anóxico}}$) (ΔpH). La variable ΔpH proporciona información acerca de la evolución de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en un ciclo de operación del reactor SHARON. En la Figura 4.41 se encuentra representada la variación del pH y el cálculo del ΔpH para las etapas aerobia ($\Delta pH_{\text{aerobio}}$) y anóxica ($\Delta pH_{\text{anóxico}}$) del ciclo 1 de operación representado. En la Ecuación 4.12 se muestra el procedimiento de cálculo de la variable ΔpH .

Cálculo de ΔpH

$$\Delta pH = \Delta pH_{\text{aerobio}} - \Delta pH_{\text{anóxico}}$$

4.12

La interpretación de esta variable se realiza de la siguiente manera:

- Un valor positivo del ΔpH indica que el nitrito producido durante la etapa aerobia no fue completamente reducido durante la etapa anóxica del ciclo de operación. Esta situación puede deberse a un déficit de materia orgánica que ocasionó un proceso de desnitrificación incompleto. En este caso la acción del sistema de control estaría encaminada a incrementar la dosis de materia orgánica en el ciclo siguiente de operación.
- Un valor negativo del ΔpH indica una posible reducción del nitrito que se encontraba acumulado en los ciclos previos de operación. En este caso, la acción del control será suave, y dependerá de la información aportada por las demás variables de entrada al sistema de control.

4. Valor del potencial redox al final de la etapa anóxica (ORP_{finalAX}). La variable ORP_{finalAX} proporciona información acerca de la acumulación de nitrito al final de la etapa anóxica. En la Figura 4.43 se muestra la relación del potencial redox con la concentración de nitrito determinados al final de la etapa anóxica de múltiples ciclos de operación del proceso SHARON. En esta figura se puede observar que:

- Valores positivos del potencial redox (> 0 mV) indican presencia de nitrito en el reactor. En este caso el sistema de control debería actuar de manera brusca incrementando la cantidad de materia orgánica a dosificar al inicio de la etapa anóxica del ciclo siguiente de operación.

- Valores poco negativos del potencial redox (rango entre -40 mV y 0 mV) indican que podría haber nitrito acumulado. En este caso la acción del sistema de control debería ser de incremento suave y estaría condicionada a la información aportada por las otras variables de entrada. Es decir, sería necesario conocer si las demás variables también indican un déficit de materia orgánica, por lo que en este caso el sistema de control actuaría incrementando la dosificación de materia orgánica en el ciclo siguiente de operación.
- Valores muy negativos del potencial redox (<-40 mV) indican ausencia de nitrito en el reactor. En este caso la información que transmite esta variable al sistema de control sería de estabilidad del proceso, por lo que en este caso el sistema de control no debería realizar ninguna acción de control.

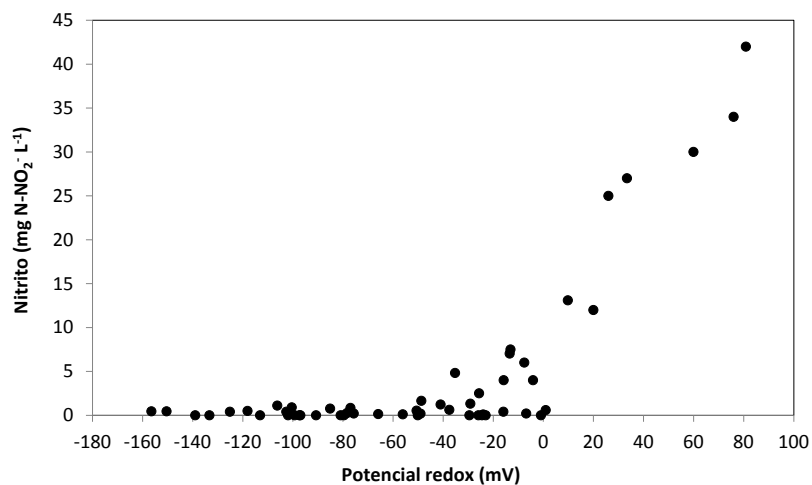


Figura 4.43. Relación entre la concentración de nitrito y el potencial redox medidos al final de la etapa anóxica en múltiples ciclos de operación del proceso SHARON.

II. Fuzzificación. Una vez se disponen de las variables físicas de entrada al sistema de control ($tbpORP$, $\Delta tbpORP$, ΔpH y $ORP_{finalAX}$), éstas son transformadas a variables difusas. Las variables difusas son obtenidas a partir de las funciones de pertenencia correspondientes a cada etiqueta lingüística definida para cada variable. El grado de pertenencia de cada variable de entrada a cada etiqueta determina el valor de la variable difusa.

Las funciones de pertenencia utilizadas en el desarrollo de este sistema de control basado en lógica difusa siguen una distribución gaussiana, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\mu(p) = \exp \left[-\frac{(p - c)^2}{2 \cdot \sigma^2} \right] \quad 4.13$$

donde:

$\mu(p)$	grado de pertenencia de la variable de entrada
p	es la variable de entrada
c	es el centro de la curva gaussiana
σ	es el ancho de la curva gaussiana

En el algoritmo de control desarrollado se emplearon tres etiquetas lingüísticas (e1, e2 y e3) para cada una de las variables de entrada. De acuerdo con la Ecuación 4.13, la forma de las funciones de pertenencia vendrá definida por los parámetros de centro (c) y ancho (σ) de cada curva gaussiana. En la Tabla 4.11 se encuentran los parámetros de centro y ancho que definen las funciones de pertenencia de cada variable de entrada al sistema de control, y en la Tabla 4.12 se encuentran las etiquetas lingüísticas definidas para cada una de las variables de entrada. Las funciones de pertenencia para las variables de entrada se encuentran representadas en la Figura 4.44.

Tabla 4.11. Parámetros de centro (c) y ancho (σ) que definen las funciones de pertenencia de cada variable física de entrada (p).

Etiquetas lingüísticas (p)					
e1		e2		e3	
$\mu(p)e1$		$\mu(p)e2$		$\mu(p)e3$	
Centro	Ancho	Centro	Ancho	Centro	Ancho
C_{e1}	σ_{e1}	C_{e2}	σ_{e2}	C_{e3}	σ_{e3}

Las funciones de pertenencia de las etiquetas lingüísticas de los extremos, e1 y e3, cumplen las siguientes restricciones:

1. *Etiqueta lingüística e1*: si $p \leq C_{e1} \rightarrow \mu(p)_{e1} = 1$
2. *Etiqueta lingüística e3*: si $p \geq C_{e3} \rightarrow \mu(p)_{e3} = 1$

Tabla 4.12. Etiquetas lingüísticas definidas para las variables de entrada al sistema de control

Variable de entrada	Etiqueta lingüística		
	e1	e2	e3
<i>tbpORP</i>	Cero (C)	Pequeño (P)	Grande (G)
<i>ΔtbpORP</i>	Negativo (N)	Cero (C)	Positivo (P)
<i>ΔpH</i>	Negativo (N)	Cero (C)	Positivo (P)
<i>ORP_{finalAX}</i>	Grande Negativo (GN)	Negativo (N)	Positivo (P)

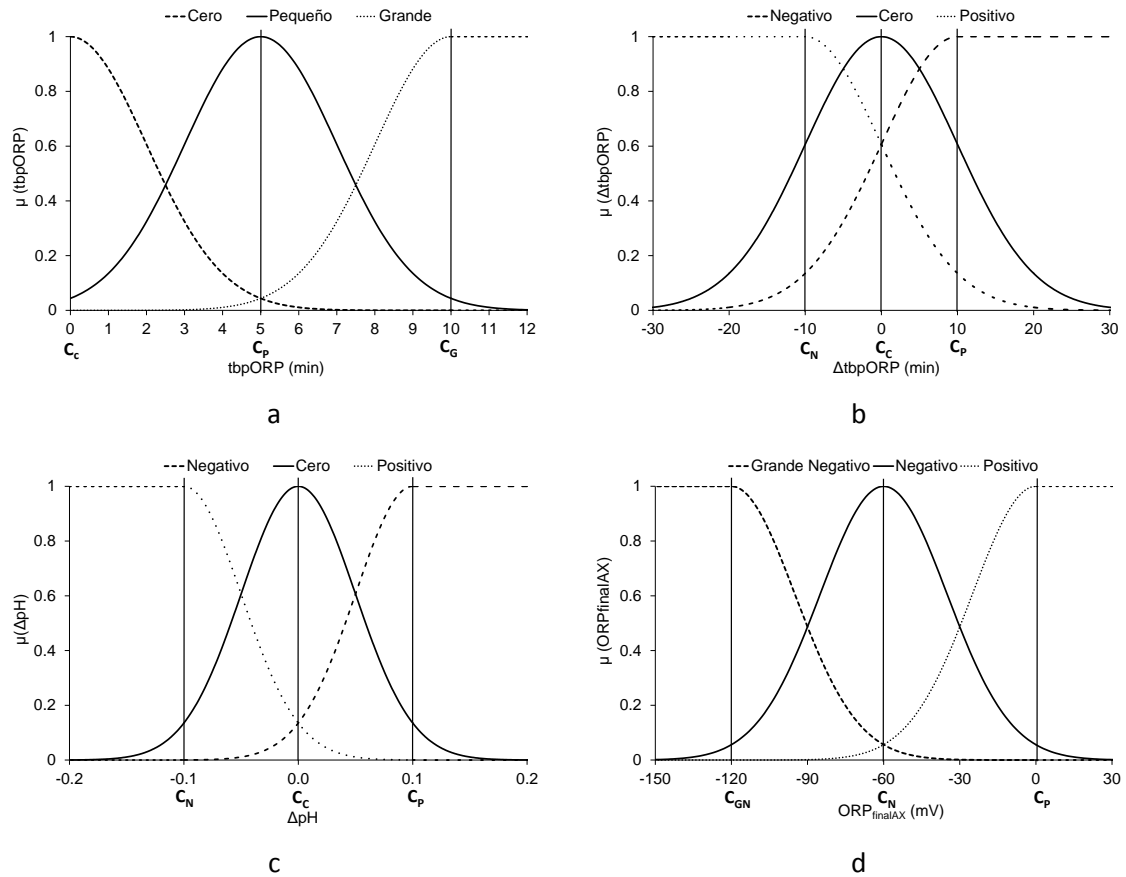


Figura 4.44. Funciones de pertenencia para las variables de entrada al sistema de control: a) $tbpORP$; b) $\Delta tbpORP$; c) ΔpH ; d) $ORP_{finalAX}$.

III. Inferencia. Esta etapa corresponde con el conocimiento técnico que se tiene acerca del funcionamiento del proceso y que en este caso fue adquirido a lo largo de tres años de experimentación y cuatro meses de la etapa de monitorización. A partir de las variables difusas de entrada se obtiene el valor de la variable difusa de salida, que en nuestro caso es el incremento de la dosis de materia orgánica $\mu(\Delta Vd)$. Las cinco etiquetas lingüísticas definidas para la variable $\mu(\Delta Vd)$ se muestran a continuación:

- $\mu(\Delta Vd)_{GN}$: Incremento de la dosis de metanol Grande Negativo.
- $\mu(\Delta Vd)_{PN}$: Incremento de la dosis de metanol Pequeño Negativo.
- $\mu(\Delta Vd)_C$: Incremento de la dosis de metanol Cero.
- $\mu(\Delta Vd)_{PP}$: Incremento de la dosis de metanol Pequeño Positivo.
- $\mu(\Delta Vd)_{GP}$: Incremento de la dosis de metanol Grande Positivo.

La base del conocimiento corresponde con:

a) **Base de datos.** La base de datos contiene el valor de los parámetros de centro (c) y ancho (σ) que definen las funciones de pertenencia de las etiquetas lingüísticas descritas en la etapa de fuzzificación (Tablas 4.11 y 4.12). Asimismo, contiene información acerca del valor de los centros (c) de las variables difusas de salida (ΔVd). Este último aspecto se describe ampliamente en la sección de desfuzzificación.

Los valores inicialmente establecidos para la puesta en marcha del sistema de control corresponden con la información recopilada y analizada durante la etapa de monitorización del proceso, discutida en el apartado 4.3.1. A pesar de que el análisis realizado durante la etapa de monitorización fue exhaustivo, esta base de datos podría tener que actualizarse ocasionalmente, debido a variaciones en las condiciones de operación del proceso y calidad del agua afluente. Por tanto, estos parámetros podrán ser ajustados más finamente durante la fase de validación del sistema de control, así como ajustados periódicamente durante la operación del proceso con el sistema de control activo.

b) **Base de reglas.** Consiste en una serie de reglas lingüísticas que determinan la estrategia de control de la dosificación de materia orgánica externa al inicio de la etapa anóxica. Estas reglas de operación se desarrollaron mediante sentencias basadas en el conocimiento técnico (*know-how*) del proceso. Las reglas son escritas de forma sencilla y permiten ser modificadas con cierta facilidad, añadiendo o eliminando reglas, dependiendo de la información que se disponga sobre las características del proceso y su evolución en el tiempo. Las reglas lingüísticas que se desarrollaron para esta aplicación se resumen en la Tabla 4.13.

La metodología de inferencia utilizada para evaluar las reglas de control corresponde con el procedimiento *Max-Prod* propuesto por Larsen (1980). De acuerdo con este procedimiento, descrito en el apartado introductorio de este documento de tesis doctoral, se aplican las Ecuaciones 1.13 y 1.14 para la evaluación de las reglas consignadas en la Tabla 4.13

A continuación se presentan los grados de pertenencia de cada una de las etiquetas lingüísticas definidas para la variable difusa de salida, que en nuestro caso es el incremento de la dosis de materia orgánica $\mu(\Delta Vd)$:

Tabla 4.13. Reglas lingüísticas definidas para el sistema de control de la dosificación de materia orgánica externa.

