



Universidad Politécnica de Valencia  
Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos  
Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente

**Memoria de Tesis Doctoral**

*Modelación matemática del proceso de  
nitrificación en dos etapas.  
Desarrollo de metodologías de calibración del  
modelo para un reactor SHARON y un  
proceso de fangos activados.*

**EMÉRITA JIMÉNEZ DOUGLAS**

**Directores:**

José Ferrer Polo  
Joaquín Serralta Sevilla

*Valencia, 2010*



Incluso la más simple célula viva  
es un sistema de tan imponente complejidad  
que cualquier descripción matemática  
es una aproximación extremadamente modesta.

*Bailey 1998.*



## AGRADECIMIENTOS

Cuatro años dedicados a la realización de la tesis doctoral conllevan la interacción con muchas personas. Estas primeras líneas las quiero dedicar para dar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que con su apoyo han hecho posible la presentación de esta memoria.

En primer lugar quiero dar las gracias a José Ferrer Polo y Aurora Seco Torrecillas por darme la posibilidad de formar parte de su grupo de investigación y desarrollar mi tesis doctoral con ellos. Sin esta oportunidad hoy no estaría presentando esta memoria.

Estoy profundamente agradecida a mis directores, el doctor Joaquín Serralta Sevilla y el doctor José Ferrer Polo, por la dirección, consejos e inestimable ayuda que han hecho posible la realización del presente trabajo. Deseo agradecerles también el apoyo y comprensión demostrada.

A todos los compañeros del grupo de investigación que de una forma u otra han aportado su granito de arena en estos cuatro años de trabajo:

A Javier Claros, mi *partnet*. Porque su trabajo me aportó la información necesaria para conformar los pilares de esta tesis. Junto con él y Luisa empecé mi andadura en el camino del doctorado y hemos seguido trabajando juntos durante mucho tiempo, por todo ello siempre les guardaré un especial cariño.

A Vicky, Juan, Marcela y Laura Carretero por esas horas (y días) en la planta piloto y en el laboratorio compartiendo penas y alegrías. Gracias por hacer mucho más agradables las tareas más duras de este trabajo.

A Freddy, Javier Eduardo y Ángel, mis compañeros de despacho. Vuestra compañía en estos años ha hecho mi vida como investigador mucho más fácil y el trabajo mucho más ameno.

A Ángela, por su aportación artística y ese derroche de felicidad que anima a cualquiera.

A Josep, Alberto, Paqui, Dani y Ramón porque siempre han sido un ejemplo a seguir. Gracias por los muchos comentarios y consejos aportados en estos años.

A Luis, Nuria y Laura Pastor, vuestro buen humor y forma de ver la vida es siempre un regalo. Así que, simplemente, gracias por ser como sois.

A Jose, Rafa, Brenda, Berta, Sara, Quique, Tatiana y Laura Segovia, porque con vosotros los momentos compartidos han sido pocos pero muy buenos.

Por último, deseo expresar mi amor y agradecimiento a toda mi familia y amigos. En particular me gustaría agradecer a mis padres y hermanos porque a ellos les debo gran parte de lo que soy. Siempre encontré en sus palabras aquello que necesitaba oír en cada momento. Hemos compartido muchísimas cosas y con vuestras experiencias yo también he aprendido muchas lecciones que me han ayudado en mí día a día. Al futuro bebé de la familia porque con la noticia de tu llegada has alegrado la etapa final de esta tesis que siempre es la más difícil.

También quiero dar las gracias a mi familia política, a mis suegros, cuñados y sobrinos, porque para mí siempre han sido como mis padres y mis hermanos, y me han tratado como una hija más desde el principio.

A mis amigos de la infancia, Laura, Inma, Natalia,... y a todos aquellos que han ido llegando a lo largo de mi vida, en el instituto, la universidad, los viajes,... todos y cada uno de vosotros habéis dejado algo especial a vuestro paso y seguís aportando mucho aunque estéis lejos.

A David, porque llevamos casi media vida juntos y sigues haciéndome reír como el primer día. Gracias por hacerme el camino más fácil. Gracias por hacerme ver las cosas en perspectiva: *es solo una tesis*.

A todos, muchas gracias.



***Resumen.***



## RESUMEN

Los problemas derivados de la acumulación de nitrógeno y fósforo procedentes, en gran medida, de los vertidos de aguas residuales a mares, ríos y lagos ha llevado al creciente estudio de nuevas tecnologías y métodos de tratamiento de estas aguas residuales, basadas principalmente en procesos biológicos de depuración. Los procesos biológicos que tienen lugar en una EDAR consisten en transformaciones bioquímicas que realizan los microorganismos durante su crecimiento.

La modelación matemática de los procesos de crecimiento de las bacterias responsables de la depuración de las aguas residuales es fundamental para el diseño, simulación y control óptimo de una EDAR. Tradicionalmente, el proceso de nitrificación, llevado a cabo por dos grupos de bacterias, era modelado como una única etapa en la que el amonio era oxidado a nitrato. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías y la aparición de problemas de acumulación de nitrito en algunas EDARs ha surgido la necesidad de considerar el nitrito como un nuevo componente en la modelación de los procesos biológicos. Esto ha llevado a la aparición de varios modelos en los que se divide el proceso de nitrificación en dos etapas: primero el amonio es oxidado a nitrito y, posteriormente, éste es oxidado a nitrato. La modelación del proceso de nitrificación teniendo en cuenta el nitrito como componente intermedio conlleva también la modificación de otros procesos como el crecimiento de bacterias heterótrofas empleando nitrito en lugar de nitrato como aceptor de electrones.

Aunque son varios los modelos propuestos considerando la nitrificación en dos etapas, aun no hay un modelo con inclusión del nitrito, ampliamente aceptado por la comunidad científica, apropiado para tratar las cuestiones mencionadas y proporcionar un rango de valores de parámetros fiable para reproducir adecuadamente las transformaciones del nitrito en los sistemas de fangos activos. Además, tampoco se ha definido una metodología de calibración para estos modelos que facilite la determinación de los valores de los parámetros incluidos en estos. Por ello, los objetivos generales de esta tesis son el desarrollo de un modelo general del proceso de nitrificación vía nitrito que considere tanto la oxidación de amonio a nitrito como del nitrito a nitrato y la metodología de calibración para los parámetros de las bacterias implicadas. Como se pretende validar el modelo en dos sistemas de operación con características completamente diferentes, un reactor SHARON a escala de laboratorio y una planta piloto de fangos activados, ha sido necesario el desarrollo de una metodología de calibración adaptada a cada uno de los sistemas. La metodología de calibración del proceso en el reactor SHARON incluye únicamente la determinación de los valores de los parámetros correspondientes a las bacterias amonioxidantes, ya que son las

únicas presentes en este sistema. En cambio, en la planta piloto se desarrollan tanto bacterias nitrificantes como amonificantes, con lo que la calibración exige ensayos enfocados a la determinación de los parámetros de cada grupo de bacterias por separado. Las metodologías de calibración están basadas fundamentalmente en técnicas respirométricas y en el estudio individualizado de los diferentes procesos involucrados mediante experimentos en discontinuo realizados en laboratorio. Estas metodologías se han desarrollado con un especial énfasis en la simplicidad y facilidad para poder reproducirlas con la frecuencia necesaria y sin la necesidad de un equipo específico ni técnicas de laboratorio especialmente complejas.

Las metodologías de calibración desarrolladas han sido aplicadas en cada uno de los sistemas mencionados. Mediante la aplicación de estas metodologías y el seguimiento de las poblaciones bacterianas presentes en cada uno de los sistemas se ha podido comprobar, en el caso de las bacterias amonificantes, que las bacterias características del reactor SHARON son diferentes a las de la planta piloto, lo que conlleva valores de los parámetros del modelo totalmente diferentes. La calibración del modelo en la planta piloto ha permitido observar también las diferencias entre las bacterias amonificantes y las bacterias nitrificantes en cuanto afinidad por el oxígeno, efecto del pH, velocidad máxima de crecimiento,... Además, la planta piloto fue operada en una primera etapa con la inclusión de un reactor BABE en el esquema de operación que posteriormente fue eliminado, lo que ha permitido observar el efecto que tiene la presencia de este reactor sobre las bacterias calibradas.

Finalmente, el modelo desarrollado ha sido validado en el reactor SHARON mediante el ajuste del modelo a los resultados experimentales obtenidos a partir del seguimiento analítico de estos reactores. Las simulaciones realizadas utilizando el modelo matemático con el conjunto de parámetros obtenidos, implementado en el software DESASS, reproducen con precisión los resultados experimentales de los reactores.

## RESUM

Els problemes derivats de l'acumulació de nitrogen i fòsfor procedents, en gran manera, dels abocaments d'aigües residuals a mars, rius i llacs ha portat a l'estudi creixent de noves tecnologies i mètodes de tractament d'aquestes aigües residuals, basades principalment en processos biològics de depuració. Els processos biològics que tenen lloc en una EDAR consisteixen en transformacions bioquímiques que realitzen els microorganismes durant el creixement.