Regla	
1	<i>Si</i> ΔpH Negativo y <i>tbpORP</i> Cero y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Cero ($\mu(\Delta Vd)_C$)
2	<i>Si</i> ΔpH Negativo y <i>tbpORP</i> Cero y $ORP_{finalAX}$ Pequeño Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Pequeño Positivo ($\mu(\Delta Vd)_{PP}$)
3	<i>Si</i> ΔpH Negativo y <i>tbpORP</i> Cero y $ORP_{finalAX}$ Positivo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Grande Positivo ($\mu(\Delta Vd)_{GP}$)
4	<i>Si</i> ΔpH Negativo y <i>tbpORP</i> Pequeño y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Pequeño Negativo ($\mu(\Delta Vd)_{PN}$)
5	<i>Si</i> ΔpH Negativo y <i>tbpORP</i> Pequeño y $\Delta tbpORP$ Positivo y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Grande Negativo ($\mu(\Delta Vd)_{GN}$)
6	<i>Si</i> ΔpH Negativo y <i>tbpORP</i> Grande y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Grande Negativo ($\mu(\Delta Vd)_{GN}$)
7	<i>Si</i> ΔpH Cero y <i>tbpORP</i> Cero y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Cero ($\mu(\Delta Vd)_C$)
8	<i>Si</i> ΔpH Cero y <i>tbpORP</i> Cero y $ORP_{finalAX}$ Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Pequeño Positivo ($\mu(\Delta Vd)_{PP}$)
9	<i>Si</i> ΔpH Cero y <i>tbpORP</i> Cero y $ORP_{finalAX}$ Positivo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Grande Positivo ($\mu(\Delta Vd)_{GP}$)
10	<i>Si</i> ΔpH Cero y <i>tbpORP</i> Pequeño y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Pequeño Negativo ($\mu(\Delta Vd)_{PN}$)
11	<i>Si</i> ΔpH Cero y <i>tbpORP</i> Pequeño y $\Delta tbpORP$ Positivo y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Grande Negativo ($\mu(\Delta Vd)_{GN}$)
12	<i>Si</i> ΔpH Cero y <i>tbpORP</i> Grande y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Grande Negativo ($\mu(\Delta Vd)_{GN}$)
13	<i>Si</i> ΔpH Positivo y <i>tbpORP</i> Cero y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Pequeño Positivo ($\mu(\Delta Vd)_{PP}$)
14	<i>Si</i> ΔpH Positivo y <i>tbpORP</i> Cero y $ORP_{finalAX}$ Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Grande Positivo ($\mu(\Delta Vd)_{GP}$)
15	<i>Si</i> ΔpH Positivo y <i>tbpORP</i> Pequeño y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Pequeño Negativo ($\mu(\Delta Vd)_{PN}$)
16	<i>Si</i> ΔpH Positivo y <i>tbpORP</i> Grande y $ORP_{finalAX}$ Grande Negativo Entonces incremento del volumen de materia orgánica a dosificar es Grande Negativo ($\mu(\Delta Vd)_{GN}$)

- De las reglas 5, 6, 11, 12 y 16 se obtiene el valor de la etiqueta lingüística Grande Negativo:

$$\mu(\Delta Vd)_{GN} : \max(\mu(\Delta Vd)_{GN(5)}, \mu(\Delta Vd)_{GN(6)}, \mu(\Delta Vd)_{GN(11)}, \mu(\Delta Vd)_{GN(12)}, \mu(\Delta Vd)_{GN(16)})$$

$$\begin{aligned} \mu(\Delta Vd)_{GN(5)} &= \mu(\Delta pH)_N \cdot \mu(tbpORP)_P \cdot \mu(\Delta tbpORP) \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \\ \text{donde: } \mu(\Delta Vd)_{GN(6)} &= \mu(\Delta pH)_N \cdot \mu(tbpORP)_G \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \\ \mu(\Delta Vd)_{GN(11)} &= \mu(\Delta pH)_C \cdot \mu(tbpORP)_P \cdot \mu(\Delta tbpORP)_P \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \\ \mu(\Delta Vd)_{GN(12)} &= \mu(\Delta pH)_C \cdot \mu(tbpORP)_G \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \\ \mu(\Delta Vd)_{GN(16)} &= \mu(\Delta pH)_P \cdot \mu(tbpORP)_G \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \end{aligned}$$

- De las reglas 4, 10 y 15 se obtiene el valor de la etiqueta lingüística Pequeño Negativo:

$$\mu(\Delta Vd)_{PN} : \max(\mu(\Delta Vd)_{PN(4)}, \mu(\Delta Vd)_{PN(10)}, \mu(\Delta Vd)_{PN(15)})$$

$$\begin{aligned} \mu(\Delta Vd)_{PN(4)} &= \mu(\Delta pH)_N \cdot \mu(tbpORP)_P \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \\ \text{donde: } \mu(\Delta Vd)_{PN(10)} &= \mu(\Delta pH)_C \cdot \mu(tbpORP)_P \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \\ \mu(\Delta Vd)_{PN(15)} &= \mu(\Delta pH)_P \cdot \mu(tbpORP)_P \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \end{aligned}$$

- De las reglas 1 y 7 se obtiene el valor de la etiqueta lingüística Cero:

$$\mu(\Delta Vd)_C : \max((\mu(\Delta Vd)_{C(1)}, \mu(\Delta Vd)_{C(7)})$$

$$\begin{aligned} \mu(\Delta Vd)_{C(1)} &= \mu(\Delta pH)_N \cdot \mu(tbpORP)_C \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \\ \text{donde: } \mu(\Delta Vd)_{C(7)} &= \mu(\Delta pH)_C \cdot \mu(tbpORP)_C \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \end{aligned}$$

- De las reglas 2, 8 y 13 se obtiene el valor de la etiqueta lingüística Pequeño Positivo:

$$\mu(\Delta Vd)_{PP} : \max((\mu(\Delta Vd)_{PP(2)}, \mu(\Delta Vd)_{PP(8)}, \mu(\Delta Vd)_{PP(13)})$$

$$\begin{aligned} \mu(\Delta Vd)_{PP(2)} &= \mu(\Delta pH)_N \cdot \mu(tbpORP)_C \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{PN} \\ \text{donde: } \mu(\Delta Vd)_{PP(8)} &= \mu(\Delta pH)_C \cdot \mu(tbpORP)_C \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{N} \\ \mu(\Delta Vd)_{PP(13)} &= \mu(\Delta pH)_P \cdot \mu(tbpORP)_C \cdot \mu(ORP_{finalAX})_{GN} \end{aligned}$$

- De las reglas 3, 9 y 14 se obtiene el valor de la etiqueta lingüística Grande Positivo:

$$\mu(\Delta Vd)_{GP} : \max((\mu(\Delta Vd)_{GP(3)}, \mu(\Delta Vd)_{GP(9)}, \mu(\Delta Vd)_{GP(14)})$$

$$\begin{aligned} \mu(\Delta Vd)_{GP(3)} &= \mu(\Delta pH)_N \cdot \mu(tbpORP)_C \cdot \mu(ORP_{finalAX})_P \\ \text{donde: } \mu(\Delta Vd)_{GP(9)} &= \mu(\Delta pH)_C \cdot \mu(tbpORP)_C \cdot \mu(ORP_{finalAX})_P \\ \mu(\Delta Vd)_{GP(14)} &= \mu(\Delta pH)_P \cdot \mu(tbpORP)_C \cdot \mu(ORP_{finalAX})_N \end{aligned}$$

IV. Defuzzificación. En esta etapa la variable difusa de salida “incremento de la dosis de materia orgánica $\mu(\Delta Vd)$ ” es convertida a la variable física de salida (ΔVd) del sistema de control, que corresponde con el valor concreto del incremento de la dosis de materia orgánica al inicio de la etapa anóxica respecto del ciclo de operación previo, lo que puede ser un aumento o disminución de la dosificación realizado sobre la cantidad de materia orgánica dosificada en el ciclo previo.

Para realizar esta transformación se empleó el método de la media difusa. En este método sólo se emplean los valores de los centros (c) de cada etiqueta lingüística definida para la variable difusa de salida. En la Figura 4.45 se encuentran representados los centros de las etiquetas lingüística de defuzzificación definidas como: C_{GN} , C_{PN} , C_C , C_{PP} , C_{GP} .

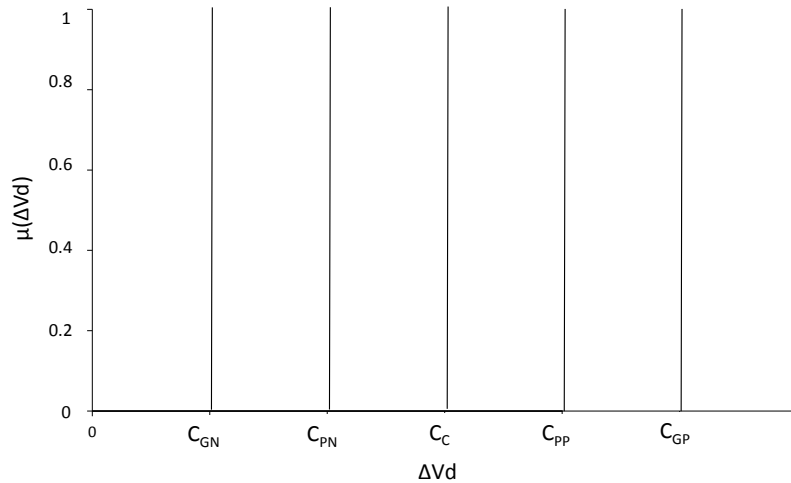


Figura 4.45. Centros (C) de las etiquetas lingüísticas de desfuzzificación.

Aplicando la Ecuación 1.16 (definida en el apartado introductorio 1.3.1) a los valores obtenidos en la etapa de inferencia se obtiene la siguiente expresión:

$$\Delta Vd = \frac{c_{GN} \cdot \mu(\Delta Vd)_{GN} + c_{PN} \cdot \mu(\Delta Vd)_{PN} + c_C \cdot \mu(\Delta Vd)_C + c_{PP} \cdot \mu(\Delta Vd)_{PP} + c_{GP} \cdot \mu(\Delta Vd)_{GP}}{\mu(\Delta Vd)_{PN} + \mu(\Delta Vd)_{GN} + \mu(\Delta Vd)_C + \mu(\Delta Vd)_{PP} + \mu(\Delta Vd)_{GP}}$$

V. Salida física del sistema de control. En esta etapa la variable física de salida obtenida en la etapa de desfuzzificación (ΔVd) es utilizada para calcular la cantidad de materia orgánica a dosificar, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$Vd = Vd_{CA} + \Delta Vd \quad 4.14$$

donde:

Vd volumen de materia orgánica a dosificar en el ciclo actual.

Vd_{CA} volumen de materia orgánica dosificado en el ciclo anterior.

ΔVd incremento de la dosis de materia orgánica.

Por si ocurriera algún fallo durante todo el proceso de cálculo se ha establecido un criterio de seguridad consistente en limitar el valor del volumen de materia orgánica a dosificar (Vd) entre un valor mínimo y un valor máximo, de forma que si la salida del sistema de control no perteneciera a este intervalo fijado, se procedería a dosificar en el ciclo actual la misma cantidad de materia orgánica dosificada en el ciclo de operación previo.

4.2.3.3 Implementación de la estrategia de control

Una vez desarrollada la estrategia de control se procedió a su implementación en el ordenador del montaje experimental mediante su programación en el entorno *Visual Basic.Net*. La programación consistió en articular de manera lógica y secuencial los dos módulos que integran el sistema de control: ajuste automático de la duración de las etapas aerobia y anóxica, y optimización de la dosificación de materia orgánica

En la Figura 4.46 se encuentra representado el esquema de la estrategia de control desarrollada para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito. En esta figura se puede observar la secuencia de operación y el procedimiento de cálculo y evaluación de los parámetros definidos para el sistema de control.

De manera general, el módulo de ajuste automático de la duración de las etapas aerobia y anóxica se estableció de la siguiente manera:

- La etapa aerobia finaliza cuando al menos una de las siguientes condiciones se lleve a cabo: el pH del licor mezcla del reactor inferior al *pH mínimo* (pH_{\min}); la duración de la etapa aerobia superior al *tiempo máximo de la etapa aerobia en un ciclo* ($t_{\max Ae}$); y la *media de la pendiente móvil del pH* (pH_{AMS}) superior al *valor de referencia para la finalización de la etapa aerobia* ($EPpH_{AMS}$).
- La etapa anóxica finaliza cuando al menos una de las siguientes condiciones se lleve a cabo: el pH del licor mezcla del reactor superior al *pH máximo* (pH_{\max}); la duración de la etapa anóxica superior al *tiempo máximo de la etapa anóxica en un ciclo* ($t_{\max Ax}$); y la *pendiente móvil del pH* (pH_{MS}) inferior al *valor de referencia para la finalización de la etapa anóxica* ($EPpH_{MS}$).

Por otro lado, la acción del módulo de optimización de la dosificación de materia orgánica se estableció al inicio de la etapa anóxica (Figura 4.46), instante en el cual se realiza la dosificación de la materia orgánica necesaria para llevar a cabo la desnitrificación del nitrito producido durante la etapa aerobia previa. Tal y como se comentó en el apartado 4.2.3.2, el sistema de control emplea como variables de entrada: t_{bp} , Δt_{bp} , ΔpH , $ORP_{finalAx}$, obtenidas del análisis de la información procedente de los sensores de pH y potencial redox instalados en el reactor; y presenta como variable de salida el incremento de la dosificación de materia orgánica (ΔVd) a realizar sobre la cantidad dosificada al inicio de la etapa anóxica en el ciclo previo de operación.

Las consideraciones generales de operación del proceso proceden del estudio sobre el efecto de los factores ambientales y de operación sobre los organismos AOB descrito en el apartado 4.1.2, y del seguimiento al proceso durante la etapa de monitorización descrita en el apartado 4.3.1. Los parámetros que integran el algoritmo de control desarrollado se clasifican en: parámetros de seguridad, parámetros de cálculo interno y parámetros del algoritmo de control basado en lógica difusa. En la Tabla 4.14 se encuentran recogidos los valores de los parámetros de seguridad y de cálculo interno empleados en el sistema de control desarrollado.

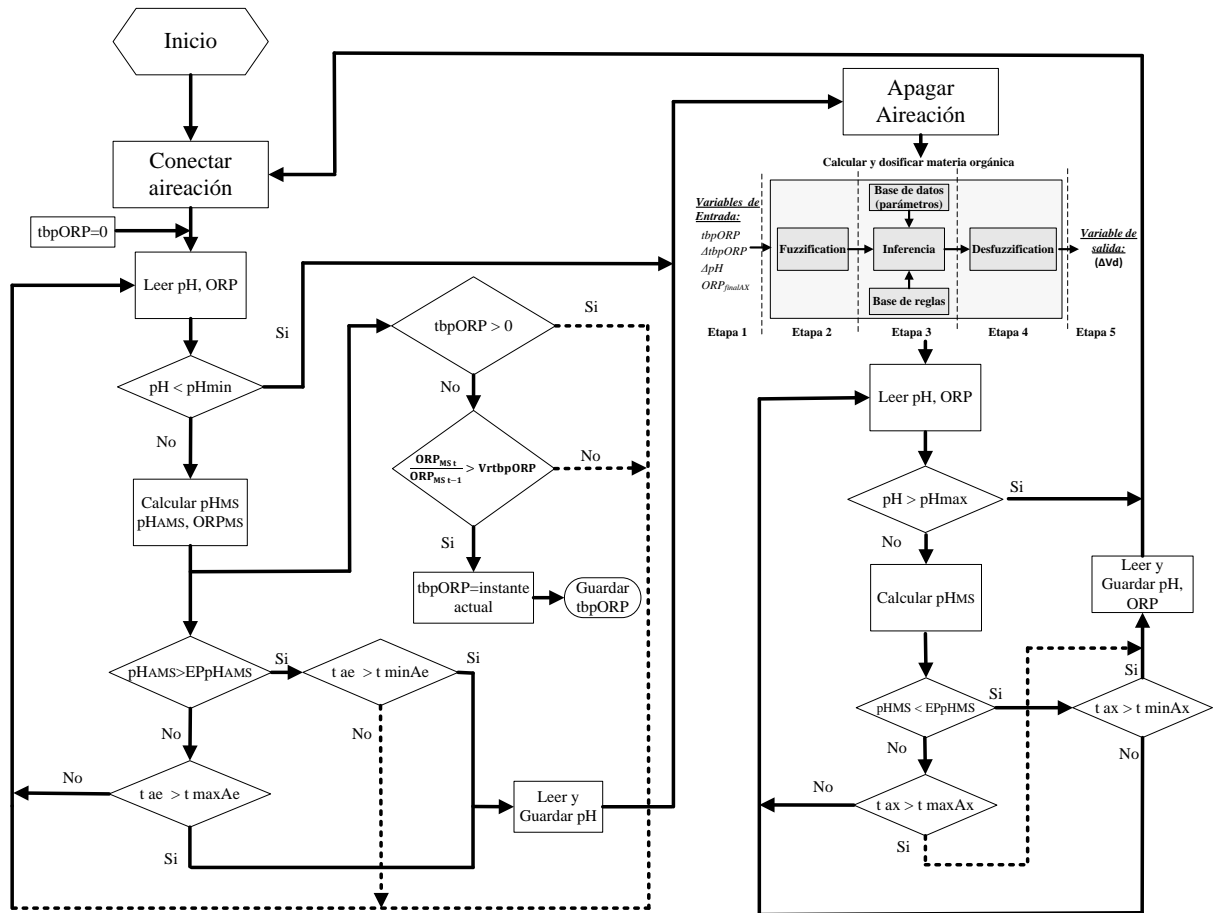
Tabla 4.14. Valores de los parámetros de seguridad y de cálculo interno empleados en el sistema de control del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.

Parámetros de Seguridad	Valor	Unidades
Tiempo mínimo de la etapa aerobia en un ciclo ($t_{\min Ae}$)	30	Minutos
Tiempo máximo de la etapa aerobia en un ciclo ($t_{\max Ae}$)	240	Minutos
Tiempo mínimo de la etapa anóxica en un ciclo ($t_{\min Ax}$)	30	Minutos
Tiempo máximo de la etapa anóxica en un ciclo ($t_{\max Ax}$)	240	Minutos
pH mínimo (pH_{\min})	6.0	
pH máximo (pH_{\max})	8.5	
Parámetros de cálculo interno	Valor	
Número de valores para calcular la pendiente móvil del pH	15	
Número de valores para calcular el promedio de pendiente móvil pH	15	
Número de valores para calcular la pendiente móvil del potencial redox	5.0	
Valor de referencia para la finalización de la etapa aerobia ($EPpH_{AMS}$)	-0.5	
Valor de referencia para la finalización de la etapa anóxica, ($EPpH_{MS}$)	0.0	
Valor de referencia para identificar y calcular el t_{bpORP} , (Vr_{tbpORP})	1.05	

Parámetros de Seguridad

Se estableció un tiempo mínimo (t_{\min}) y un tiempo máximo (t_{\max}) para la duración de las etapas aerobias y anóxicas. El t_{\min} corresponde con el tiempo mínimo necesario para obtener datos de entrada al sistema de control que permitan realizar los cálculos para el control automático de la duración de las etapas aerobia y anóxica (apartado 4.3.2.1), y para la optimización de la dosificación de materia orgánica (apartado 4.3.2.2). El t_{\max} corresponde con el tiempo máximo en el que el proceso debería permanecer en una determinada etapa, asegurando de esta manera la alternancia de etapas.

Por otro lado, se estableció un intervalo de pH para evitar inhibiciones ocasionadas tanto por pH como por ácido nitroso (HNO_2). El pH mínimo (pH_{\min}) y el pH máximo (pH_{\max}) se establecieron en 6.0 y 8.5, respectivamente. Tal y como se puede observar en la Figura 4.47, en caso de que el pH alcance el pH_{\min} en condiciones aerobias la aireación se desconecta, dando así inicio a la etapa anóxica; mientras que si el pH alcanza el pH_{\max} en condiciones anóxicas la aireación se pondría en marcha, dando así inicio a la etapa aerobia en un nuevo ciclo de operación.



Nomenclatura:

pH_{min} : pH mínimo.

pH_{max} : pH máximo.

t_{ae} : Duración de la etapa aerobia

t_{ax} : Duración de la etapa anóxica

t_{maxAe} : Duración máxima de la etapa aerobia.

t_{minAe} : Duración mínima de la etapa aerobia.

t_{maxAx} : Duración máxima de la etapa anóxica.

t_{minAx} : Duración mínima de la etapa anóxica.

pH_{MS} : Pendiente móvil de pH.

pH_{AMS} : Media de la pendiente móvil de pH.

ORP_{MS} : Pendiente móvil del potencial redox.

$ORP_{MS t}$: Valor de la pendiente móvil del potencial redox calculado en el instante (t).

$ORP_{MS t-1}$: Valor de la pendiente móvil del potencial redox calculado en el instante anterior (t-1).

$EPpH_{AMS}$: Valor de corte en el perfil de pH_{AMS} para la finalización de la etapa aerobia.

$EPpH_{MS}$: Valor de corte en el perfil de pH_{MS} para la finalización de la etapa anóxica.

$tbpORP$: Tiempo transcurrido entre el inicio de la etapa aerobia y el momento en el que se produce el punto de inflexión en el perfil del potencial redox.

$VrtbpORP$: Valor de referencia para identificar si se ha producido un punto de inflexión en el perfil de potencial redox y calcular el $tbpORP$.

Figura 4.46. Esquema de la estrategia de control para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.

Parámetros de Cálculo interno

Estos parámetros corresponden con el número de valores de pH y potencial redox empleados para calcular las variables de entrada empleadas en el sistema de control, como son: pH_{MS} , pH_{AMS} , ORP_{MS} . También se incluyen aquí los valores de referencia empleados como criterio para determinar la finalización de las etapas aerobia (EPpH_{AMS}) y anóxica (EPpH_{MS}) respectivamente, así como el valor de referencia utilizado para detectar si se ha producido un punto de inflexión en el perfil del potencial redox (lo que indicaría un exceso de materia orgánica en el ciclo anterior) y calcular el $tbpORP$ ($VrtbpORP$). Todos los valores de referencia fueron determinados tras el análisis de numerosos ciclos de operación.

En la Figura 4.47 se muestra la pantalla principal del *software* desarrollado para implementar el sistema de control, a partir de la cual se permite de manera sencilla e intuitiva la introducción y modificación de los valores de los parámetros del sistema de control.

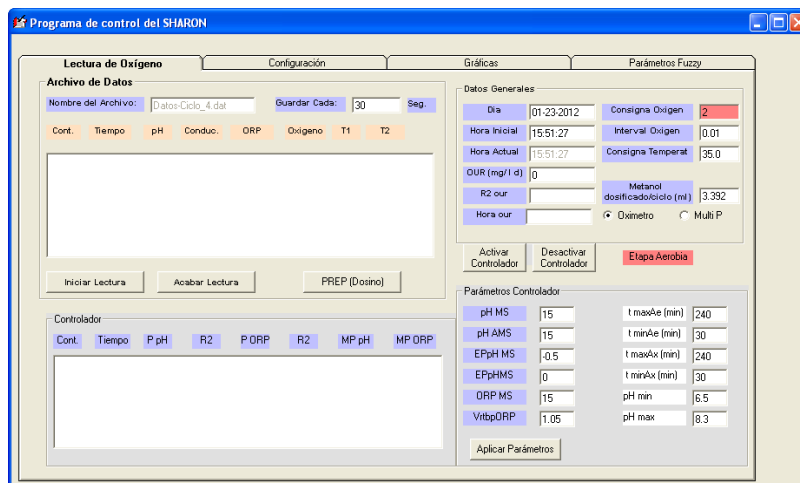


Figura 4.47. Interfaz del sistema de control desarrollado a partir de la cual se introducen y modifican los valores de los parámetros del sistema de control desarrollado para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.

Parámetros del algoritmo de control basado en lógica difusa

Estos parámetros integran las variables difusas de entrada y salida del algoritmo de control desarrollado para optimizar la dosificación de materia orgánica, y que se corresponden con las etapas de fuzzificación y desfuzzificación, respectivamente. En las Tablas 4.15 y 4.16 se encuentran recogidos los valores de los parámetros de fuzzificación y desfuzzificación empleados en este trabajo de tesis doctoral. Estos parámetros fueron determinados a partir del conocimiento técnico del proceso adquirido durante las fases de experimentación y monitorización del proceso.

Tabla 4.15. Valores de los parámetros de fuzzificación del sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.

Parámetros de Fuzzificación					
tbp					
$\mu(\text{tbp})\text{C}$		$\mu(\text{tbp})\text{P}$		$\mu(\text{tbp})\text{G}$	
C_C	σ_C	C_P	σ_P	C_G	σ_G
0	2	5	2	10	2
Δtbp					
$\mu(\Delta\text{tbp})\text{N}$		$\mu(\Delta\text{tbp})\text{C}$		$\mu(\Delta\text{tbp})\text{P}$	
C_N	σ_N	C_C	σ_C	C_P	σ_P
-10	10	0	10	10	10
ΔpH					
$\mu(\Delta\text{pH})\text{N}$		$\mu(\Delta\text{pH})\text{C}$		$\mu(\Delta\text{pH})\text{P}$	
C_N	σ_N	C_C	σ_C	C_P	σ_P
-0.1	0.05	0	0.05	0.1	0.05
ORP_{finalAX}					
$\mu(ORP_{\text{finalAX}})\text{GN}$		$\mu(ORP_{\text{finalAX}})\text{N}$		$\mu(ORP_{\text{finalAX}})\text{P}$	
C_{GN}	σ_{GN}	C_N	σ_N	C_P	σ_P
-120	25	-60	25	0	25

Tabla 4.16. Valores de los parámetros de desfuzzificación del sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.

Parámetros de Desfuzzificación				
ΔVd				
$\mu(\Delta\text{Vd})\text{GN}$	$\mu(\Delta\text{Vd})\text{PN}$	$\mu(\Delta\text{Vd})\text{C}$	$\mu(\Delta\text{Vd})\text{PP}$	$\mu(\Delta\text{Vd})\text{GP}$
C_{GN}	C_{PN}	C_C	C_{PP}	C_{GP}
-0.3	-0.15	0	0.15	0.3

En la Figura 4.48 se puede observar la pantalla del software de control a partir de la cual se introducen y modifican los valores de los parámetros del algoritmo de control basado en lógica difusa para el control de la dosificación de materia orgánica.

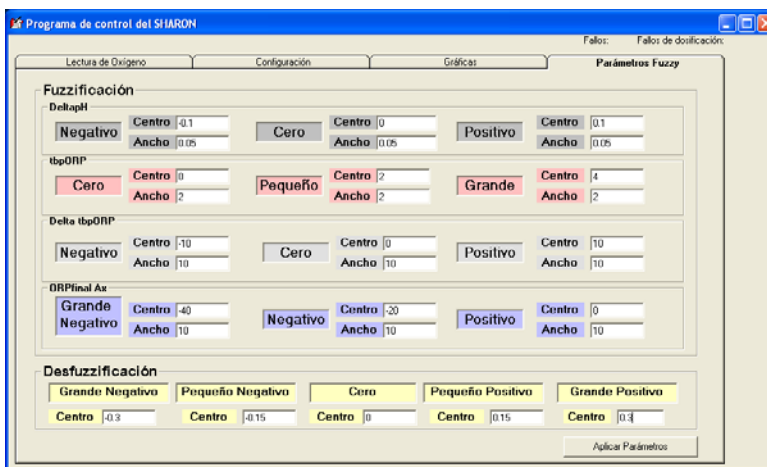


Figura 4.48. Interfaz del sistema de control desarrollado a partir de la cual se introducen y modifican los valores de los parámetros difusos del control de la dosificación de materia orgánica en el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.

4.2.3.4 Validación del sistema de control

Tras la implementación del sistema de control desarrollado se procedió a su validación mediante el funcionamiento en continuo del reactor SHARON en diferentes situaciones de operación, en las que se evaluó el estado de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito, y se acabaron de afinar los valores de los parámetros del algoritmo de control.

La fase de validación del sistema de control tuvo una duración de diez meses divididos en nueve períodos de operación. Durante esta fase se llevó a cabo el análisis del funcionamiento del sistema de control en las condiciones de operación indicadas en la Tabla 4.17.

Durante los períodos I y II se procedió a realizar un análisis comparativo del funcionamiento del proceso sin sistema de control (período I) y con sistema de control (período II).

En el período III se procedió a determinar la respuesta del sistema de control ante variaciones del caudal afluente al proceso a lo largo de un día de operación. En este período el proceso operó diariamente de la siguiente manera: 12 horas a 1.5 L d^{-1} y 12 horas a 0.5 L d^{-1} .

Durante el período IV se mantuvo las mismas variaciones de caudal que en el período anterior (Período III), y se desconectó el sistema de control operando el proceso con duración de las etapas fija y dosis de metanol constante. Se tomó como base los valores medios de las duraciones de las etapas aerobia y anóxica y de la dosis de metanol obtenidos durante el período III.

Durante los períodos V, VI, VII y VIII se procedió a variar la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluente al proceso. Estos cambios en la concentración de nitrógeno amoniacal fueron bruscos con el objetivo de evaluar la respuesta del sistema de control ante variaciones repentinas de amonio en la corriente afluente al proceso SHARON. Si bien es cierto que la composición del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos suele ser estable en el tiempo, es importante conocer cual sería la respuesta del sistema de control en el caso en que llegará a ocurrir, y por tanto, es importante en este tipo de situaciones establecer un protocolo para afinar los parámetros de seguridad y del algoritmo de control desarrollado para la dosificación de materia orgánica.

En estos ocho primeros períodos se empleó como corriente afluente sobrenadante sintético de la deshidratación de fangos digeridos anaeróbicamente preparado en el laboratorio. Por otro lado, en el período IX se empleó como corriente afluente sobrenadante de la deshidratación de fango digerido anaeróbicamente procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet

(Valencia). En la Tabla 4.18 se encuentran las características de las corrientes de agua residual empleadas en la validación del sistema de control.

Tabla 4.17. Condiciones experimentales evaluadas en la validación del sistema de control para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.