La modelització matemàtica dels processos de creixement dels bacteris responsables de la depuració de les aigües residuals és fonamental per al disseny, la simulació i el control òptim d'una EDAR. Tradicionalment, el procés de nitrificació dut a terme per dos grups de bacteris, era modelitzat com una única etapa en què l'amoni era oxidat a nitrat. No obstant això, amb el desenvolupament de noves tecnologies i l'aparició de problemes d'acumulació de nitrit en algunes EDAR ha sorgit la necessitat considerar el nitrit com un nou component en la modelització dels processos biològics. Això ha portat a l'aparició de diversos models en què es divideix el procés de nitrificació en dos etapes: primer l'amoni és oxidat a nitrit i, posteriorment, aquest és oxidat a nitrat. La modelització del procés de nitrificació tenint en compte el nitrit com a component intermediari comporta també la modificació d'altres processos com el creixement de bacteris heteròtrofs emprant nitrit en comptes de nitrat com a acceptor d'electrons.

Encara que són diversos els models proposats considerant la nitrificació en dos etapes, encara no hi ha un model que incloga el nitrit, àmpliament acceptat per la comunitat científica, apropiat per a tractar les qüestions mencionades i proporcionar un rang de valors de paràmetres fiable per a reproduir adequadament les transformacions del nitrit en els sistemes de fangs actius. A més, tampoc s'ha definit una metodologia de calibratge per a aquests models que facilite la determinació dels valors dels paràmetres inclosos en aquests. Per això, els objectius generals d'aquesta tesi són el desenvolupament d'un model general del procés de nitrificació via nitrit que considere tant l'oxidació d'amoni a nitrit, com de nitrit a nitrat, i la metodologia de calibratge per als paràmetres dels bacteris implicats. Com es pretén validar el model en dos sistemes d'operació amb característiques completament diferents, un reactor SHARON a escala de laboratori i una planta pilot de fangs activats, ha sigut necessari el desenvolupament d'una metodologia de calibratge adaptada a cada un dels sistemes. La metodologia de calibratge del procés en el reactor SHARON inclou únicament la determinació dels valors dels paràmetres corresponents als bacteris amonioxidants, ja que són els únics presents en aquest sistema. En canvi, a la planta pilot es

desenvolupen tant bacteris nitròxidants com amonioxidants, amb la qual cosa el calibratge exigeix assajos enfocats a la determinació dels paràmetres de cada grup de bacteris per separat. Les metodologies de calibratge estan basades fonamentalment en tècniques respiromètriques i en l'estudi individualitzat dels diferents processos involucrats per mitjà d'experiments en discontinu realitzats en laboratori. Aquestes metodologies s'han desenvolupat amb un especial èmfasi en la simplicitat i facilitat per a poder reproduir-les amb la freqüència necessària i sense la necessitat d'un equip específic ni tècniques de laboratori especialment complexes.

Les metodologies de calibratge desenvolupades han sigut aplicades en cada un dels sistemes mencionats. Per mitjà de l'aplicació d'aquestes metodologies i el seguiment de les poblacions bacterianes presents en cada un dels sistemes s'ha pogut comprovar, en el cas dels bacteris amonioxidants, que els bacteris característics del reactor SHARON són diferents dels de la planta pilot, la qual cosa comporta valors dels paràmetres del model totalment diferents. El calibratge del model a la planta pilot ha permès observar també les diferències entre els bacteris amonioxidants i els bacteris nitròxidants pel que fa a l'afinitat per l'oxigen, l'efecte del pH, la velocitat màxima de creixement... A més, la planta pilot va ser operada en una primera etapa amb la inclusió d'un reactor BABE en l'esquema d'operació, que posteriorment va ser eliminat, la qual cosa ha permès observar l'efecte que té la presència d'aquest reactor sobre els bacteris calibrats.

Finalment, el model desenvolupat ha sigut validat en el reactor SHARON per mitjà de l'ajustament del model als resultats experimentals obtinguts a partir del seguiment analític d'aquests reactors. Les simulacions realitzades utilitzant el model matemàtic amb el conjunt de paràmetres obtinguts, implementat en el programari DESASS, reproduïxen amb precisió els resultats experimentals dels reactors.

## SUMMARY

The problems resulting from the accumulation of nitrogen and phosphorus from discharges of wastewater to sea, rivers and lakes have increased researches about new technologies and methods for wastewater treatment, mainly based on biological processes. Biological processes taking place in a WWTP consist of biochemical transformations carried out by microorganisms during their growth.

Mathematical modeling of bacterial growth processes responsible for the wastewater treatment is essential for WWTP design, simulation and optimal control. Traditionally, the nitrification process, carried out by two groups of bacteria, was modeled as a single-stage process in which the ammonium was oxidized to nitrate. However, the development of new technologies and the emergence of problems caused by the accumulation of nitrite in some WWTPs make necessary to consider the nitrite as a new component in biological models. This fact led to the development of several models that considers the nitrification as a two-stage process: firstly, ammonia is oxidized to nitrite and subsequently nitrite is oxidized to nitrate. Modeling nitrification process considering nitrite as a model component involves also the modification of other processes like the growth of heterotrophic bacteria using nitrite instead of nitrate as electron acceptor.

Although there are several models in the literature that considers the nitrification as a two-stage process, not yet there is a model considering nitrite as a model component, widely accepted by the scientific community. There is not a general model appropriate to address the above mentioned issues and to provide a range of parameter values to reproduce adequately reliable transformations of nitrite in activated sludge systems. In addition, there is not a defined calibration methodology for these models to determine the values of the parameters included in these models. Therefore, the main objectives of this thesis are to develop a general model of nitrification process that considers both the oxidation of ammonium to nitrite and the oxidation of nitrite to nitrate, and to develop the calibration methodology for the parameters of the bacteria involved. Aimed at validating the model in two operation systems with completely different characteristics (a laboratory scale SHARON reactor and activated sludge pilot plant) two calibration methodologies have been developed. As the evaluated systems were different these methodologies were different too. The calibration methodology of the SHARON reactor includes only the determination of the parameters values for ammonia-oxidizing bacteria (AOB) because these bacteria are the only ones present in this reactor. By contrast, in the activated sludge from the pilot plant both ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) are present. The

calibration methodology includes the determination of the parameters of each group of bacteria. The calibration methodologies are mainly based on respirometric batch experiments performed in the laboratory and the individual study of the different processes involved. These methodologies have been developed with a special emphasis on simplicity. They can be applied as often as necessary as they do not need a specific laboratory equipment or particularly complex laboratory techniques.

The developed calibration methodologies have been applied in each of the aforementioned systems. The application of these methodologies and the FISH technique for monitoring of bacterial populations present in both systems have demonstrated that the ammonia-oxidizing bacteria present in the SHARON reactor are different from the ammonia-oxidizing bacteria present in the pilot plant. Different bacteria involved completely different values of the model parameters. The model calibration in the pilot plant has also shown the differences between ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria, as oxygen affinity, effect of pH, maximum growth rate,... In addition, the pilot plant was operated according to two different treatment schemes. The first one included a BABE reactor to enhance nitrification process. In the second one the BABE reactor was removed, making it possible to observe the effect of the presence of this reactor on AOB and NOB model parameters.

Finally, the model has been validated in the SHARON reactor by the fit of model predictions to the experimental results obtained in these reactors. Simulations carried out using the mathematical model with the obtained parameters reproduce accurately the experimental results of these reactors.

***Índice.***



## Índice general.

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>3</b>
1.1	GENERALIDADES DEL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.	3
1.1.1	Introducción.	3
1.1.2	Contaminación del medio natural.	4
1.1.3	Los nutrientes en las aguas residuales.	6
1.1.3.1	El nitrógeno en las aguas residuales.	6
1.1.3.1.1	Formas del nitrógeno.	6
1.1.3.1.2	Problemas del nitrógeno como contaminante.	7
1.1.3.2	El fósforo en las aguas residuales.	9
1.1.4	Métodos en la depuración de aguas residuales.	9
1.1.5	Procesos de eliminación biológica de nutrientes.	12
1.1.5.1	Procesos de eliminación biológica de nitrógeno.	12
1.1.5.1.1	Nitrificación.	13
1.1.5.1.2	Desnitrificación.	14
1.1.5.1.3	Esquemas de tratamiento.	15
1.1.5.2	Procesos de eliminación biológica de fósforo.	17
1.2	NUEVOS PROCESOS BIOLÓGICOS PARA LA ELIMINACIÓN DEL NITRÓGENO AMONIACAL.	18
1.2.1	Procesos de Nitrificación – Desnitrificación simultáneos (proceso SND).	19
1.2.2	Proceso de nitrificación parcial – desnitrificación (proceso SHARON).	20
1.2.3	Proceso de oxidación de amonio en condiciones anaerobias (proceso ANAMMOX).	23
1.2.4	Combinación de los procesos de nitrificación parcial y ANAMMOX.	24
1.2.5	Procesos para eliminación de N con oxígeno limitado (procesos CANON y OLAND).	25
1.2.6	Oxidación desnitrificante de amonio (proceso DEAMOX).	27
1.2.7	Proceso de incremento de la biomasa nitrificante (Proceso BABE).	28
1.2.8	Comparación de los diferentes procesos de eliminación de nitrógeno.	30
1.3	BACTERIAS RESPONSABLES DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN.	33
1.3.1	Clasificación y características de las bacterias.	33
1.3.2	Ecología y detección de las bacterias.	35
1.3.2.1	Técnica de hibridación in situ (FISH).	37
1.3.3	Metabolismo de las bacterias.	40
1.3.3.1	Bioquímica de las bacterias amonioxidantes.	40
1.3.3.2	Bioquímica de las bacterias nitritoxidantes.	41
1.3.4	Factores que afectan al crecimiento de las bacterias.	42
1.4	MODELACIÓN MATEMÁTICA EN EL TRATAMIENTO DE LAS AGUAS RESIDUALES.	47
1.4.1	Modelación de los procesos biológicos.	48
1.4.1.1	Bases del crecimiento microbiano: La cinética de Monod.	48
1.4.1.2	Estequiometría y cinética de los procesos biológicos.	50
1.4.1.3	Formato y notación.	52
1.4.2	Modelos existentes en el tratamiento de aguas residuales.	54
1.4.2.1	Modelos matemáticos para el proceso de fangos activados.	54

1.4.2.2	Modelos matemáticos para el proceso de digestión anaerobia .....	56
1.4.2.3	Integración de procesos en un solo modelo biológico general. ....	61
1.4.3	Biological Nutrient Removal Model No.1 (BNRM1). ....	61
1.4.3.1	Componentes y procesos del modelo. ....	62
1.4.3.1.1	Componentes del modelo. ....	62
1.4.3.1.2	Procesos cinéticos. ....	65
1.4.3.1.3	Procesos de equilibrio acido-base. Calculo del pH. ....	65
1.4.3.2	Ecuaciones de continuidad. ....	68
1.5	MODELACIÓN DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN. ....	70
1.5.1	Modelos de nitrificación en una etapa versus nitrificación en dos etapas. ....	70
1.5.2	Revisión de los principales modelos de nitrificación vía nitrito. ....	71
1.6	CALIBRACIÓN DE MODELOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES. ....	75
1.6.1	Metodologías de calibración. ....	76
1.6.1.1	Calibración en estado estacionario. ....	76
1.6.1.2	Calibración dinámica. ....	77
1.6.1.3	Calibración off-line en laboratorio. ....	77
1.6.1.3.1	Técnicas respirométricas. ....	78
1.6.2	Protocolos de calibración. ....	79
1.6.2.1	Protocolo de Calibración BIOMATH (Vanrolleghem et al., 2003). ....	79
1.6.2.2	Protocolo de Calibración STOWA (Hulsbeek et al., 2002) ....	81
1.6.2.3	Protocolo de Calibración HSG (Langergraber et al., 2004). ....	83
1.6.2.4	Protocolo de Calibración WERF (Melcer et al., 2003). ....	85
1.7	CALIBRACIÓN DE BACTERIAS AMONIOXIDANTES Y NITRITOXIDANTES. ....	86
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS. ....</b>	<b>91</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>97</b>
3.1	MÉTODOS DE ANÁLISIS. ....	97
3.1.1	Analíticas de seguimiento en los reactores SHARON. ....	97
3.1.2	Analíticas de seguimiento en la planta piloto. ....	99
3.2	REACTOR SHARON A ESCALA LABORATORIO. ....	101
3.2.1	Montaje de los reactores. ....	101
3.2.2	Características del agua residual influente. ....	102
3.2.3	Operación de los reactores SHARON. ....	102
3.3	PLANTA PILOTO DE AGUAS RESIDUALES CON ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES. ....	108
3.3.1	Descripción de la planta piloto. ....	108
3.3.2	Equipos de medición de la planta piloto. ....	111
3.3.3	Operación de la planta piloto. ....	112
3.4	DESCRIPCIÓN DEL MONTAJE EXPERIMENTAL PARA LA CALIBRACIÓN DE PARÁMETROS. ....	115
3.4.1	Montaje para experimentos con fango del reactor SHARON. ....	115
3.4.2	Montaje para experimentos con fango de la planta piloto. ....	117
<b>4</b>	<b>MODELO MATEMÁTICO DEL PROCESO DE NITRIFICACIÓN EN DOS ETAPAS. ....</b>	<b>123</b>
4.1	INTRODUCCIÓN. ....	123
4.2	CONSIDERACIONES ESTABLECIDAS. ....	124

4.2.1	Componentes del modelo. ....	125
4.2.2	Procesos del modelo. ....	126
4.2.3	Dependencia con la temperatura. ....	136
4.3	RESUMEN DEL MODELO DE NITRIFICACIÓN EN DOS ETAPAS DESARROLLADO. ....	137
4.4	INCORPORACIÓN DEL MODELO DESARROLLADO AL MODELO BNRM1. ....	140
<b>5</b>	<b>DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE CALIBRACIÓN DEL MODELO. ....</b>	<b>145</b>
5.1	DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE CALIBRACIÓN PARA FANGO DEL REACTOR SHARON. ....	146
5.1.1	Determinación de la constante de semisaturación del oxígeno. ....	147
5.1.2	Determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del $\text{NH}_3$ . ....	148
5.1.3	Determinación de la constante de inhibición del $\text{HNO}_2$ . ....	151
5.1.4	Determinación de las constantes de inhibición del pH. ....	152
5.1.5	Determinación del efecto de la temperatura en la actividad de las bacterias. ....	153
5.1.6	Determinación del rendimiento celular de las bacterias. ....	154
5.1.7	Determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias. ....	155
5.2	DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE CALIBRACIÓN PARA FANGO DE LA PLANTA PILOTO. ....	156
5.2.1	Determinación del método para medir de forma independiente la actividad de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en cultivos mixtos. ....	157
5.2.1.1	Inhibidor específico de la actividad de las bacterias. ....	158
5.2.1.2	Método de adiciones sucesivas. ....	160
5.2.2	Experimentos para la calibración de los parámetros de bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en cultivos mixtos. ....	161
5.2.2.1	Calibración de parámetros de bacterias nitritoxidantes presentes en la planta piloto. ....	164
5.2.2.1.1	Determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del $\text{HNO}_2$ . ....	164
5.2.2.1.2	Determinación de la constante de inhibición por $\text{NH}_3$ . ....	165
5.2.2.1.3	Determinación de la constante de semisaturación del oxígeno. ....	166
5.2.2.1.4	Determinación de las constantes de inhibición del pH. ....	167
5.2.2.1.5	Determinación del rendimiento celular de las bacterias. ....	168
5.2.2.1.6	Determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias. ....	168
5.2.2.2	Calibración de parámetros de bacterias amonioxidantes presentes en la planta piloto. ....	169
5.2.2.2.1	Determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del $\text{NH}_3$ . ....	169
5.2.2.2.2	Determinación de la constante de inhibición por $\text{HNO}_2$ . ....	170
5.2.2.2.3	Determinación de la constante de semisaturación de oxígeno. ....	171
5.2.2.2.4	Determinación de las constantes de inhibición del pH. ....	172
5.2.2.2.5	Determinación del rendimiento celular de las bacterias. ....	172
5.2.2.2.6	Determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias. ....	173
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE PARÁMETROS. ....</b>	<b>177</b>
6.1	CALIBRACIÓN DE BACTERIAS AMONIOXIDANTES PRESENTES EN UN REACTOR SHARON A ESCALA LABORATORIO. ....	178
6.1.1	Constante de semisaturación del oxígeno ( $K_{\text{O}_2}$ ) de las bacterias amonioxidantes. ....	178
6.1.2	Constantes de semisaturación e inhibición del amoníaco ( $K_{\text{NH}_3}/K_{\text{INH}_3}$ ) de las bacterias amonioxidantes. ....	183
6.1.3	Constante de inhibición del ácido nitroso ( $K_{\text{HNO}_2}$ ) de las bacterias amonioxidantes. ....	191