Período	Sistema de control activado	Tiempo	Sobrenadante		Caudal afluente
		(días)	Tipo	Concentración NH_4^+ (mg N L^{-1})	(L d^{-1})
I	no	0-44	Sintético	400	1
II	si	45-77	Sintético	400	1
III	si	78-121	Sintético	400	1.5-0.5 ^a
IV	no	122-147	Sintético	400	1.5-0.5 ^a
V	si	148-156	Sintético	400	1
VI	si	157-189	Sintético	450	1
VII	si	190-210	Sintético	550	1
VIII	si	211-220	Sintético	350	1
IX	si	221-300	EDAR Carraixet	615±90	2

^a Variación durante el día: 12 horas a 1.5 L d^{-1} y 12 horas a 0.5 L d^{-1}

Tabla 4.18. Características de las corrientes de agua residual empleadas en la validación del sistema de control para el proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito.

Parámetros	Sobrenadante de la deshidratación de fangos digerido anaeróbicamente:		
	Preparado en el Laboratorio	Procedente de la EDAR Carraixet (Valencia)	
	Valor	Valor promedio	n
Materia orgánica (mg DQO L^{-1})	0	150±10	20
NH_4^+ (mg N L^{-1})	350-550 ^a	615±90	20
NO_2^- (mg N L^{-1})	0	0.1	20
NO_3^- (mg N L^{-1})	2	3.6±3.0	20
PO_4^{3-} (mg P L^{-1})	5	12±1	20
Alcalinidad ($\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	1400-2200 ^a	2700±600	20
pH	7.6-7.8	7.7±0.1	20
Sólidos suspendidos totales (mg L^{-1})	0	134±50	20
Sólidos suspendidos volátiles (mg L^{-1})	0	75±18	20

^a Concentraciones modificadas a lo largo de cada período experimental evaluado en la validación del sistema de control: Desde el período I hasta el período VIII.

En la Figura 4.49 se encuentra representada la evolución de la concentración de los compuestos nitrogenados en las corrientes afluente y efluente del proceso SHARON durante los nueve períodos que integran la fase de validación del sistema de control. Tal y como se muestra en esta figura, en prácticamente todos los períodos de validación del sistema de control se obtuvieron porcentajes altos de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito (>95%). Las concentraciones de nitrato alcanzadas estuvieron, en casi todos los casos, por debajo de $1 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. En los siguientes apartados se explican más detalladamente cada uno de los períodos evaluados.

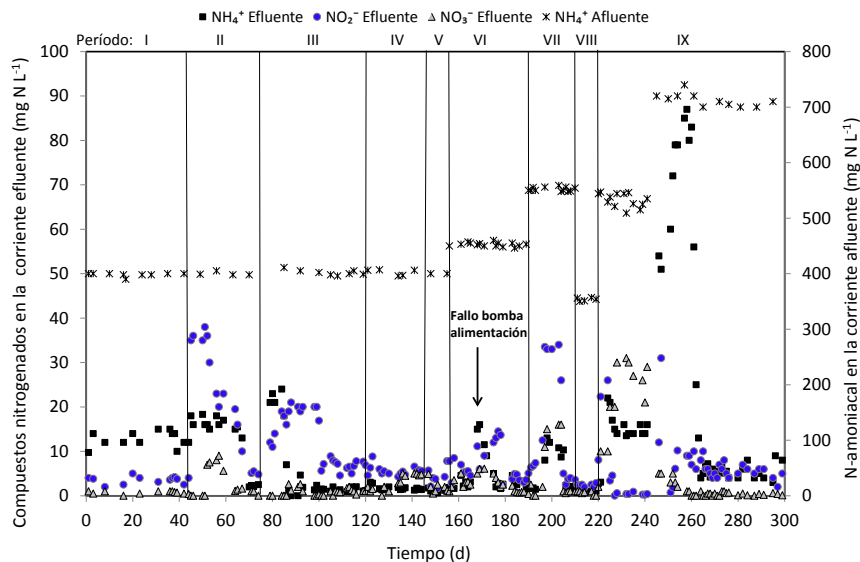


Figura 4.49. Evolución de las concentraciones de los compuestos nitrogenados medidos en las corrientes afluente y efluente del proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito durante la validación del sistema de control.

- **Validación empleando sobrenadante sintético de la deshidratación de fangos digerido anaeróbicamente.**

I) Puesta en marcha del sistema de control

Durante el Período I el proceso SHARON fue operado sin sistema de control, es decir, con dosificación de materia orgánica constante (50 mg DQO L^{-1}) y con duraciones de las etapas aerobia y anóxica fijas, establecidas de la siguiente manera: ciclos de operación de 4 horas (6 ciclos por día) en los que durante 2 horas el proceso se operaba en condiciones aerobias (50% tiempo total del ciclo) y 2 horas en las que el proceso se operaba en condiciones anóxicas (50% tiempo total del ciclo). Tal y como muestra la Figura 4.49, a lo largo del Período I la concentración de nitrógeno amoniaco en el efluente del proceso se mantuvo relativamente estable en valores en torno a 15 mg N L^{-1} , dando como resultado un porcentaje de eficiencia de eliminación de nitrógeno amoniaco próximo al 95%. La operación estable del proceso durante este período fue debida a que la concentración de nitrógeno amoniaco y el caudal de la corriente afluente al proceso fueron constantes, así como las condiciones de operación del reactor (duración de las etapas, temperatura, dosificación de materia orgánica).

Tras la implementación del sistema de control (Período II) la concentración de nitrógeno amoniaco medida en la corriente efluente del proceso presentó un incremento leve (hasta $17 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$), y que se alcanzaron concentraciones de nitrito en torno a $35 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ y nitrato en torno a $10 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$, tal y como se puede observar en la Figura 4.49. Esta situación planteó la necesidad de redefinir los parámetros de fuzzificación asignados a la

variable de entrada $ORP_{finalAX}$, modificando los centros de las etiquetas lingüísticas Grande Negativo y Negativo. En la Tabla 4.19 se encuentran los valores redefinidos de los centros y anchos de la variable de entrada al controlador $ORP_{finalAX}$, que se aplicaron al sistema de control a partir del día 56 (Figura 4.49). A partir de las modificaciones realizadas al sistema de control se observó una clara reducción del nitrito y del nitrato acumulado en el reactor, llegando a concentraciones de nitrito y nitrato de $5 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ y $1 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 4.19. Valores de los parámetros de fuzzificación de la variable de entrada $ORP_{finalAX}$ para la optimización de la dosificación de materia orgánica.

	$ORP_{finalAX}$					
	$\mu(ORP_{finalAX})_{GN}$		$\mu(ORP_{finalAX})_N$		$\mu(ORP_{finalAX})_P$	
	C_{GN}	σ_{GN}	C_N	σ_N	C_P	σ_P
Valores iniciales	-120	25	-60	25	0	25
Valores redefinidos	-160	25	-80	25	0	25

Comparando los resultados obtenidos tras la implementación del sistema de control con los obtenidos durante la operación con etapas de duración fija y dosificación de materia orgánica constata se observó una reducción considerable de la duración de las etapas aerobias y anóxicas. Los ciclos optimizados correspondientes al final del Período II (días 64 a 77 en Figura 4.49) resultaron en una duración promedio de cada ciclo de operación de 2.9 horas distribuidas de la siguiente manera: 2 horas en condiciones aerobias (69% del tiempo total del ciclo) y 0.9 horas en condiciones anóxicas (31% del tiempo total del ciclo), dando como resultado la ejecución de 8.3 ciclos por día de operación. La duración de cada ciclo de operación se redujo de 4 horas en el Período I a 2.9 horas en el Período II, lo que representa un 27.5%. Tras la implementación del sistema de control la concentración de nitrógeno amoniacal se redujo en el efluente del reactor SHARON desde $12 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ (Período I) a $2 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ (Período II), lo que indica que el porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal se incrementó desde el 95% (Período I) a un 98% (Período II).

Por otro lado, durante el Período I la dosificación de materia orgánica fue de $2100 \text{ mg DQO d}^{-1}$ y durante el Período II esta dosis de materia orgánica se redujo a $1332 \text{ mg DQO d}^{-1}$, por lo que se obtuvieron ahorros en la dosificación de materia orgánica en torno al 36% después de la implementación del sistema de control.

II) Variación del caudal afluente

Durante el Período III se procedió a validar el sistema de control mediante la variación del caudal afluente al proceso, obteniéndose de esta manera un patrón de variación de la carga de nitrógeno a tratar al día. El caudal afluente se varió a lo largo del día de la siguiente manera: 1.5 L d^{-1} durante las 12 primeras horas día que dan como resultado una carga de tratamiento de nitrógeno amoniacal de $600 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ d}^{-1}$, y 0.5 L d^{-1} durante las 12 horas restantes del día dando como resultado una carga de tratamiento de nitrógeno amoniacal de $200 \text{ mg N-NH}_4 \text{ d}^{-1}$.

Durante las 12 primeras horas del día el alto caudal afluente ocasionó una mayor concentración de amonio por nitrificar y de nitrito por desnitrificar, por lo que las duraciones de las etapas aerobia y anóxica se incrementaron. Así mismo, la dosificación de materia orgánica fue mayor durante las primeras 12 horas del día que se corresponden con el alto caudal afluente. Por otro lado, en las 12 horas restantes del día al entrar menos amonio al reactor se produjo menos nitrito, por lo que durante esta parte del día las duraciones de las etapas aerobia y anóxica se redujeron, al igual que la cantidad de materia orgánica dosificada durante estos ciclos.

En los tramos de transición de mayor a menor caudal afluente se determinó una elevada concentración de nitrito y una baja concentración de amonio el licor mezcla del reactor, por lo que el sistema de control actuó reduciendo la duración de la etapa aerobia e incrementando la duración de la etapa anóxica. La elevada concentración de nitrito en el licor mezcla del reactor hizo que la dosificación de materia orgánica fuera mayor. Por otro lado, en el caso de los tramos de transición de menor a mayor caudal afluente se determinó una elevada concentración de amonio y una baja concentración de nitrito en el licor mezcla del reactor, por lo que el sistema de control actuó incrementando la duración de la etapa aerobia y reduciendo la duración de la etapa anóxica. La baja concentración de nitrito ocasionó que el sistema de control dosificara una menor cantidad de materia orgánica durante esta fase de transición.

En la Figura 4.49 se puede observar que al inicio del período III las concentraciones de amonio y nitrito se incrementaron en la corriente efluente del proceso SHARON como consecuencia del patrón dinámico definido para el caudal afluente. Sin embargo, al cabo de pocos días de operación bajo estas condiciones experimentales (día 86) la concentración de nitrógeno amoniacal descendió, debido posiblemente a que la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el reactor aumentó en un 25% durante este período (de $446 \text{ mg SSV L}^{-1}$ paso a $589 \text{ mg SSV L}^{-1}$).

La concentración de nitrito en este momento se situó en torno a 20 mg N-NO₂ L⁻¹, y permaneció constante durante al menos 10 días de operación. Con el objetivo de reducir el nitrito acumulado en el sistema se procedió a incrementar la dosificación de materia orgánica reajustando para el día 98 (Figura 4.49) los centros de los parámetros de desfuzzificación de la incremento de la dosis de materia orgánica (ΔVd). En la Tabla 4.20 se encuentran los valores de los parámetros de desfuzzificación modificados para obtener una mayor dosificación de materia orgánica al inicio de la etapa anóxica de cada ciclo de operación. Después del reajuste realizado en el sistema de control de materia orgánica se alcanzó una la eliminación de nitrógeno amoniacal del 98%.

Tabla 4.20. Valores de los parámetros de desfuzzificación del sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.

	Parámetros de Desfuzzificación				
	ΔVd				
	$\mu(\Delta Vd)GN$	$\mu(\Delta Vd)PN$	$\mu(\Delta Vd)C$	$\mu(\Delta Vd)PP$	$\mu(\Delta Vd)GP$
	C_{GN}	C_{PN}	C_C	C_{PP}	C_{GP}
Valores iniciales	-0.30	-0.15	0.00	0.15	0.30
Valores redefinidos	-0.70	-0.35	0.00	0.35	0.70

En la Figura 4.50 se encuentran representados los perfiles de pH, potencial redox y oxígeno disuelto (OD), así como la materia orgánica dosificada en cada ciclo a lo largo del día 110 de operación. Mediante el seguimiento y análisis de la evolución de estas variables se puede observar la respuesta del sistema de control ante las variaciones del caudal afluente al proceso. Tal y como se muestra la Figura 4.50a, durante las primeras 16 horas del día la duración de las etapas aerobias fue mayor debido a la alta carga de nitrógeno amoniacal entrante. Las 16 horas iniciales corresponden con: 12 horas en las que entraba un alto caudal afluente y 4 horas de tramo de transición de mayor a menor caudal afluente. En esta figura se puede observar como la dosis de materia orgánica fue incrementada gradualmente por el sistema de control durante los siete primeros ciclos de operación.

La Figura 4.50b muestra la evolución, a lo largo del día 110 de operación, del perfil de potencial redox, y la identificación y la cuantificación del *tbpORP* empleado como variable de entrada en el sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.

Tal y como se indicó en el apartado 4.3.2.2, un ΔpH negativo indica que sobra materia orgánica en el proceso, sin embargo en el sistema de control (reglas lingüísticas definidas en la Tabla 4.13, apartado 4.3.2.2) se otorgó mayor peso en la decisión final al valor del potencial redox determinado al final del ciclo anóxico cuando no se detecta *tbpORP*. Es por ello que el sistema de control incrementó la dosificación de materia orgánica durante los siete primeros ciclos de

operación del proceso (Figura 4.50a) debido a que no detectó *tbpORP* y el valor de la variable *ORPfinalAX* al final de cada ciclo fue muy negativo (Figura 4.50b). Después de 17 horas de operación la variación del pH fue menor en respuesta al descenso de la carga de nitrógeno amoniacal. Tal y como se encuentra señalado en Figura 4.51b, se identificaron tres *tbpORP* de diferente duración (12, 13 y 3 minutos) que ocasionaron que la dosificación de materia orgánica descendiera en diferente grado en los últimos ciclos de operación del día 110 (Figura 4.50a).