6.1.4	Constantes de inhibición del pH ( $K_H/K_{IH}$ ) de las bacterias amonioxidantes.....	194
6.1.5	Efecto de la temperatura sobre la actividad de las bacterias amonioxidantes. ....	201
6.1.6	Rendimiento celular de las bacterias amonioxidantes ( $Y_{NH}$ ). ....	206
6.1.7	Tasa máxima de crecimiento de las bacterias amonioxidantes ( $\mu_{NH}$ ). ....	211
6.1.8	Simulaciones de los reactores SHARON operados en el laboratorio.....	213
6.1.8.1	Simulación del reactor SHARON $R_1$ . Determinación de la tasa de lisis de las bacterias amonioxidantes. ....	214
6.1.8.2	Simulación del reactor SHARON $R_2$ . Determinación de la capacidad máxima de tratamiento del reactor. ....	216
6.2	CALIBRACIÓN DE BACTERIAS DESARROLLADAS EN UNA PLANTA PILOTO DE FANGOS ACTIVADOS. ....	221
6.2.1	Método para medir independientemente las actividades de bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en cultivos mixtos.....	222
6.2.2	Determinación de parámetros de las bacterias nitritoxidantes.....	227
6.2.2.1	Constantes de semisaturación e inhibición del ácido nitroso ( $K_{HNO_2}/K_{IHNO_2}$ ). ....	227
6.2.2.2	Constante de inhibición del amoníaco ( $K_{INH_3}$ ). ....	230
6.2.2.3	Constante de semisaturación del oxígeno ( $K_{O_2}$ ). ....	232
6.2.2.4	Constantes de inhibición del pH ( $K_H/K_{IH}$ ). ....	236
6.2.2.5	Rendimiento celular de las bacterias nitritoxidantes ( $Y_{NO}$ ). ....	238
6.2.2.6	Tasa máxima de crecimiento de las bacterias nitritoxidantes ( $\mu_{NO}$ ). ....	240
6.2.3	Determinación de parámetros de las bacterias amonioxidantes. ....	242
6.2.3.1	Constantes de semisaturación e inhibición del amoníaco ( $K_{NH_3}/K_{INH_3}$ ). ....	242
6.2.3.2	Constante de inhibición del ácido nitroso ( $K_{IHNO_2}$ ). ....	245
6.2.3.3	Constante de semisaturación del oxígeno ( $K_{O_2}$ ). ....	247
6.2.3.4	Constantes de inhibición del pH ( $K_H/K_{IH}$ ). ....	250
6.2.3.5	Rendimiento celular de las bacterias amonioxidantes ( $Y_{NH}$ ). ....	253
6.2.3.6	Tasa máxima de crecimiento de las bacterias amonioxidantes ( $\mu_{NH}$ ). ....	255
6.3	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS CALIBRADOS EN LOS SISTEMAS ESTUDIADOS. ....	256
6.4	POTENCIALES APLICACIONES DEL MODELO DESARROLLADO Y LAS METODOLOGÍAS DE CALIBRACIÓN PROPUESTAS. ....	264
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES. ....</b>	<b>269</b>
	<b>ANEXO I. SOFTWARE DE SIMULACIÓN DESASS. ....</b>	<b>277</b>
	<b>REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>285</b>

## Relación de Figuras.

Figura 1. Formas y fracciones del nitrógeno en las aguas residuales.....	7
Figura 2. Formas del fósforo en las aguas residuales.....	9
Figura 3. Esquema simple de una EDAR.....	12
Figura 4. Transformaciones del nitrógeno en los procesos de tratamiento biológico (Metcalf y Eddy, 1995).....	12
Figura 5. Esquemas de eliminación biológica de nitrógeno. (a) Wuhrmann, (b) Ludzack-Ettinger, (c) Ludzack-Ettinger modificado, (d) Canal de oxidación, (e) Bardenpho.....	16
Figura 6. Esquema del perfil de OD dentro de los flóculos microbianos. Pochana y Keller, 1999.....	19
Figura 7. Ruta metabólica para nitrificación-desnitrificación.....	21
Figura 8. Posibles rutas metabólicas para el proceso ANAMMOX.....	23
Figura 9. Proceso combinado nitrificación parcial – Anammox.....	24
Figura 10. Esquema mejorado del proceso combinado nitrificación parcial – Anammox.....	25
Figura 11. Esquema y reacciones del proceso DEAMOX.....	28
Figura 12. Esquema del proceso BABE.....	29
Figura 13. Diagramas de flujo de: (a) nitrificación – desnitrificación convencional, (b) procesos SND, (c) nitrificación parcial – desnitrificación, (d) nitrificación parcial – Anammox, (e) proceso CANON/OLAND, (f) Proceso Deamox, (g) Proceso BABE.....	31
Figura 14. Tiempo de retención celular (TRC) mínimo para las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en función de la temperatura.....	45
Figura 15. Esquema de reacciones propuesto para la digestión anaerobia del fango (Gujer y Zehnder, 1983).....	59
Figura 16. Esquema del proceso de resolución de las ecuaciones en estado estacionario y transitorio.....	68
Figura 17. Esquema general del protocolo de calibración BIOMATH (Vanrolleghem et al. 2003).....	80
Figura 18. Esquema general del protocolo de calibración STOWA (Hulsbeek et al., 2002).....	82
Figura 19. Organigrama de calibración con las pautas del protocolo HSG (Langergraber et al., 2004).....	85
Figura 20. Esquema y fotografía del montaje experimental de los reactores SHARON.....	101
Figura 21. Evolución de la concentración de amonio y nitrito en los dos reactores SHARON operados: Reactor R <sub>1</sub> (superior) y reactor R <sub>2</sub> (inferior). En el R <sub>2</sub> las líneas rojas punteadas separan etapas con diferentes TRC.....	105
Figura 22. Esquema general y fotografías de la planta piloto con la configuración de operación mantenida durante la fase experimental. (a) Vista frontal, (b) Vista lateral.....	109
Figura 23. Evolución de la eliminación y las concentraciones de amonio y fósforo en la planta piloto durante el periodo experimental.....	114
Figura 24. Esquema y fotografía del montaje experimental para la determinar los parámetros bacterianos del reactor SHARON.....	116
Figura 25. Esquema del montaje experimental para determinar los parámetros bacterianos del fango de la planta piloto.....	117
Figura 26. Esquema experimental del montaje para fango en condiciones endógenas.....	118
Figura 27. Diagrama de los procesos y componentes involucrados en el modelo del proceso de nitrificación en dos etapas.....	127
Figura 28. Diagrama de los procesos de catabolismo y anabolismo en el crecimiento de las bacterias amonioxidantes.....	128
Figura 29. Diagrama de los procesos de catabolismo y anabolismo en el crecimiento de las bacterias nitritoxidantes.....	132

Figura 30. Secuencia seguida en el calibrado de los parámetros de las bacterias amonioxidantes en un reactor SHARON a escala laboratorio. ....	147
Figura 31. Esquema básico de los experimentos para la determinación de las constantes de inhibición y semisaturación de $\text{NH}_3$ en el reactor SHARON.....	149
Figura 32. Esquema básico de los experimentos para la determinación de la constante de inhibición por $\text{HNO}_2$ en el reactor SHARON.....	151
Figura 33. Esquema básico de los experimentos para la determinación de las constantes de inhibición por pH en el reactor SHARON.....	152
Figura 34. Esquema básico de los experimentos para el estudio del efecto de la temperatura sobre la biomasa del reactor SHARON.....	154
Figura 35. Esquema básico del método de inhibición de nitritoxidantes.....	159
Figura 36. Esquema básico del método de adiciones sucesivas de $\text{NO}_2$ y $\text{NH}_4$ de Moussa et al. ....	161
Figura 37. Secuencia seguida en el calibrado de los parámetros de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en una planta de tratamiento de aguas residuales a escala piloto.....	163
Figura 38. Esquema básico del procedimiento a seguir para la determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del $\text{HNO}_2$ de las bacterias nitritoxidantes. ....	164
Figura 39. Esquema básico a seguir para la determinación de la constante de inhibición del $\text{NH}_3$ de las bacterias nitritoxidantes.....	165
Figura 40. Esquema básico de los ensayos para determinación de las constantes de pH de las bacterias nitritoxidantes.....	167
Figura 41. Esquema básico a seguir para la determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del $\text{NH}_3$ de las bacterias amonioxidantes. ....	169
Figura 42. Esquema básico a seguir para la determinación de la constante de inhibición del $\text{HNO}_2$ de las bacterias amonioxidantes.....	170
Figura 43. Esquema básico de los ensayos para determinación de las constantes de pH de las bacterias amonioxidantes. ....	172
Figura 44. Resultados experimentales de los ensayos para la determinación de la constante $K_{O_2}$ en el reactor SHARON. ....	179
Figura 45. Resultados del ajuste del modelo a la evolución del OD determinado en los experimentos. ....	181
Figura 46. Evolución de la OUR ( $\text{mg O}_2/\text{ld}$ ) con el tiempo a las concentraciones de TAN ( $\text{mg N-NH}_4/\text{l}$ ) evaluadas en el ensayo respirométrico nº 3 llevado a cabo a pH 7.....	184
Figura 47. Actividad de las bacterias amonioxidantes expresada en porcentaje de la OUR máxima frente a la concentración de TAN (a y b) y la concentración de amoníaco (c y d).....	186
Figura 48. Evolución de la OUR ( $\text{mg O}_2/\text{ld}$ ) con el tiempo a las concentraciones de sal ( $\text{mol/l}$ ) evaluadas en los ensayos respirométricos nº 10 y nº 14, llevados a cabo a pH 7.....	189
Figura 49. Evolución de la OUR ( $\text{mg O}_2/\text{ld}$ ) en función de la salinidad ( $\text{mol/l}$ ) a lo largo de todos los experimentos realizados agrupados según la sal empleada (experimentos del 1 al 15). ....	190
Figura 50. Evolución de la OUR ( $\text{mg O}_2/\text{ld}$ ) en el tiempo a las concentraciones de nitrito ( $\text{mg N-NO}_2/\text{l}$ ) evaluadas en el ensayo llevado a cabo a pH 6.25.....	192
Figura 51. Actividad de las bacterias amonioxidantes expresada en porcentaje de la OUR máxima frente a la concentración de TNO2 (superior) y la concentración de ácido nitroso (inferior). ....	193
Figura 52. Resultado del experimento nº 2 para la calibración de las constantes de inhibición del pH. Evolución de la OUR con el tiempo (izquierda) y evolución de la OUR en función del pH (derecha).....	195
Figura 53. Ajuste de la función OUR-pH para dos de los experimentos usando una función con ajuste simétrico a ambos lados del pH óptimo y otra función con ajuste asimétrico. ....	196

Figura 54. OUR medida (%) frente al pH en los 9 ensayos realizados. ....	196
Figura 55. Ajuste del modelo matemático a los datos experimentales. OUR (%) frente al pH. ....	198
Figura 56. Variación del pH medio en el reactor $R_1$ y su relación con el pH óptimo de las bacterias amonioxidantes obtenido en el ajuste de los datos experimentales. ....	200
Figura 57. Comparación de los resultados experimentales de dos de los ensayos de cada uno de los grupos establecidos (Exp 2 de la primera etapa y Exp 9 de la segunda). ....	200
Figura 58. Experimentos para el estudio del efecto de la temperatura en fango del reactor SHARON. Experimentos 1 y 2 con fango aclimatado a 30°C. Experimentos 3 y 4 con fango aclimatado a 35 °C. ....	202
Figura 59. Resultados experimentales de todos los ensayos de $T^a$ normalizados respecto a la OUR máxima. ...	202
Figura 60. Evolución de la OUR a temperatura constante de 35 °C (izquierda) y 40 °C (derecha). ....	203
Figura 61. Resultados de los ajustes de los modelos de Arrhenius (figura superior) y Ratkowsky modificado (figura inferior) a los resultados experimentales. ....	205
Figura 62. Evolución de la OUR y concentración de TAN de los ensayos para la determinación de la $Y_{NH}$ del fango del reactor SHARON. ....	207
Figura 63. Determinación del consumo de OD debido a la actividad endógena en una muestra de fango del reactor SHARON. ....	208
Figura 64. Relación entre el rendimiento observado de las bacterias heterótrofas y $S_0/X_0$ . Chang et al (1993) y Liu et al (1996). ....	209
Figura 65. Relación entre la $Y$ experimentalmente y la relación $S_0/X_0$ . ....	210
Figura 66. Proceso a seguir para la determinación de la $\mu_{NH}$ . ....	212
Figura 67. Efecto del TRC y la $T$ (observado en los experimentos y en las simulaciones) en la concentración de amonio y nitrito. ....	218
Figura 68. Evolución del proceso de nitrificación con el TRC del reactor SHARON. Concentraciones de TAN y TNO2 obtenidas por simulación (a y c) y corregidas por evaporación (b y d). ....	219
Figura 69. Evolución de la alcalinidad en el reactor SHARON a medida que se incrementa el TRC obtenida por simulación del sistema. ....	221
Figura 70. Actividad de las bacterias nitrificantes en ausencia y presencia de alitiourea. ....	223
Figura 71. Actividad de las bacterias nitrificantes en presencia de diferentes concentraciones de $NaClO_3$ . ...	224
Figura 72. Actividad de las bacterias amonioxidantes en ausencia y presencia de 50 mM $ClO_3^-$ . ....	225
Figura 73. Experimento para evaluar la validez del método de adiciones consecutivas. ....	226
Figura 74. Actividad de las bacterias nitrificantes expresada en porcentaje de OUR máxima frente a la concentración de TNO2 (superior) y la concentración de $HNO_2$ (inferior). ....	229
Figura 75. Evolución en el tiempo de la actividad de las bacterias a medida que se incrementa la concentración de TAN ( $mg\ N-NH_4/l$ ). ....	231
Figura 76. Resultados experimentales de los ensayos para la determinación de la $K_{O_2}$ de las bacterias nitrificantes de la planta piloto. ....	233
Figura 77. Resultados del ajuste para la determinación de la constante $K_{O_2}$ de las bacterias nitrificantes en planta piloto. ....	235
Figura 78. Efecto del pH en la actividad de las bacterias nitrificantes presentes en la planta piloto. ....	236
Figura 79. Ensayos para la determinación de las constantes de inhibición del pH para las NOB. ....	237
Figura 80. Evolución de la OUR en ensayos para la determinación de la $Y_{NO}$ de la planta piloto. ....	239
Figura 81. Actividad de las bacterias amonioxidantes expresada en porcentaje de OUR máxima frente a la concentración de TAN (superior) y la concentración de $NH_3$ (inferior). ....	244

Figura 82. Actividad de las bacterias amonioxidantes expresada como OUR (%) frente a la concentración de $\text{HNO}_2$ (superior) y de $\text{TNO}_2$ (inferior). .....	246
Figura 83. Resultados experimentales de los ensayos para la determinación de la $K_{O_2}$ de las bacterias amonioxidantes de la planta piloto. ....	248
Figura 84. Resultados del ajuste para la determinación de la constante $K_{O_2}$ de bacterias amonioxidantes en planta piloto. ....	250
Figura 85. Efecto del pH en la actividad de las bacterias amonioxidantes presentes en la planta piloto. ....	251
Figura 86. Ensayos para la determinación de las constantes de inhibición del pH para las AOB. ....	252
Figura 87. Evolución de la OUR en ensayos para la determinación de la $Y_{AUT}$ de la planta piloto. ....	254
Figura 88. OUR frente a salinidad en los experimentos realizados con fango procedente del reactor SHARON y de la planta piloto. ....	257
Figura 89. Comparación de funciones de inhibición de las b. amonioxidantes por $\text{HNO}_2$ determinadas para el reactor SHARON y la planta piloto. ....	258
Figura 90. Comparación de funciones de Monod del OD de las b. amonioxidantes determinadas para el reactor SHARON y la planta piloto. ....	259
Figura 91. Comparación de funciones de inhibición de las b. amonioxidantes por pH determinadas para el reactor SHARON y la planta piloto. ....	260
Figura 92. Variación del rendimiento celular en función de la relación $S_0/X_0$ en los ensayos del reactor SHARON y de la planta piloto. ....	261
Figura 93. Pantalla del simulador DESASS. Ejemplo de esquema de operación. ....	279