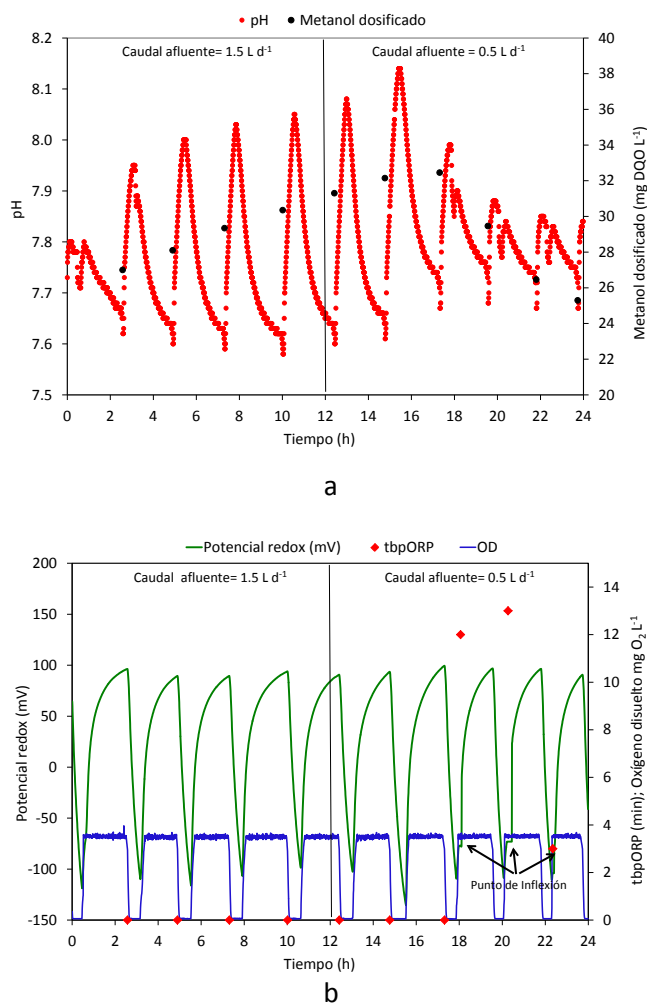


Figura 4.50. Evolución del proceso con sistema de control (día 110 de operación): a) perfil de pH y materia orgánica dosificada, b) perfiles de potencial redox y oxígeno disuelto (OD) y *tbpORP*.

Durante el Período IV se operó el proceso sin sistema de control, utilizando los valores promedio obtenidos durante el Período III para fijar la duración de los ciclos y la dosificación de materia orgánica. Estos valores corresponden con: duraciones de las etapas aerobia y anóxica de 1.9 horas y 0.77 horas, respectivamente, estableciendo la duración de cada ciclo de operación en 2.67 horas (9 ciclos por día). Además, se dosificó en cada ciclo 36.5 mg DQO L⁻¹.

Durante este período se mantuvo la dinámica diaria de la variación del caudal afluente seguida durante el período III. Los resultados obtenidos de la evaluación de este período indicaron que el porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal fue del 98%. Se observó para el día 134 (Figura 4.49) un incremento de la concentración de nitrato en el reactor ($1 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ a $5 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$) debido posiblemente a la prolongada duración de las etapas aerobias durante el tiempo en el que el proceso se encontraba operando con bajo caudal afluente.

La Figura 4.51b muestra la evolución del proceso a lo largo del día 140 de operación, que corresponde al Período IV. Tal y como se observa en la Figura 4.51a, el perfil de pH presentó variaciones similares a las obtenidas en el Período III (Figura 4.51a). Sin embargo, en aquellos ciclos en los que la concentración de nitrito en el licor mezcla fue baja (operación del proceso con caudal afluente bajo) se observó que el pH se mantuvo constante al final de la etapa anóxica, indicando la reducción completa del nitrito antes de la finalización de la etapa anóxica. Esta situación también se observó en el perfil del potencial redox, el cual fue muy negativo en los ciclos en los que el nitrito fue completamente consumido antes de la finalización de la etapa anóxica.

La comparación de la operación del proceso entre los períodos III y IV indicó que la concentración de nitrógeno amoniacal y nitrito en la corriente efluente del reactor SHARON fue prácticamente similar en ambos períodos: $1.5 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ y $6.1 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ en el Período III; $1.7 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$ y $6.0 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ en el Período IV. Sin embargo, se observaron diferencias en la concentración de nitrato en la corriente efluente del reactor: $< 1 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ en el período III y $5 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$ en el período IV. Los resultados obtenidos indican que el sistema de control desarrollado es apto para eliminar el nitrógeno amoniacal vía nitrito frente a variaciones repentinas de la carga afluente al proceso SHARON.

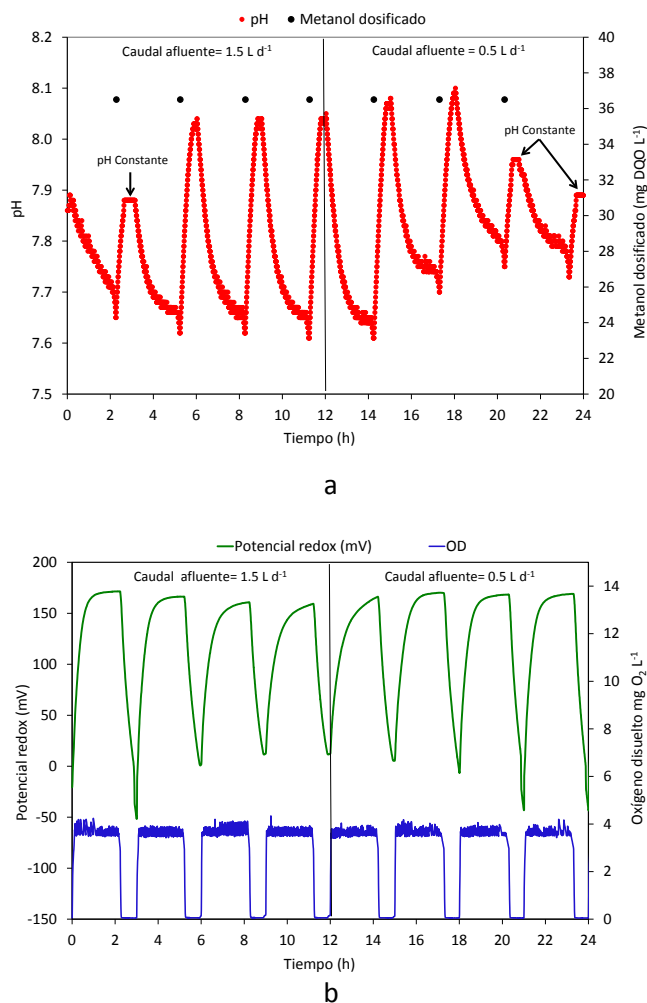


Figura 4.51. Evolución del proceso sin sistema de control (día 140 de operación): a) perfil de pH y materia orgánica dosificada, b) perfiles de potencial redox y oxígeno disuelto (OD).

III) Variación de la concentración de nitrógeno amoniacal

Durante los períodos del V al VIII se realizó la validación del sistema de control variando en cada período la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluente al reactor SHARON. Tal y como muestra la Figura 4.49 durante el Período V la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluente se estableció en 400 mg N L⁻¹, y según los resultados obtenidos, y recogidos en la Tabla 4.21, se puede afirmar que se alcanzó una adecuada eliminación de amonio vía nitrito. Resultados similares fueron obtenidos durante el Período VI, en el que la concentración de nitrógeno amoniacal se incrementó a 450 mg N L⁻¹. Para el día 168 se observa la acumulación de amonio, nitrito e incluso nitrato en la corriente efluente del reactor, alcanzando concentraciones de 16 mg N-NH₄ L⁻¹, 13 mg N-NO₂ L⁻¹ y 6 mg N-NO₃ L⁻¹, respectivamente. Esta acumulación fue ocasionada por un fallo registrado en la bomba de alimentación del reactor, que provocó el cese de la alimentación al proceso durante 12 horas. Tras la sustitución de la bomba de alimentación el sistema de control fue capaz de eliminar los compuestos nitrogenados acumulados, y llevar el proceso nuevamente a una

situación de estabilidad con altos rendimientos de eliminación de nitrógeno amoniacal. En la Figura 4.49 se puede observar que la actuación del sistema de control fue adecuada manteniendo el porcentaje de eliminación de amonio en torno al 98% en ambos períodos experimentales.

Tabla 4.21. Valores promedio de las concentraciones de los compuestos nitrogenados determinadas en la corriente efluente del reactor SHARON en los ciclos estables de operación de los períodos V al VIII en los que se alcanzó un porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito en torno al 98%.

Período	Corriente Afluente	Corriente Efluente		
	N-NH ₄ mg L ⁻¹	N-NH ₄ mg L ⁻¹	N-NO ₂ mg L ⁻¹	N-NO ₃ mg L ⁻¹
V	400	1.0±0.2	3.9±1.5	1.0±0.7
VI	450	2.4±0.8	4.0±0.8	0.8±0.1
VII	550	1.8±0.2	3.8±0.2	1.0±0.1
VIII	350	0.9±0.1	2.4±0.3	0.6±0.4

En el Período VII se incrementó la concentración de nitrógeno amoniacal a 550 mg N L⁻¹ en la corriente afluente al proceso. Este incremento tan brusco de la concentración de amonio, pasando de 450 mg N-NH₄ L⁻¹ en el período anterior a 550 mg N-NH₄ L⁻¹, ocasionó la acumulación de amonio en el reactor SHARON (en torno a 14 mg N-NH₄ L⁻¹). La respuesta del sistema de control fue incrementar la duración de las etapas aerobias para favorecer la eliminación de amonio, e incrementar la dosificación de metanol para reducir el nitrito producido. Para el día 205 (Figura 4.49) se alcanzó una eficiencia de eliminación de nitrógeno amoniacal del 98%. La duración promedio de las etapas aerobia y anóxica, así como la cantidad de metanol dosificado en cada ciclo de operación cuando el proceso estuvo estable y con porcentajes de eliminación de nitrógeno amoniacal en torno al 98% se recogen en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22. Valores promedio de la duración de las etapas aerobia y anóxica, y dosis de metanol en los ciclos estables de operación de los períodos V al VIII en los que se alcanzó un porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito en torno al 98%.

Período	Corriente Afluente N-NH ₄ mg L ⁻¹	Duración Etapa aerobia		Duración Etapa anóxica		Duración Ciclo horas	Metanol dosificado mg DQO d ⁻¹
		horas	%	horas	%		
		V	400	1.92±0.2	72.7		
VI	450	2.02±0.1	74.0	0.71±0.1	26.0	2.73	1910 ± 70
VII	550	2.30±0.1	78.5	0.63±0.1	21.5	2.93	2066 ± 63
VIII	350	1.84±0.2	77.6	0.53±0.1	22.4	2.37	1705 ± 60

En el Período VIII se redujo la concentración de nitrógeno amoniacal a 350 mg N L^{-1} , y en respuesta, el sistema de control redujo la duración de las etapas aerobias y anóxicas, así como la dosis de materia orgánica dosificada en cada ciclo (Tabla 4.22). Mediante la acción del sistema de control se consiguió durante este período que la eliminación de nitrógeno amoniacal fuera del 98%.

Las acciones del sistema de control permitieron ajustar adecuadamente la duración de las etapas aerobia y anóxica, y la dosis de materia orgánica en función de la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente al proceso SHARON. Es así como éstas se incrementaron cuando la concentración de amonio se incrementó, y se redujeron cuando la concentración de amonio se redujo en la corriente afluyente al reactor. Además, el sistema de control fue capaz de actuar frente incrementos en la concentración de los compuestos nitrogenados en el licor mezcla del reactor, ocasionados por fallos operativos.

IV) Validación empleando sobrenadante real de la deshidratación de fangos digerido anaeróticamente (EDAR de la cuenca del Carraixet, Valencia)

Durante el período IX se procedió a evaluar el funcionamiento del sistema de control desarrollado para el proceso SHARON empleando el sobrenadante de la deshidratación del fango digerido anaeróticamente procedente de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia). La idea de emplear este tipo de corriente responde a la necesidad de comprobar el funcionamiento del sistema de control frente a la dinámica y características intrínsecas de la corriente que realmente va a tratar el proceso SHARON cuando esté implementado en una EDAR. La caracterización de esta corriente se encuentra en la Tabla 4.18. Durante este período se decidió incrementar el caudal de tratamiento del proceso a 2 L d^{-1} con el objetivo de forzar la respuesta del sistema de control frente a una carga de tratamiento mayor.

En la Figura 4.49 se puede observar que la concentración de nitrógeno en la corriente afluyente al proceso se situó inicialmente alrededor de $550 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$, y permaneció en torno a este valor durante 20 días de operación (del día 221 al día 241). Durante esta primera parte del período se observó la acumulación de amonio ($14 \text{ mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1}$) y nitrato ($30 \text{ mg N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$) en el reactor. La acumulación de amonio ocasionó que el sistema de control incrementará la duración de los ciclos de operación, y principalmente de la etapa aerobia, para hacer frente a la concentración tan elevada de nitrógeno del afluyente en comparación con el período previo de operación (Período VIII). Esta acción favoreció el crecimiento de los organismos AOB en el reactor, pero también el de los organismos NOB, responsables de la oxidación del nitrito a nitrato.

A partir del día 241 la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente fue de 700 mg N-NH₄ L⁻¹, y la concentración de amonio acumulado en el licor mezcla del reactor alcanzó valores en torno a 87 mg N-NH₄ L⁻¹, mientras que la concentración de nitrito y nitrato acumulado alcanzaron concentraciones en torno a 32 mg N-NO₂⁻ L⁻¹ y 30 mg N-NO₃⁻ L⁻¹, respectivamente. Debido a que la respuesta del sistema de control no se consideró suficientemente rápida en términos de incremento de la dosis de materia orgánica, para el día 242 se procedió a afinar los centros de la variable de desfuzzificación “incremento de la dosis de materia orgánica $\mu(\Delta Vd)$ ”, los cuales se encuentran recogidos en la Tabla 4.23. Tras esta modificación se puede observar en la Figura 4.49 la reducción paulatina de la concentración de nitrito y nitrato en el reactor.

Tabla 4.23. Valores de los parámetros de desfuzzificación del sistema de control para optimizar la dosificación de materia orgánica.

Parámetros de Desfuzzificación					
ΔVd					
	$\mu(\Delta Vd)GN$	$\mu(\Delta Vd)PN$	$\mu(\Delta Vd)C$	$\mu(\Delta Vd)PP$	$\mu(\Delta Vd)GP$
	C_{GN}	C_{PN}	C_C	C_{PP}	C_{GP}
Valores anteriores	-0.70	-0.35	0.00	0.35	0.70
Valores redefinidos	-1.00	-0.50	0.00	0.50	1.00

A partir del día 260 se observó como la concentración de nitrógeno amoniacal comenzó a descender, debido principalmente al incremento de la biomasa en el reactor. La concentración de sólidos suspendidos volátiles a partir del día 260 alcanzó valores en torno a 1100 mg SSV L⁻¹, casi un 40% más de concentración de biomasa de lo obtenido en la parte inicial de este período experimental (700 mg SSV L⁻¹).

La Figura 4.52 muestra la evolución de los perfiles de pH, potencial redox y materia orgánica dosificada a lo largo de los ciclos realizados durante los días 264 y 265 de operación. En esta figura se puede observar que al final de la etapa anóxica del ciclo 4 el valor del potencial redox descendió bruscamente tras la eliminación del nitrito del reactor, lo cual fue confirmado analíticamente en el laboratorio. El valor del potencial redox descendió desde -105 mV al final de la etapa anóxica en el ciclo 3 a -160 mV al final de la etapa anóxica del ciclo 4. Tras la eliminación del nitrito acumulado (a partir del ciclo 4), el sistema de control identificó varios puntos de inflexión en el perfil del potencial redox (*tbpORP*) en los ciclos del 4 al 10, por lo que la dosificación de materia orgánica fue progresivamente reducida, desde 160 mg DQO L⁻¹ en el ciclo 4 a 60 mg DQO L⁻¹ en el ciclo 13. En los ciclos posteriores al ciclo 13 la dosificación de materia orgánica permaneció casi constante debido a que en cada ciclo se dosificó la materia orgánica necesaria para desnitrificar el nitrito producido en la etapa aerobia de ese ciclo.

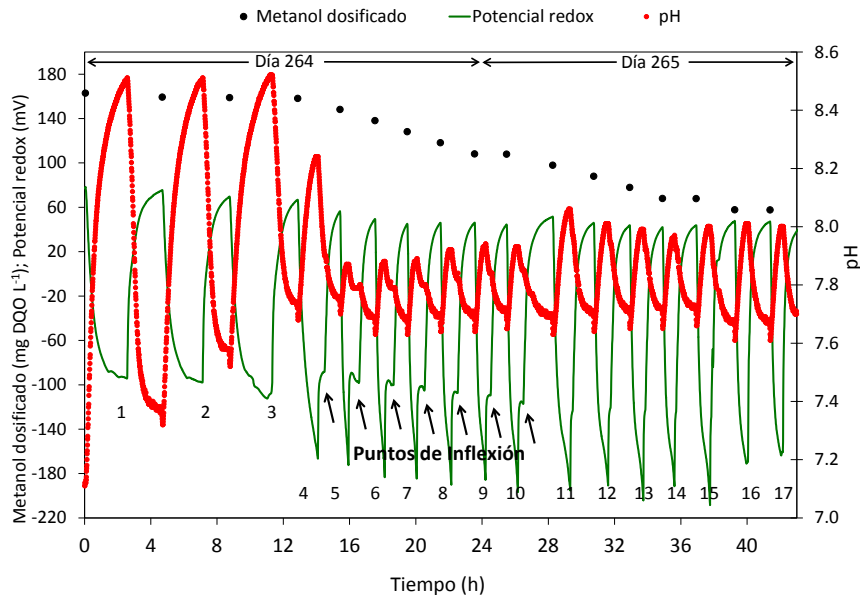


Figura 4.52. Evolución de los perfiles de pH y potencial redox y materia orgánica dosificada durante los ciclos realizados en los días 264 y 265 de operación (Período IX).

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el proceso de validación, el sistema de control desarrollado, basado en lógica difusa, demostró la aplicabilidad de los sensores de pH y potencial redox como herramientas para el control en tiempo real del proceso SHARON operado en continuo para la nitrificación y desnitrificación vía nitrito, en el que se adicionó una fuente de carbono orgánica externa. En todos los períodos evaluados el sistema de control ajustó automáticamente la duración de las etapas aerobia y anóxica en cada ciclo de operación, y optimizó la dosificación de la materia orgánica necesaria para llevar a cabo el proceso de desnitrificación. Mediante la implementación del sistema de control se alcanzaron porcentajes de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito en torno al 98%, siendo éste capaz de actuar adecuadamente frente a variaciones de la carga de nitrógeno amoniacal en la corriente afluente, y variaciones intrínsecas de la corriente de sobrenadante deshidratado procedente de la digestión anaerobia de fangos de la EDAR de la cuenca del Carraixet en Valencia.

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis doctoral se ha estudiado exhaustivamente el proceso de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en un reactor SHARON, para eliminar el nitrógeno amoniacal de la corriente del sobrenadante de la deshidratación de fangos estabilizados mediante digestión anaerobia. A continuación se describen las conclusiones más importantes de este trabajo de tesis doctoral:

1. La puesta en marcha del reactor SHARON de nitrificación parcial se puede conseguir empleando como inóculo biomasa procedente de un sistema convencional de fangos activados con eliminación biológica de nitrógeno. Esta puesta en marcha puede llevarse a cabo mediante la imposición de altas concentraciones de amonio y alcalinidad, así como de elevada temperatura (30-35°C) desde el inicio de operación, lo cual no afecta negativamente al desarrollo de las poblaciones de microorganismos AOB presentes en el inóculo. También es posible llevar a cabo la puesta en marcha del proceso adaptando la biomasa a altas concentraciones de amonio, alcalinidad y temperatura de manera progresiva. Sin embargo, para conseguir la nitrificación parcial, ambas estrategias de puesta en marcha del reactor SHARON requieren de la operación del proceso con tiempos de retención celular superiores a 1 día.
2. A pesar de la elevada concentración de nitrógeno amoniacal en el sobrenadante deshidratado procedente de la digestión anaerobia de fangos, las concentraciones de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el reactor SHARON suelen ser relativamente bajas ($< 1 \text{ g L}^{-1}$). Esto se debe a que los organismos amonioxidantes presentes en este tipo de sistemas tienen bajos rendimientos de producción de biomasa por unidad de sustrato. A pesar de ello, el proceso funciona de manera estable y permite obtener un adecuado rendimiento de oxidación de nitrógeno amoniacal a nitrito (en torno al 50%).
3. Mediante la aplicación de la técnica de hibridación *in situ* FISH a lo largo de la operación del reactor SHARON se determinó que los organismos que predominan en este tipo de proceso pertenecen a las especies *Nitrosomonas europaea spp* y *Nitrosomonas eutropha spp*.
4. El amoníaco (NH_3) es el sustrato de las especies de organismos AOB presentes en el reactor SHARON. La concentración de amoníaco con la que los organismos AOB alcanzan

la mitad de su actividad máxima fue determinada en $0.32 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$. Esta concentración de amoníaco equivale a una concentración de amonio de 40 mg N-NH_4 a pH 7 y 30°C . Este valor indica que el proceso SHARON es una tecnología interesante para su aplicación sobre corrientes de recirculación de agua residual con elevada concentración de nitrógeno amoniacal, en las que alcanzar un elevado porcentaje de eliminación de nitrógeno es más importante que obtener un efluente de alta calidad.

5. La salinidad es la responsable de la inhibición de estos organismos AOB en procesos de tratamiento de corrientes con elevada concentración de nitrógeno amoniacal. La concentración de sal que reduce a la mitad la actividad máxima de los organismos AOB presentes en el reactor SHARON fue determinada en 0.3 mol L^{-1} . La elevada salinidad puede ser uno de los factores responsables de que en el reactor SHARON se desarrollen especies de organismos AOB diferentes a las comúnmente encontradas en los procesos de fangos activados de eliminación de nutrientes.
6. El ácido nitroso (HNO_2) inhibe la actividad de los organismos AOB. La concentración de ácido nitroso que reduce a la mitad la actividad máxima de los organismos AOB presentes en el reactor SHARON se determinó en $1.32 \text{ mg N-HNO}_2 \text{ L}^{-1}$. Para alcanzar este valor se necesitaría una concentración muy elevada de nitrito y valores de pH inferiores a 7 en el reactor, por lo que se puede concluir que el tipo de organismos AOB desarrollados en el reactor SHARON presentan alta tolerancia al nitrito.
7. El rango de pH óptimo para los organismos AOB presentes en el reactor SHARON se encuentra entre 7.4 y 7.8. El pH óptimo varió en función de las condiciones del reactor, por lo que los organismos AOB presentes en el reactor SHARON son capaces de adaptarse a las condiciones ambientales. Valores de pH superiores al pH óptimo mostraron una inhibición de la actividad de AOB mucho mayor que la observada a valores de pH inferiores al pH óptimo.
8. El rango de temperatura óptimo para los organismos AOB presentes en el reactor SHARON se encuentra entre 35 y 40°C . A una temperatura de 45°C la actividad de los organismos AOB no es estable y desciende rápidamente. El modelo modificado de *Ratkowsky* reprodujo adecuadamente los resultados experimentales obtenidos en el rango de temperatura evaluado (15 - 40°C).

9. La monitorización del reactor SHARON mediante sensores de pH, potencial redox y oxígeno disuelto permite conocer el estado de los procesos de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en cada momento de operación. Las conclusiones que se presentan a continuación son aplicables a corrientes de agua residual con características similares a la corriente del sobrenadante procedente de la deshidratación del fango previamente sometido a un proceso de digestión anaerobia (baja concentración de materia orgánica en relación al nitrógeno amoniacal):
- La finalización del nitrógeno amoniacal acumulado durante la etapa anóxica del ciclo previo de operación es identificada mediante la reducción de la velocidad de descenso del pH en la etapa aerobia. El análisis de la velocidad de descenso del pH en condiciones aerobias puede ser empleado para optimizar la duración de la etapa aerobia de cada ciclo de operación.
 - El descenso de pH en condiciones aerobias ($\Delta\text{pH}_{\text{AE}}$) sigue un comportamiento lineal con la concentración de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente al proceso SHARON, por lo que el porcentaje de oxidación de amonio puede ser estimado mediante la monitorización del pH.
 - El incremento de pH durante la etapa anóxica ($\Delta\text{pH}_{\text{AX}}$) sigue un comportamiento lineal con el descenso de pH en la etapa aerobia previa ($\Delta\text{pH}_{\text{AE}}$). Un ciclo de operación en el que la desnitrificación sea incompleta puede ser detectado mediante el análisis de la variación del pH a lo largo del ciclo.
 - La finalización del proceso de desnitrificación puede ser identificada por la estabilización del pH y la presencia de un punto de inflexión en el perfil del potencial redox durante la etapa anóxica. La estabilidad del pH puede ser debida a la reducción total del nitrito producido durante la etapa aerobia en cada ciclo de operación y/o al agotamiento de la materia orgánica; mientras que el punto de inflexión en el perfil del potencial redox es consecuencia de la reducción total del nitrito.
 - En la operación del proceso SHARON en continuo no se identificó el punto de inflexión en el perfil del potencial redox en muchos de los ciclos en los que el nitrito se había agotado. Por lo tanto, se propone utilizar la estabilización del pH como criterio para determinar la duración de la etapa anóxica.

- La adición en exceso de materia orgánica durante la etapa anóxica ocasiona la presencia de un punto de inflexión en el perfil del potencial redox al inicio de la etapa aerobia del ciclo siguiente de operación. El tiempo que transcurre desde el inicio de la etapa aerobia y el momento en el que se detecta el punto de inflexión puede ser empleado como una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica adicionada en exceso en el ciclo previo de operación del reactor SHARON y, por tanto, puede ser empleada como un parámetro para optimizar la dosificación de materia orgánica.
 - La información aportada por los sensores de pH, potencial redox y oxígeno disuelto permiten detectar fallos en la operación del proceso SHARON.
10. La información aportada por los sensores de pH y potencial redox es muy útil para llevar a cabo el control automático y en tiempo real de los procesos implicados en la operación en continuo del reactor SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito. La implementación del sistema de control desarrollado, basado en lógica difusa, permitió optimizar la duración de las etapas aerobia y anóxica en cada ciclo de operación, así como optimizar la dosificación al inicio de cada etapa anóxica de la materia orgánica necesaria para llevar a cabo el proceso de desnitrificación.
11. La implementación del sistema de control desarrollado presentó las siguientes ventajas, en comparación con la operación del proceso SHARON mediante ciclos de duración fija y dosificación constante de materia orgánica:
- Mejora de la calidad del efluente del reactor SHARON al optimizar la duración de las etapas aerobia y anóxica. La concentración de nitrógeno amoniacal descendió desde 12 a 2 mg $\text{NH}_4\text{-N L}^{-1}$, por lo que el porcentaje de eliminación de nitrógeno amoniacal se incrementó del 95 al 98% tras la implementación del sistema de control. La duración promedio de cada ciclo de operación descendió desde 4 horas (operación con duración fija) a 2.9 horas (operación con sistema de control). Al operar el proceso con ciclos de duración optimizada se reduce el nitrógeno amoniacal acumulado en las etapas anóxicas. Asimismo, la optimización de la duración de la etapa aerobia permitió reducir las concentraciones de amonio y nitrito en el licor mezcla del reactor.

- Optimización de la dosificación de materia orgánica. La dosificación de materia orgánica se redujo desde 2100 mg DQO d⁻¹ a 1332 mg DQO d⁻¹ tras la implementación del sistema de control. Esta reducción supone cerca del 36% en ahorro económico en términos de fuente de carbono orgánica externa.
- Flexibilidad y capacidad de adaptarse y actuar adecuadamente frente a variaciones de la carga de nitrógeno amoniacal en la corriente afluyente al proceso SHARON. Se ha demostrado su aplicabilidad frente a variaciones intrínsecas de la corriente de sobrenadante deshidratado procedente de la digestión anaerobia de fangos de la EDAR de la cuenca del Carraixet (Valencia).

DESARROLLOS FUTUROS

6 DESARROLLOS FUTUROS

El trabajo de tesis doctoral realizado supone un avance en el conocimiento de los procesos de eliminación de nitrógeno vía nitrito de las aguas residuales. Esta investigación se ha centrado en el estudio de los procesos SHARON de nitrificación parcial y, de nitrificación y desnitrificación vía nitrito. Los desarrollos futuros propuestos son:

- Análisis estadístico de la información recopilada por los sensores de pH y potencial redox instalados en el reactor SHARON y las analíticas de laboratorio, con el fin de establecer un sistema de monitorización en tiempo real del proceso que permita detectar posibles anomalías en su comportamiento y diagnosticar rápidamente causas. También se construirán diversos modelos predictivos que permitan relacionar las variables de medición directa (sensores) con las analíticas de laboratorio.
- El proceso SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito requiere de una fuente externa de materia orgánica para llevar a cabo el proceso de desnitrificación, lo que supone un coste económico. Por tanto, se plantea como desarrollo futuro el estudio del proceso de oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX), y su acople con el proceso SHARON de nitrificación parcial. Mediante la operación conjunta de estos procesos es posible eliminar el coste económico que supone el empleo de materia orgánica externa, y reducir el coste asociado a la aireación.
- Desarrollo de sistemas de control para los procesos SHARON-ANAMMOX empleando la información procedente de sensores industriales de bajo coste (pH y potencial redox). Se plantea como desarrollo futuro el diseño, implementación y validación de un sistema de control de eliminación biológica de nitrógeno vía nitrito llevado a cabo por organismos autótrofos.
- Implementación de la tecnología SHARON de nitrificación y desnitrificación vía nitrito en una EDAR, a escala industrial. Se plantea como desarrollo futuro la puesta en marcha y la operación del reactor SHARON mediante el empleo del sistema de control desarrollado utilizando sensores industriales de bajo coste (pH y potencial redox). Además, con el objetivo de reducir costes se plantea el estudio en planta de diversas fuentes de carbono orgánico disponibles en la zona de emplazamiento de la EDAR.