## Relación de Tablas.

Tabla 1. Tipos de contaminación según el origen del vertido.....	5
Tabla 2. Efectos negativos de la acumulación de compuestos nitrogenados.....	8
Tabla 3. Tratamientos físicos, químicos y biológicos de las aguas residuales. ....	10
Tabla 4. Clasificación de bacterias amonioxidantes y bacterias nitritoxidantes. ....	34
Tabla 5. Características de las bacterias amonioxidantes.....	35
Tabla 6. Características de las bacterias nitritoxidantes. ....	35
Tabla 7. Sondas FISH publicadas para hibridar sobre el 16S rRNA de los organismos relevantes más comunes en la oxidación de amonio y nitrito. ....	39
Tabla 8. Notación matricial para el crecimiento de las bacterias heterótrofas bajo condiciones aerobias. ....	53
Tabla 9. Componentes solubles del modelo BNRM1. ....	63
Tabla 10. Componentes particulados del modelo BNRM1. ....	64
Tabla 11. Procesos cinéticos considerados en el modelo. ....	65
Tabla 12. Ecuaciones del modelo para los procesos de disociación. $\{i\}$ actividad de la especie $i$ , $[i]$ concentración de la especie $i$ , $Z_T$ concentración total del componente $Z$ . ....	67
Tabla 13. Factores de conversión $i_{c,i}$ aplicados en las ecuaciones de continuidad del modelo. ....	69
Tabla 14. Valores de los factores de conversión para la biomasa obtenidos considerando la composición de las biomasa como $C_5H_7NO_2P_{0.09}$ . ....	69
Tabla 15. Principales modelos de nitrificación vía nitrito y agua residual en la que se han desarrollado.....	71
Tabla 16. Características más relevantes de los principales modelos de nitrificación vía nitrito. ....	73
Tabla 17. Niveles de calibración propuestos en el protocolo de WERF (Melcer y col., 2003). ....	86
Tabla 18. Análíticas de seguimiento de los reactores SHARON.....	98
Tabla 19. Sondas de hibridación empleadas en la identificación de organismos amonioxidantes, nitritoxidantes y desnitrificantes. ....	99
Tabla 20. Análíticas de seguimiento de la planta piloto.....	100
Tabla 21. Análíticas exhaustivas de la planta piloto. ....	100
Tabla 22. Composición del agua sintética usada en el influente de los reactores.....	102
Tabla 23. Condiciones de operación en el reactor SHARON $R_2$ para el estudio de la capacidad máxima de tratamiento del sistema. ....	107
Tabla 24. Caudales empleados y datos de diseño del esquema de operación de la planta piloto. ....	111
Tabla 25. Resultados de análisis de FISH llevado a cabo en la planta piloto.....	115
Tabla 26. Componentes del modelo de nitrificación en dos etapas. ....	126
Tabla 27. Ecuaciones del modelo desarrollado para los procesos de disociación (valores a 20°C). ....	136
Tabla 28. Matriz estequiométrica de los procesos del modelo desarrollado. ....	138
Tabla 29. Expresiones cinéticas de los procesos del modelo. ....	139
Tabla 30. Procesos y componentes del modelo desarrollado a incorporar al modelo BNRM1. ....	141
Tabla 31. Parámetros a determinar en el modelo desarrollado.....	145
Tabla 32. Valores de las constantes obtenidas en el ajuste para la determinación de $K_{O_2}$ y pH medio registrado en cada uno de los ensayos realizados. ....	180
Tabla 33. Valores de $K_{O_2}$ determinados en esta tesis y en otros estudios consultados.....	182
Tabla 34. Concentraciones de TAN (mg N-NH <sub>4</sub> /l) evaluadas en cada experimento. ....	183
Tabla 35. Concentraciones de TAN y NH <sub>3</sub> , y OUR (en %) a cada pH evaluado. ....	186
Tabla 36. Sales empleadas en los ensayos para determinar la inhibición por salinidad. ....	187

Tabla 37. Concentraciones de sal (mol/l) evaluadas en cada uno de los experimentos. ....	187
Tabla 38. Concentraciones de TNO <sub>2</sub> (mg N-NO <sub>2</sub> /l) evaluadas en cada experimento. ....	192
Tabla 39. Concentraciones de amonio y nitrito (mg/l) evaluadas en cada experimento. ....	194
Tabla 40. Parámetros obtenidos en el ajuste del modelo desarrollado a los datos experimentales. ....	197
Tabla 41. Valores de rendimiento de las bacterias amonioxidantes determinados experimentalmente. ....	208
Tabla 42. Parámetros obtenidos en la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias AOB presentes en el reactor SHARON. ....	213
Tabla 43. Características del agua de entrada y condiciones de operación del reactor SHARON simulado. ....	214
Tabla 44. Valores de los parámetros estequiométricos y cinéticos de las bacterias amonioxidantes usados en la simulación. ....	215
Tabla 45. Comparación de los resultados de la simulación con los experimentales para el estado estacionario del reactor SHARON R <sub>1</sub> . ....	216
Tabla 46. Concentraciones de nitrito evaluadas en cada una de los ensayos y pH al que fueron llevados a cabo los experimentos. ....	228
Tabla 47. Valores de pH a los que se llevaron a cabo los experimentos. ....	236
Tabla 48. Concentración de nitrito añadido en cada ensayo y valor de Y <sub>NO</sub> determinado. ....	240
Tabla 49. Parámetros obtenidos en la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias NOB presentes en la planta piloto. ....	241
Tabla 50. Cambios en la población de bacterias AOB y NOB en la planta piloto. ....	242
Tabla 51. Concentraciones de amonio evaluadas en cada una de los ensayos y pH al que fueron llevados a cabo los experimentos. ....	243
Tabla 52. Concentraciones de nitrito evaluadas en cada una de los ensayos y pH al que fueron llevados a cabo los experimentos. ....	245
Tabla 53. Valores de pH a los que se llevaron a cabo los experimentos. ....	251
Tabla 54. Concentración de amonio añadido en cada ensayo y valor de Y <sub>NH</sub> determinado. ....	255
Tabla 55. Parámetros obtenidos en la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias AOB presentes en la planta piloto. ....	255
Tabla 56. Parámetros de las bacterias amonioxidantes presentes en los sistemas de operación estudiados. ...	256
Tabla 57. Resultados de análisis de FISH llevado a cabo en los dos sistemas estudiados. ....	262

**Acrónimos y nomenclatura.**

<b>ADM</b>	Anaerobic Digestion Model
<b>AGCL</b>	Ácidos grasos de cadena larga
<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles
<b>AOB</b>	Ammonium Oxidizing Bacteria, Bacterias Amoniooxidantes
<b>ANAMMOX</b>	Anaerobic Ammonia Oxidation
<b>AMO</b>	Enzima amonio monooxigenasa
<b>ASM</b>	Activated Sludge Model
<b>ASP</b>	Amnesic shellfish poisoning
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate
<b>ATU</b>	Alitiourea
<b>BABE</b>	Bio-Augmentation Batch Enhanced
<b>BNRM1</b>	Biological Nutrient Removal Model N°1
<b>CALAGUA</b>	CALidad del AGUA
<b>CANON</b>	Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite
<b>C:N</b>	Relación carbono:nitrógeno
<b>DAPI</b>	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DBO</b>	Demanda Biológica de Oxígeno
<b>DEAMOX</b>	Denitrifying Ammonium Oxidation
<b>DESASS</b>	Design and Simulation of Activated Sludge Systems
<b>DQO</b>	Demanda Química de Oxígeno
<b>EDAR</b>	Estación Depuradora de Aguas Residuales
<b>EAWAG</b>	Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology, siglas en alemán
<b>FISH</b>	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
<b>HAO</b>	Enzima oxidorreductasa hidroxilamina
<b>HSG</b>	Hochschulgruppe
<b>IAWPRC</b>	International Association on Water Pollution Research and Control
<b>IC</b>	Inorganic Carbon, carbono inorgánico
<b>IVF</b>	Índice volumétrico de fangos
<b>IWA</b>	International Water Association
<b>NKT</b>	Nitrógeno Kjeldhal
<b>NMP</b>	Técnica del numero más probable
<b>NOB</b>	Bacterias Nitritoxidantes, Nitrite Oxidizing Bacteria
<b>NOH</b>	Enzima ligada nitroxilo
<b>NSP</b>	Neurotoxic shellfish poisoning
<b>OD</b>	Oxígeno Disuelto
<b>OLAND</b>	Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification
<b>OUR</b>	Oxygen Uptake Rate, velocidad de consumo de oxígeno
<b>PAO</b>	Polyphosphate accumulative organisms, Bacterias acumuladoras de polifosfatos
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PHA</b>	Polyhydroxyalkanoatos, polihidroxialcanoatos
<b>PID</b>	Proporcional Integral Derivado
<b>PLC</b>	Programmable Logic Controller
<b>PP</b>	Polyphosphate, polifosfato
<b>PSP</b>	Paralytic shellfish poisoning
<b>RCTA</b>	Reactor continuo de tanque agitado
<b>RWQM1</b>	River Water Quality Model N°1
<b>SBR</b>	Sequencing Batch Reactor, reactor discontinuo secuencial
<b>SHARON</b>	Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite
<b>SND</b>	Simultaneous Nitrification and Denitrification
<b>SST</b>	Sólidos Suspendidos Totales
<b>SSV</b>	Sólidos Suspendidos Volátiles
<b>STOWA</b>	Stichting Toegepast Onderzoek WATERbeheer
<b>TAN</b>	Total Ammonia Nitrogen, concentración total de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$ )
<b>TNO2</b>	Total Nitrite, concentración total de nitrito ( $\text{HNO}_2 + \text{NO}_2^-$ )
<b>TRC</b>	Tiempo de Retención Celular
<b>TRH</b>	Tiempo de Retención Hidráulico
<b>UCT</b>	University of Cape Town
<b>WERF</b>	Water Environment Research Foundation







C  
A  
P  
I  
T  
U  
L  
O  
1

*Introducción.*



## **1 Introducción.**

### **1.1 Generalidades del tratamiento de aguas residuales.**

#### **1.1.1 Introducción.**

El agua es un recurso imprescindible para la vida humana y por ello es necesaria una gestión adecuada de ésta que permita un suministro en buenas condiciones y proteja los recursos hídricos existentes. El aumento de la población en los núcleos urbanos, el desarrollo industrial y la creciente actividad agropecuaria ha aumentado la cantidad de vertidos a medios naturales hasta límites que superan la capacidad de autodepuración de estos medios receptores. Los vertidos están deteriorando *la calidad del agua*, variable importante tanto en lo que respecta a la caracterización ambiental como desde la perspectiva de la planificación hidrológica. Se entiende por calidad de un agua al conjunto de características físicas, químicas y biológicas que hacen que el agua sea apropiada para determinado uso.