- Estudio de las emisiones de óxido nitroso (N_2O) y óxido nítrico (NO) procedentes de las tecnologías de eliminación de nitrógeno vía nitrito de las aguas residuales. Estos gases contribuyen al aumento del efecto invernadero y cambio climático global. Por tanto, se plantea como desarrollo futuro el diseño, implementación y validación de una metodología experimental que permita determinar y cuantificar las emisiones de N_2O y NO procedentes de los procesos de eliminación de nitrógeno vía nitrito.
- Estudio del proceso de nitrificación y desnitrificación simultánea (SND) para la eliminación de nitrógeno amoniacal de la corriente del sobrenadante procedente de la digestión de fangos digeridos anaeróbicamente. Los resultados obtenidos del estudio que se plantea se podrían comparar con los resultados obtenidos del proceso SHARON, recogidos en este documento de tesis doctoral, con el objetivo de evaluar diferentes alternativas de tratamiento para este tipo de corriente de agua residual.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

Akin, B.S. y Ugurlu, A. (2005). Monitoring and control of biological nutrient removal in a Sequencing Batch Reactor. *Process Biochem.* 40, 2873-2878.

Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Devereux R. y Stahl D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environmental Federation (WEF). (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th Ed., Washington, D.C., USA.

Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of Water Pollution Control Federation* 48, 835-852.

Ayasa, E., De la Sota, A., Grau, P., Sagarna, J.M., Salterain, A., Suescun, J. (2006). Supervisory control strategies for the new WWTP of Galindo-Bilbao: the long run from the conceptual design to the full-scale experimental validation. *Water Sci Technol.* 53 (4-5), 193-201.

Bassin, J.P., Kleerebezem, R., Muyzer, G., Rosado, A.S., van Loosdrecht, M.C.M., Dezotti, M. (2012). Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93, 1281–1294.

Beaumont, H.J.E., Hommes, N.G., Sayavedra-Soto, L.A., Arp, D.J., Arciero, D.M., Hooper, A.B., Westerhoff, H.V., Van Spanning, R.J.M. (2002). Nitrite reductase of *Nitrosomonas europaea* is not essential for production of gaseous nitrogen oxides and confers tolerance to nitrite. *Journal of Bacteriology* 184(9), 2557-2560.

Birge, W.J., Westerman, A.G., Spromberg, J.A. (2000). Comparative toxicology and risk assessment of amphibians. *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Pensacola SETAC, 727-792.

Borrás, L. (2008). *Técnicas microbiológicas aplicadas a la identificación y cuantificación de microorganismos presentes en sistemas EBPR*. Tesis doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos, Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia, España.

Brock, T. (1994). *Biology of microorganisms*. 7th Edition. Editorial Prentice-Hall International

Busse, L.B., Venrick, E.L., Antrobus, R., Miller, P.E., Vigilant, V., Silver, M.W., Mengelt, C., Mydiarz, L. y Prezelin, B.B. (2006). Domoic acid in phytoplankton and fish in San Diego, CA. *Harmful Algae*. 5, 91-101

Camargo, J.A. y Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environ. International* 32, 831-849.

Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A. (2005). Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255-1267.

Cassellas, M., Dagot, C., Baudu, M. (2006). Set up and assessment of a control strategy in a SBR in order to enhance nitrogen and phosphorus removal. *Process Biochem.* 41 (9), 1994-2001.

Cassidy, D.P. y Belia, E. (2005). Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge. *Wat. Res.* 39(19), 4817-4823.

Cema, G., Wiszniowsky, J., Zabczyński, S., Zablocka-Godlewska, E., Raszka, A., Surmacz-Górska, J. (2007). Biological nitrogen removal from landfill leachate by deammonification assisted by heterotrophic denitrification in a rotating biological contactor (RBC). *Wat. Sci. Tech.* 55 (8-9), 35-42.

Cerhan, J.R., Weyer, P.J., Janney, C.A., Lynch, C.f., Folsom, A.R. (2001). Association of nitrate levels in municipal drinking water and diet with risk of coronary heart disease mortality: the Iowa Women's Health Study. *Epidemiology* 12, 457.

Cervantes, F.J. (2009). *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution*, IWA Publishing, London.

Chanona, J. (2005). Desarrollo de un sistema de control basado en lógica difusa para la producción de ácidos grasos volátiles en un proceso de fermentación-elutriación de fango primario. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia España.

Chanona, J., Pastor, L., Borrás, L., Seco, A. (2006). Fuzzy algorithm for pH control in a struvite crystallization reactor. *Wat. Sci. Tech.* 53(12), 161-168.

Chen, G.H., Wong, M.T., Okabe, S., Watanabe, Y. (2003). Dynamic response of nitrifying activated sludge batch culture to increased chloride concentration. *Water Res.* 37(13), 3125-3135.

Cheng, S.Y. y Chen, J.C. (2002). Study of the oxyhemocyanin, deoxyhemocyanin, oxygen affinity and acid-base balance of *Marsupenaeus japonicus* following exposure to combined elevated nitrite and nitrate. *Aquatic Toxicol.* 61, 181-193.

Ciudad, G., Werner, A., Bornhardt, C., Muñoz, C., Antileo, C. (2006). Differential kinetics of ammonia-oxidizing bacteria: A simple kinetic study based on oxygen affinity and proton release during nitrification. *Process Biochem.* 41, 1764-1772.

Claros, J., Jiménez, E., Borrás, L., Bouzas, A., Serralta, J., Aguado, D., Seco, A., Ferrer, J. (2009). Effect of temperature on the ammonia oxidising bacteria activity in a continuously aerated lab-scale. In proceeding: 2nd International Water Associate Specialized Conference on Nutrient Management in Wastewater Treatment Processes, Krakow.

Claros, J., Jiménez, E., Borrás, L., Aguado, D., Seco, A., Ferrer, J., Serralta, J. (2010). Short term effect of ammonia concentration and salinity on activity of ammonia oxidizing bacteria. *Wat. Sci. Tech.* 61(12), 3008-3016.

Claros, J., Jiménez, E., Aguado, D., Ferrer, J., Seco, A., Serralta, J. (2011). Effect of pH and HNO_2 concentration on the activity of ammonia oxidizing bacteria (AOB) in a partial nitritation reactor. In proceeding: 2nd Spain National Young Water Professional Conference, Madrid.

Daims, H. y Wagner, M. (2010). The microbiology of nitrogen removal. In: *Microbial ecology of activated sludge*, R. Seviour y N. Halkjaer (ed.), IWA publishing, London, 259-280

Daims, H., Bruhl, A., Amman, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB 338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434-444.

Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen P.H., Schleifer K.H., Wagner M. (2001). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5273-5284.

Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.H., Wagner, M. (2001a). In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5273-5284.

Dapena-Mora, A., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Jetten, M.S.M., Méndez, R. (2004a). Stability of the Anammox process in a gas-lift reactor and a SBR. *J. Biotechnol.* 110, 159-170.

Dapena-Mora, A., Fernández, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., Jetten, M.S.M., (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 859–865.

Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial núm. L 327 de 22/12/2000 p. 0001 – 0073.

Directiva 75/440/CEE del Consejo, de 16 de junio de 1975, relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los estados miembros. Diario Oficial núm. L 194 de 25 de julio.

Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre tratamiento de las aguas residuales urbanas. Diario Oficial núm. L 135 de 30 de mayo de 1991.

Directiva 91/676/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura. Diario Oficial núm. L 375 de 31 de diciembre.

Directiva 98/15/CE de la Comisión de 27 de febrero de 1998, por la que se modifica la Directiva 91/271/CEE del Consejo en relación con determinados requisitos establecidos en su anexo I (Diario Oficial núm. L 67 de 7 de marzo de 1998)

Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P. J. J., Siegrist, H., Van der Meer, J. R., y Zehnder, A. J. B. (2001). Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium rich leachate. *Archives of Microbiology* 175(3), 198-207.

Ehrich, S. Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., Bock, E. (1995). A new obligately chemolithoautrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology* 164, 16-23.

Fernandez, N., Sierra-Alvarez, R., Field, J.A., Amils, R., Sanz, J.L. (2008). Microbial community dynamics in a chemolithotrophic denitrification reactor inoculated with methanogenic granular sludge. *Chemosphere*. 70, 462-474.

Ferrer, J., Rodrigo, M.A., Seco, A., Peña-Roja, J.M. (1998). Energy saving in the aeration process by fuzzy logic control. *Wat. Sci. Tech.* 38(3), 209-217.

Fux, C. (2003). Biological nitrogen elimination of ammonium-rich sludge digester liquids. PhD Thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Switzerland.

Fux, C., Boehler, M., Huber, P., Brunner, I., Siegrist, H. (2002). Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitrification and subsequent anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in a pilot plant. *J. Biotechnol.* 99, 295–306

Fwetrell, L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environ. Health Perspect.* 112, 1371-1374.

Ganigué, R., López, H., Balaguer, M.D. Colprim, J. (2007). Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. *Water Res.* 41(15), 3317-3326.

Gao, D., Peng, Y., Li, B., Liang, H. (2009). Shortcut nitrification-denitrification by real-time control strategies. *Bioresour. Technol.* 100, 2298-2300.

Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., Schramm, A. (2001) Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphate-removing biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(3), 1351–1362.

Gijzen, H.J. y Mulder, A. (2001). The nitrogen cycle out of balance. *Water* 21 8, 38–40.

Ginige, M.P., Keller, J., Blackall, L.L. (2005). Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. *Appl Environ Microbiol.* 71, 8683–8691.

Grady, J., Daigger, G., Lim, H. (1999). *Biological wastewater treatment*, Second Edition. Marcel Dekker, New York.

Grady, J., Daigger, G., Love, N., Filipe, C. (2011). *Biological wastewater treatment*, Third Edition. IWA publishing, London.

Gu, S.B., Yang, S., Yang, Q., Peng, Y. (2011). Start-up short-cut nitrification at low temperature with real-time control strategy based on pH and blower frequency. *Proceedings of the IWA Specialized Conference SSS4WATER, Venice (Italy), April 18–22.*

Guo, J.H., Peng, Y.Z., Wang, S.Y., Zheng, Y.N., Huang, H.J., Ge, S.J. (2009). Effective and robust partial nitrification to nitrite by real-time aeration duration control in an SBR treating domestic wastewater. *Process Biochem.* 44, 979-985.

Gupta, S.K., Gupta, R.C., Gupta, A.B., Seth, A.K., Bassin, J.K., Gupta, A. (2000). A recurrent acute respiratory infections in areas with high nitrate concentrations in drinking waters. *Environ. Health Perspect.* 108, 363-366.

Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., Saunders, J.R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16s ribosomal-RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1147–1153.

Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998). The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste Water. *Wat. Sci. Tech.* 37 (9), 135-142.

Helmer, C. y Kunst, S. (1998) .Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. *Wat. Sci. Tech.* 37, 183–187.

Henze, M.; Gujer, W.; Mino, T.; Matsuo, T.; Wentzel, M. C.; Marais, G. v. R.; van Loosdrecht, M. C. M. (1999). Activated Sludge Model No.2d. *Wat. Sci. Tech.* 39 (1), 165-182

Hibiya, K., Terada, A., Tsuneda, S., Hirata, A. (2003). Simultaneous nitrification and denitrification by controlling vertical and horizontal microenvironment in a membrane-aerated biofilm reactor. *Journal of Bacteriology* 100, 23–32.

Hu, L., Wang, J., Wen, X., Qian, Y. (2005). Study on performance characteristics of SBR under limited dissolved oxygen. *Process Biochem.* 40, 293–296.

Hu, T.L. y Kung, K.T. (2000) Study of heterotrophic nitrifying bacteria from wastewater treatment systems treating acrylonitrile, butadiene and styrene resin wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 42 (3–4), 315–322.

Huang, Y.C. y Wang, X.Z. (1999), Application of causal fuzzy networks to wastewater treatment plants. *Chemical Engineering Science* 54, 2731-2738.

Hunik, J.H., Meijer, H.J.G., Tramper, J. (1992). Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate, product and salt concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 802–807.

Hunt, K.J., Sbarbaro, D., Zbikowski, R., Gawthrop, P.J. (1992). Neural networks for control system – A Survey. *Automática* 28(6), 1083-1112.

Hwang, I.S., Min, K.S., Choi, E., Yun, Z. (2005). Nitrogen removal from piggery waste using the combined SHARON and ANAMMOX process. *Wat. Sci. Tech.* 52 (10-11), 487-494.

Ingildsen, P. y Olsson, G. (2002). Exploiting on line in-situ ammonium, nitrate and phosphate sensors in a full-scale wastewater plant operation. *Wat. Sci. Tech.* 46(4-5), 139-147.

Ingildsen, P. y Wendelboe, H. (2003). Improved Nutrient Removal Results Using In-Situ Continuous On-line Sensors with Reduced Response Time. Conference Proceedings, Annual Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference (WEFTEC).

Jepsson, U., Alex, J., Pons, M.N., Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A. (2002). Status and future trends of ICA in wastewater treatment-a European perspective. *Wat. Sci. Tech.* 45(4-5), 485-494.

Jetten, M.S.M., Horn, S.J., van Loosdrecht, M.C.M. (1997). Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Wat. Sci. Tech.* 35(9), 171-180.

Jin, R.C., Zheng, P., Mahmood, Q., Hu, B.L. (2007). Osmotic stress on nitrification in an airlift bioreactor. *J Haz Mat.* 146, 148–154.

Jones, R.M., Dold, P.L., Takács I., Chapman K., Wett B., Murthy S., M.O'Shaughnessy. (2007). Simulation for operation and control of reject water treatment processes. Proceeding Water Environmental Foundation WEFTEC, San Diego.

Jubany, J., Lafuente, J.A., Baeza, J. Carrera. (2009). Total and stable washout of nitrite oxidizing bacteria from a nitrifying continuous activated sludge system using automatic control based on oxygen uptake rate measurements. *Water Res.* 43, 2761–2772.

Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H. P. Koops, y M. Wagner. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3042–3051.

Kampschreur, M. (2010). Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during nitrogen conversion processes. PhD Thesis. Department of Biotechnology. Delft University of Technology, The Netherlands.

Keller, J., Subramaniam, K., Gosswein, J., Greenfield, P.F. (1997). Nutrient removal from industrial wastewater using single tank sequencing batch reactors. *Wat. Sci. Tech.* 35, 137–144.

Kim, H. y Hao, O.J. (2001). pH and Oxidation-reduction potential control strategy for optimization of nitrogen removal in an alternating aerobic- anoxic system. *Water Environment Research* 73 (1), 95–102.

Kim, J.K., Park, K.J., Cho, K.S., Nam, S.W., Park, T.J., Rakesh, B. (2005). Aerobic nitrification-denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology* 96, 1897–1906.

Koop, H.P., Böttcher, B., Möller, U.C., Pommering-Röser, A., Stehr, G. (1990). Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Archives of Microbiology* 154, 244-248.

Kos, P. (1998). Short SRT (solids retention time) nitrification process/flow-sheet. *Wat. Sci. Tech.* 38(1), 23-29.

Kuai, L., y Verstraete, W. (1998). Ammonium removal by oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl. Environ. Microbiol* 64(11), 4500-4506.