Como respuesta al problema de la contaminación de los medios acuáticos se han ido diseñando soluciones factibles para restar el impacto que los vertidos causan al medio. Para asegurar la calidad suficiente requerida en los diferentes usos del agua ha surgido diversa normativa que establece estándares y criterios de calidad específicos que definen los requisitos (expresados como rangos cuantitativos de una serie de características fisicoquímicas y biológicas) que ha de reunir un determinado agua para un fin concreto.

Un agua residual es aquella que procede de la utilización de un agua natural, o de la red, y es recogida mediante una red de alcantarillado para su envío a una planta depuradora. Ya que estas aguas residuales tienen que reunir unos criterios de calidad para su vertido al medio receptor, deben ser sometidas previamente a un tratamiento que permita obtener un agua apta para el vertido. En el tratamiento de las aguas residuales se emplean tanto procesos físicos como procesos químicos y biológicos. Este agua residual una vez tratada pasa a denominarse vertido cuando son desaguadas al medio receptor. La composición del agua residual y el destino de vertido son los factores que más influyen sobre el proceso de depuración de esta. El origen del agua residual es un aspecto determinante de gran parte de sus características físicas, químicas y biológicas. Las aguas se clasifican en dos grupos generales según su origen: aguas residuales urbanas o domésticas y aguas industriales.

### **1.1.2 Contaminación del medio natural.**

Los tipos de contaminación que pueden afectar a un medio natural se clasifican según el factor ecológico que altere, aunque suelen afectar a más de un factor.

- *Contaminación física.* Las sustancias que modifican factores físicos, pueden no ser tóxicas en sí mismas, pero modifican las características físicas del agua (sólidos en suspensión, turbidez y color, tensoactivos, temperatura) y afectan a la biota acuática.

- *Contaminación química.* Algunos efluentes cambian la concentración de los componentes químicos naturales del agua causando niveles anormales de los mismos o introducen sustancias extrañas al medio ambiente acuático. En este sentido es en el que puede hablarse propiamente de contaminación (salinidad, pH, sustancias marcadamente tóxicas, desoxigenación, contaminación por agentes bióticos).

El hecho de que los procesos de contaminación estén cada vez más extendidos ha llevado a que términos como eutrofización sean actualmente cada vez más conocidos. De forma intuitiva se puede definir el proceso de la eutrofización como el enriquecimiento de nutrientes de las aguas superficiales, principalmente nitrógeno en forma de nitrato, nitrito o amonio y fósforo en forma de ortofosfato. Podría parecer que este hecho es bueno para el desarrollo de los seres vivos, sin embargo puede constituir un problema. Si existe exceso de nutrientes crecen en abundancia las plantas y otros organismos por lo que se produce una disminución drástica del contenido de oxígeno en el agua y además se disminuye la transparencia del agua pudiendo provocar la desaparición de la vegetación del fondo. De esta forma, la masa de agua pierde su calidad y las aguas dejan de ser aptas para la vida, y en general, para el uso al que estaban predeterminadas.

La causa de la eutrofización es siempre una aportación de nutrientes de muy diversa procedencia, tanto natural como de origen humano. Las fuentes naturales producen, normalmente, cantidades limitadas de nutrientes. Son, por tanto, los aportes humanos los que favorecen la eutrofización, denominándose *eutrofización antropogénica o cultural*. Estas aportaciones humanas pueden ser de naturaleza muy diversa, dependiendo de la fuente de descarga. Así que en función del origen del vertido, se pueden distinguir diferentes tipos de contaminación de aguas (Tabla 1).

<b>TIPOS DE CONTAMINACIÓN</b>	
<b>A.- FUENTES NATURALES:</b>	
<p>El aporte de nutrientes a un medio acuático de forma natural depende principalmente de sus condiciones geomorfológicas, climáticas y biológicas (poca profundidad que favorece la penetración de la luz, suelos ricos en nutrientes, poco movimiento del agua, climas cálidos, erosión y arrastre de nutrientes por precipitaciones abundantes, rocas sedimentarias que aportan mayor cantidad de fósforo por escorrentía, descomposición y excreción de organismos, fijación de nitrógeno por microorganismos,...).</p>	
<b>B.- FUENTES ANTROPOGÉNICAS:</b>	
<p><b>B.1.- Urbanas o domésticas.</b></p> <p>Las aguas residuales urbanas contienen N y P procedente, principalmente, de los desechos humanos y de los productos de limpieza. Las aguas residuales urbanas presentan una cierta homogeneidad en cuanto a composición y carga contaminante, ya que sus aportes van a ser siempre los mismos. Pero esta homogeneidad tiene unos márgenes muy amplios, ya que las características de cada vertido urbano van a depender del núcleo de población en el que se genere (número de habitantes, la existencia de industrias,...).</p>	<p><b>B.2.- Actividad productiva.</b></p> <p>→ <b>Industrias.</b> En algunos tipos de industria puede darse presencia de nutrientes en sus vertidos. La contaminación de origen industrial es una de las que produce un mayor impacto, por la gran variedad de materiales y fuentes de energía que pueden aportar al agua: materia orgánica, metales pesados, incremento de pH y temperatura, radioactividad, aceites, grasas, etc. Entre las industrias más contaminantes están las petroquímicas, agroalimentarias, energéticas (térmicas, nucleares, hídricas, etc.), papeleras, siderúrgicas, alimenticias, textiles y mineras.</p> <p>→ <b>Agricultura y ganadería.</b> La contaminación de origen agrícola se produce principalmente por el uso de fertilizantes, plaguicidas, pesticidas, biocidas y abonos, que son arrastrados por el agua de riego, llevando consigo sales compuestas de nitrógeno, fósforo, azufre y trazas de elementos organoclorados que pueden llegar al suelo por lixiviado y contaminar las aguas subterráneas. En las explotaciones ganaderas, la contaminación procede de restos orgánicos que caen al suelo y de vertidos de aguas cargadas de materia orgánica.</p> <p>→ <b>Otras.</b> Otras fuentes de contaminación de origen antropogénico son los vertederos de residuos, tanto urbanos como industriales, la contaminación por restos de combustibles, la contaminación del agua por fugas en conducciones y depósitos de carácter industrial, las mareas negras, ocasionadas por el vertido de petróleo crudo sobre el mar,...</p>

Tabla 1. Tipos de contaminación según el origen del vertido.

### 1.1.3 Los nutrientes en las aguas residuales.

#### 1.1.3.1 El nitrógeno en las aguas residuales.

Por los problemas de eutrofización en los ambientes acuáticos naturales y debido también a que el amoníaco es tóxico para las especies acuáticas, la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales se ha convertido en una preocupación emergente en todo el mundo (Tchobanoglous *et al.*, 2003). A continuación se describen las formas en las que se encuentra el nitrógeno en las aguas residuales y sus principales efectos negativos.

##### 1.1.3.1.1 Formas del nitrógeno.

El nitrógeno en las aguas residuales se puede encontrar en diferentes formas (N orgánico,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) y en concentraciones variables. Normalmente en las aguas residuales urbanas el nitrógeno suele presentarse mayoritariamente en sus formas reducidas, es decir, como nitrógeno orgánico y amoniacal, en proporciones de un 40% y un 60% respectivamente, mientras que la presencia de las formas nítricas y nitrosas es inferior a un 1% (EPA, 1993) (ver Figura 1). 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. Inicialmente, el nitrógeno presente en el agua residual se encuentra principalmente en forma de nitrógeno orgánico (urea y proteínas), pero este nitrógeno orgánico es transformado rápidamente en nitrógeno amoniacal, a partir de las reacciones enzimáticas, en forma de  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$ . La forma predominante es el  $\text{NH}_4^+$  como consecuencia del pH característico del agua residual; aunque para pH muy básicos el equilibrio se desplaza hacia la forma no ionizada (la Ec.- 1 muestra la relación entre estas dos formas). El nitrógeno nítrico suele presentarse en forma de  $\text{NO}_3^-$  ya que el  $\text{NO}_2^-$  es muy inestable, al ser fácilmente oxidable a  $\text{NO}_3^-$ . Si existe acumulación de  $\text{NO}_2^-$  en el medio, éste mantiene un equilibrio químico con el  $\text{HNO}_2$  en función del pH y la temperatura (Ec.- 2). La presencia de  $\text{NO}_3^-$  en el agua residual afluyente a una depuradora suele ser baja, alrededor de un 1%, debido a que el nitrato es usado como aceptor de electrones en ausencia de oxígeno, situación característica del alcantarillado por donde circula el agua residual.

$$\text{NH}_3 = \frac{\text{TAN}}{1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_e^{\text{NH}}}} \quad K_e^{\text{NH}} = \frac{-6334}{e^{T+273}} \quad \text{Ec.- 1}$$

Donde TAN (nitrógeno amoniacal total) =  $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$

$$\text{Donde TNO}_2 \text{ (nitrito total)} = \text{HNO}_2 + \text{NO}_2^-$$

La Figura 1 relaciona las diversas formas y fracciones en las que se puede encontrar el nitrógeno en las aguas residuales. La suma de las concentraciones permite conocer el contenido total de nitrógeno.