Larsen, P.M. (1980). Industrial application of fuzzy logic control. *International Journal of Man-Machine Studies* 12(1), 3-10.

Lee, H., Min, Y.M., Park, C.H., Park, Y.H. (2004). Automatic control and remote monitoring systems for biological nutrient removal on small wastewater treatment plants in Korea. *Wat. Sci. Tech.* 50 (6), 199-206.

Li, D.H. y Ganczarczyk, J.J. (1990). Structure of activated sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering* 11, 127–138.

Li, D.H. y Ganczarczyk, J.J. (1993). Factors affecting dispersion of activated sludge flocs. *Water Environmental Research* 65, 258–263.

Liu, W., Lee, G.J.F., Goodley, J.J. (2003). Using Online ammonia and nitrate instruments to control modified Ludzack-Ettinger (MLE) Process. *Proceedings of the 76th Annual Water Environmental Federation Technical Exhibition & Conference, Los Angeles (USA), Oct.11-15.*

Mandami, E.H. (1974). Application of fuzzy algorithm for control of simple dynamic plant. *IEEE Proceedings* 121, 1585-1588.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., (1992). Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593–600.

Metcalf y Eddy, Inc. (1995). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización.* 3ª Edició. McGraw-Hill, New York, USA.

Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1996). Phylogenetic probes for analysing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (6), 2156–2162.

Moosbrugger, R.E., Wentzel, M.C., Ekama, G.A., y Marais, G.v.R. (1992). Simple titration procedures to determine H_2CO_3 - alkalinity and short-chain fatty acids in aqueous solutions containing known concentrations of ammonium, phosphate and sulphide weak acid/bases. Water Research Commission, Report No. TT 57/92. Research Report W 74, University of Cape Town, Pretoria, Republic of South Africa.

Mosquera-Corral, A., González, F., Campos, J.L., Méndez, R. (2005). Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochem.* 40, 3109–3118.

Mulder J.W., Van Loosdrecht M.C.M., Hellinga C., Van Kempen R. (2001). Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Wat. Sci. Tech.* 43 (11), 127-134.

Mulder, A. (2003). The quest for sustainable nitrogen removal technologies. *Wat. Sci. Tech.* 48 (1), 67-75.

Mulder, J.W., Duin, J.O.J., Goverde, J., Poiesz, W.G., Van Veldhuizen, H.M., Van Kempen, R., Roeleveld, P. (2006). Full-Scale experience with the SHARON process through the eyes of the operators. *Water Environmental Foundation WEFTEC*, 5256-5270.

Münch, E.V., Lant, P.A., Keiler, J. (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* 30, 277–284.

Neeff, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer K.H. (1996). Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4329-4339.

Nielsen, H., Daims, H., Lemmer, H. (2009). *FISH handbook for biological wastewater treatment*. IWA publishing, London.

Olsson, G. y Ingildsen, P. (2003). Automation in Wastewater Treatment Plants. Conference Proceedings. Conference Proceedings, Annual Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference (WEFTEC).

Olsson, G., Nielsen, M., Yuan, Z., Lynggaard-Jensen, A. y Steyer, J.P. (2005). *Instrumentation, Control and Automation in Wastewater Systems*, IWA Publishing, London.

Panswad, T. Anan, C. (1999). Impact of high chloride wastewater on anaerobic/anoxic/aerobic process with and without inoculation of chloride acclimated seeds. *Water Res.* 33, 1165–1172.

Patureau, D., Godon, J.J., Dabert, P., Bouchez, T., Bernet N., Delgenes, J.P., Moletta, R. (1998). *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen saturated conditions. *International Journal of Systematic and Bacteriology.* 48, 775–782.

Pearce, P. (2004). Tricking filters for upgrading low technology wastewater plants for nitrogen removal. *Wat. Sci. Tech.* 49 (11-12), 47-52.

Pedrycz, W. (1993). *Fuzzy Control and Fuzzy Systems*. 2nd extended edition. John Wiley & Sons Inc, New York.

Philippot, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577, 355-376. *Appl. Environ. Microbiol* 64, 3480-3485.

Pidwirny, M. (2006). *Fundamentals of Physical Geography*, 2nd Edition. Consulta: 15.5.2012. Dirección URL: <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/10a.html>

Plisson-Saune, S., Capdeville, B., Mauret, M., Deguin, A., Baptiste, P. (1996). Real-time control of nitrogen removal using three ORP bending points: Signification, control strategy and results. *Water Sci Technol.* 33, 275-280.

Pochana, K. y Keller, J. (1999). Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Wat. Sci. Tech.* 39(6), 61–68.

Puig, S., Corominas, L.I., Balaguer, M.D., Colprim, J. (2005). Development and implementation of a real-time control system for nitrogen removal using OUR and ORP as endpoints. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (9), 3367-3373.

Puñal, A., Palazzotto, L., Bouvier, J.C., Conte, T., Steyer, J.P. (2003). Automatic control of volatile fatty acids in anaerobic digestion using a fuzzy logic based approach. *Wat. Sci. Tech.* 48(6), 103-10.

Pynaert, K., Smets, B.F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S.D., Verstraete W. (2003). Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3626-3635.

Ra, C.S., Lo, K.V., Mavinic, D.V. (1998). Real-time control of two-stage sequencing batch reactor system for the treatment of animal wastewater. *Environmental Technology* 19, 343–356.

Rabus, R., Wilkes, H., Schramm, A., Harms, G., Behrends, A., Amann, R., Widdel, F. (1999). Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1, 145-157.

Real Decreto 2116/1998, de 2 de octubre, por el que se modifica el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.

Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.

Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las Normas Aplicables al Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas.

Robertson, L.A. y Kuenen, J.G. (1984). Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology* 139, 347–354.

Robertson, L.A., van Niel, E.W.J., Torresmans, R.A.M., Kuenen, J.G. (1988). Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2812–2818.

Rodrigo, M.A. (1997). Desarrollo de una metodología para el diseño de sistemas de control aplicable a procesos de eliminación biológica de nutrientes. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia, España.

Rosén, B. y Huijbregsen, C. (2003). The ScanDeNi process could turn an existing under-performing activated sludge plant into an asset. *Wat. Sci. Tech.* 47(11), 31-36.

Rother, E., Cornel, P., Ante, A., Kleinert, P., Brambach, R. (2002). Comparison of combined and separated biological aerated filter (BAF) performance for pre-denitrification/nitrification of municipal wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 46 (4-5), 149-156.

Ruano, M.V., Ribes, J., Seco, A., Ferrer, J. (2009). Low cost-sensors as a real alternative to on-line nitrogen analysers in continuous systems. *Water Sci. Technol.* 60, 3261-3268.

Ruano, M.V., Ribes, J., Seco, A., Ferrer, J. (2012). An advanced control strategy for biological nutrient removal in continuous systems based on pH and ORP sensors. *Chem. Eng. J.* 183, 121-221.

Ruano, M.V., Ribes, J., Seco, A., Ferrer, J. (2011). DSC: software tool for simulation based design of control strategies applied to WWTPs. *Wat. Sci. Tech.* 63(4), 796 – 803.

Salem S., Berends D., van Loosdrecht M.C.M. y Heijnen J.J. (2002). Model-based evaluation of a new upgrading concept for N-removal. *Wat. Sci. Tech.* 45(6), 169-176.

Salem, S., Berends, D.H.J.G., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2003). Bio-Augmentation by nitrification with return sludge. *Water Res.* 37(8), 1794–1804.

Santos, M., Dormido, S., Perez, A., Morilla F., De la Cruz, J. M. (1996) Tuning fuzzy logic controllers by classical techniques, *Lecture Notes in Computer Science, Computer Aided Systems Theory - Cast 94*, Springer-Verlag 1105, 214-224.

Schalk J, Hege O, Kuene GJ, Jetten MSM. (1998). The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiology Letters* 158, 61–67.

Schei, T.S. (1994). Automatic tuning of PID controllers based on transfer function estimation. *Automatica* 30(12), 1983–1989.

Schleper, C., Jurgens, G., Jonuscheit, M. (2005). Genomic studies of uncultivated Archaea. *Nature Reviews Microbiology* 3, 479-488.

Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M., Amman, R. (1998). Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant population in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol* 64, 3480-3485.

Sedlak, R. (1991). Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater. Principle and practice. 2nd Edition. Lewis Publishers.

Serafim, L.S., Lemos, P.C., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H. y Reis, M.A.M. (2002). Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *J Microbiol Methods* 51 (1), 1-18.

Serralta, J., Ribes, J., Seco, A., Ferrer J. (2002). A supervisory control system for optimising nitrogen removal and aeration energy consumption in wastewater treatment plants. *Water Sci Technol.* 45(4-5), 309-316.

Seviour, R. y Nielsen, H. (2010). *Microbial ecology of activated sludge*. IWA publishing, London.

Slikers, A. O., Derwort, N., Campos Gomez, J. L., Strous, M., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. (2002). Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res.* 36, 2475-2482.

Slikers, A.O., Third, K.A., Abma, W., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., (2003). CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 339–344.

Sloan, D.S. y Pelletier, R.A. (2000). A New Approach To Activated Sludge Process Control. *Florida Water Resources Journal*, November Issue.

Sorokin, D.Y., Muyzer, G., Brinkhoff, T., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. (1998). Isolation and characterization of a novel facultatively alkaliphilic *Nitrobacter* species, *N. alkalicus* sp. nov. *Archives of Microbiology* 170, 345-352.

Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 589-596.

Strous, M., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. (1999a). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied Environmental Microbiology.* 65, 3248–3250.

Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M.W., et al. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an Anammox bacterium from a community genome. *Nature* 440 (7085), 790-794.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Leung, G. (1992). Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrients by the nitrification denitrification process. *Water Res.* 26, 1229-1236.

Tanwar, P., Nandy, T., Ukey, P., Manekar, P. (2008). Correlating on-line monitoring parameters, pH, DO and ORP with nutrient removal in an intermittent cyclic process bioreactor system. *Bioresour Technol.* 99, 7630-7635.

Thorndycroft, F.H., Butland, G., Richardson, D.J., Watmough, N.L. (2007). A new assay for nitric oxide reductase reveals two conserved glutamate residues form the entrance to a proton-conducting channel in the bacterial enzyme. *Biochem. J.* 401, 111-119.

U.S. EPA, United State Environmental Protection Agency. (1993). Manual Nitrogen Control. Office of Water, Washington, D.C. EPA/625/R-93/010.

Vadivelu, V.M., Yuan, Z., Fux, C., Keller, J., (2006b). The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environmental Science and Technology* 40 (14), 4442-4448.

Van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M., Kuenen, J. G. (1997). Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 143, 2415-2421.

Van de Graaf, A. A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4), 1246-1251.

Van Dongen, U., Jetten, M.S.M., van Loosdrecht, M.C.M. (2001). The SHARON-ANAMMOX process for treatment of ammonium rich wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 44, 53–60.

Van Hulle, S., Volcke, E., López, J., Donckels, B., Van Loosdrecht, M.C.M., Vanrolleghem, P.A. (2007). Influence of temperature and pH on the kinetics of the SHARON nitrification process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 82, 471-480.

Van Kempen, R., Mulder, J.W., Uijterlinde, C.A., Van Loosdrecht, M.C.M. (2001). Overview: full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Wat. Sci. Tech.* 44 (1), 145-152

Van Loosdrecht, M.C.M. y Salem, S. (2006). Biological treatment of sludge digester liquids. *Wat. Sci. Tech.* 53 (12), 11-20.

Vives, M.T., Balaguer, M.D., García, S., García, R., Colprim, J. (2003). Textile dyeing wastewater treatment in a sequencing batch reactor system. *Journal of Environmental science and health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* A38(10), 2089-2099.

Volcke, E. (2006). Modelling, analysis and control of partial nitrification in a SHARON reactor. PhD Thesis. Department of Biotechnology. Delft University of Technology, The Netherlands.

Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.P., Schleifer, K.H. (1995). In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 18, 251-264.

Wagner, M., Rath, G., Koops, H.P., Flood, J., Amann, R. (1996). In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat Sci Techn.* 34, 237-244.

Ward, B.B., Arp, D.J., Klotz, M.G. (2011). *Nitrification*. IWA publishing. London.

Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W., Waterbury, J.B., Schlosser, U. (1986). *Nitrospira marina* gen. nov., sp. nov.: chemolithotropic nitrite-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology* 144, 1-7.

Wett, B. y Rauch, W. (2003). The role of inorganic carbon limitation in biological nitrogen removal of extremely ammonia concentrated wastewater. *Water Res.* 37, 1100-1110.

Windey, K., De Bo, I., Verstraete, V. (2005). Oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification (OLAND) in a rotating biological contactor treating high-salinity wastewater. *Water Res.* 39, 4512-4520.

Wolfe, A.H. y Patz, J.A. (2002). Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Ambio.* 31, 120-125.

Won, S.G. y Ra, C.S. (2011) Biological nitrogen removal with a real-time control strategy using moving slope changes of pH (mV)- and ORP-time profiles. *Water Res.* 45, 171-178.

Wyffels, S., Boeckx, P., Pynaert, K., Zhang, D., Van Cleemput, O., Chen, G., Verstraete, W. (2004a). Nitrogen removal from sludge reject water by a two-stage oxygen-limited autotrophic nitrification denitrification process. *Wat. Sci. Tech.* 49(5-6), 57-64

Wyffels, S., Pynaert, K., Boeckx, P., Verstraete, W., Van Cleemput, O. (2003). Identification and quantification of nitrogen removal in a rotating biological contactor by ¹⁵N tracer techniques. *Water Res.* 37, 1252-1259.

Yang, Q., Peng, Y., Liu, X., Zeng, W., Mino, T., Satoh, H (2007). *Environ Sci Technol.* 41, 8159-8164.

Yang, W., Vollertsen, J., Hvitved-Jacobsen, T. (2003). Nitrite accumulation in the treatment of wastewaters with high ammonia concentration. *Water Sci. Technol.* 48(3), 135-141.

Yong, M., Yong-zhen, P., Xiao-lian, W., Shu-ying, W. (2005). Intelligent control aeration and external carbon addition for improving nitrogen removal. *Environmental Modelling and Software* 21, 821-828.

Zanetti, L., Frison, N., Nota, E., Tomizioli, M., Bolzonella, D., Fatone, D. (2012). Progress in real-time control applied to biological nitrogen removal from wastewater. A short-review. *Desalination* 286, 1-7.

Zhang, D.J., Lu, P.L., Long, T.R., Verstraete, W. (2005). The integration of methanogenesis with simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor. *Process Biochem.* 40, 541–547.

Zhou, Y., Oehmen, A., Lim, M., Vadivelu, V., Ng, W.J. (2011). The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water Res.* 45(15), 4672–4682.

Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S. (2008) Biological nitrogen removal from wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192,159–195.

Ziegler, J.G. y N.B. Nichols (1942). Optimum settings for automatic controllers. *Trans. of the A.S.M.E.* 64, 759–768.