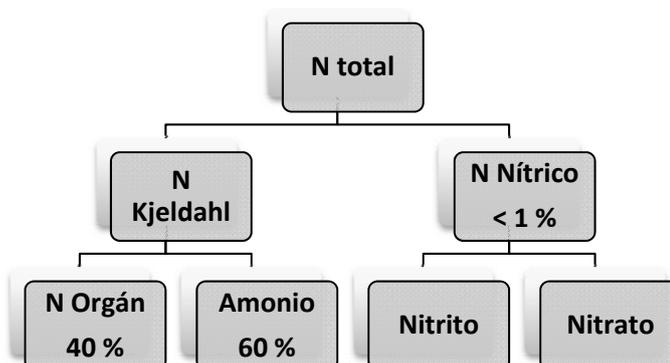


Figura 1. Formas y fracciones del nitrógeno en las aguas residuales.

#### 1.1.3.1.2 Problemas del nitrógeno como contaminante.

Las formas iónicas (reactivas) de nitrógeno inorgánico más comunes en los ecosistemas acuáticos son el amonio, el nitrito y el nitrato. Estos iones pueden estar presentes de manera natural en el medio acuático, sin embargo, las actividades humanas han alterado de manera significativa el ciclo global del nitrógeno (y de otros elementos químicos), aumentando su disponibilidad en muchas regiones del planeta como consecuencia de fuentes puntuales y difusas de contaminación. Asociados a esta contaminación generalizada aparecen los siguientes problemas medioambientales en los ecosistemas acuáticos: (1) acidificación de ríos y lagos con baja o reducida alcalinidad; (2) eutrofización de las aguas y proliferación de algas tóxicas; (3) toxicidad directa de los compuestos nitrogenados para los animales acuáticos. Además, la contaminación por nitrógeno inorgánico podría inducir efectos perjudiciales sobre la salud humana (ver Tabla 2).

✓ **Acidificación:** el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y los óxidos de nitrógeno (NO, NO<sub>2</sub>) emitidos a la atmósfera pueden reaccionar con otras moléculas (H<sub>2</sub>O, OH<sup>-</sup>, O<sub>3</sub>) y formar ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>). Al depositarse estos ácidos sobre las aguas superficiales puede incrementar, además de la concentración de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, la concentración de H<sup>+</sup> y, en consecuencia, reducir el valor del pH del agua (Schindler, 1988; Baker *et al.*, 1991).

✓ **Eutrofización y aparición de algas tóxicas:** el incremento de los compuestos nitrogenados puede promover el desarrollo, mantenimiento y proliferación de los productores primarios (fitoplancton, algas bentónicas, macrófitos), contribuyendo a la eutrofización de los ecosistemas acuáticos (Wetzel, 2001; Anderson *et al.*, 2002; Smith, 2003; EEA, 2005). Como se ha descrito en apartados anteriores, la eutrofización puede producir diversos efectos ecológicos y toxicológicos, los cuales están directa o indirectamente relacionados con la proliferación de los productores primarios.

✓ **Toxicidad de compuestos nitrogenados:** concentraciones elevadas de amonio, nitrito y nitrato pueden provocar una toxicidad directa sobre los organismos del medio.

**Amoníaco.** El NH<sub>3</sub> es muy tóxico para los animales acuáticos, mientras que el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es mucho menos tóxico. La acción tóxica del NH<sub>3</sub> puede ser debida a una o más de las siguientes causas (Camargo y Alonso, 2006): 1) destrucción del epitelio branquial; 2) estimulación de la glucólisis y supresión del ciclo de Krebs; 3) inhibición de la producción de ATP y reducción de sus niveles; 4) alteración de la actividad osmorreguladora; 5) disrupción del sistema inmunológico.

**Nitrito.** Tanto el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> como el HNO<sub>2</sub> son bastante tóxicos. Sin embargo, ya que en los ecosistemas acuáticos la concentración de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> suele ser mayor, los iones nitrito son considerados los principales responsables de la toxicidad. La acción tóxica del nitrito es debida fundamentalmente a la conversión de los pigmentos respiratorios en formas que son incapaces de transportar y liberar oxígeno, lo cual puede causar asfixia y la muerte (Camargo y Alonso, 2006).

**Nitrato.** Lo mismo que en el caso del NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, la acción tóxica del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> es debida básicamente a la conversión de los pigmentos respiratorios en formas que son incapaces de transportar y liberar oxígeno. Sin embargo, el nitrato presenta una menor toxicidad que el nitrito y el amoníaco como resultado de su baja permeabilidad branquial, lo cual hace que su absorción a través de las branquias sea más limitada (Camargo y Alonso, 2006).

✓ **Efectos sobre la salud humana:** la ingestión directa de nitritos y nitratos a través del agua puede provocar diferentes efectos negativos sobre la salud humana. Los bebés pueden sufrir metahemoglobinemia, manifestando los síntomas típicos de cianosis, taquicardia, convulsiones, asfixia, y en último término la muerte (Fewtrell, 2004). Algunas evidencias científicas sugieren que la ingestión prolongada de nitratos y nitritos podría contribuir al desarrollo de linfomas y cánceres, enfermedades coronarias, infecciones del tracto respiratorio, y malformaciones en los recién nacidos (Camargo y Alonso, 2006). Indirectamente, la acumulación de nutrientes de los ecosistemas acuáticos y la proliferación de algas tóxicas pueden causar también efectos adversos. La ingestión de agua o alimentos que contengan toxinas algales puede dar lugar a trastornos fisiológicos (nauseas, vómitos, diarrea, gastroenteritis, neumonía, dolores musculares, etc.) y diversos síndromes de intoxicación (PSP, NSP, ASP) que, en último término, pueden desembocar en la muerte de la persona afectada (Chorus, 2001; Landsberg, 2002; Busse *et al.*, 2006). Además, la eutrofización de las aguas puede favorecer el desarrollo de organismos transmisores o causantes de enfermedades infecciosas (malaria, encefalitis, cólera, etc.).

Tabla 2. Efectos negativos de la acumulación de compuestos nitrogenados.

### 1.1.3.2 El fósforo en las aguas residuales.

En las aguas residuales el fósforo se puede presentar en forma de ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), polifosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_7$ ) y como fósforo orgánico (Figura 2). La mayor contribución al fósforo total de las aguas residuales es de los ortofosfatos, que junto a los polifosfatos y a una pequeña porción del fósforo orgánico constituyen todas las formas solubles del fósforo.

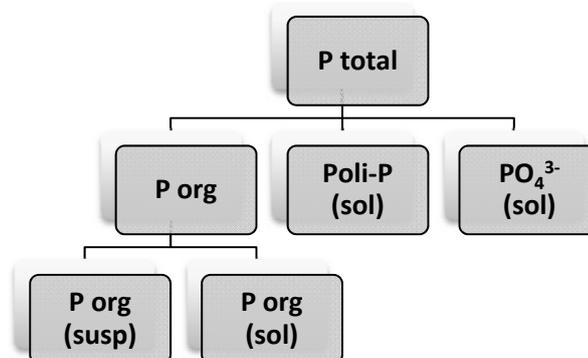


Figura 2. Formas del fósforo en las aguas residuales.

Las fuentes de fósforo a las aguas superficiales son muy diversas. Del total de las entradas de fosfatos a las aguas superficiales europeas, el 24% proviene de residuos humanos en las aguas residuales, el 11% del empleo de detergentes, el 34% de la ganadería, el 7% de la industria, el 16% del empleo de fertilizantes y el 10% restante debido a procesos naturales de erosión (Centre Européen d'Etudes des Polyphosphates). Es decir, cerca de la tercera parte de las aportaciones de fosfatos a las aguas superficiales proviene de aguas residuales.

El contenido en fosfatos de las aguas residuales urbanas procede fundamentalmente de fuentes humanas, detergentes, desechos de comida, aditivos alimenticios y otros productos. Se estiman en 0,3-0,4 kg/persona/año en la orina más 0,18-0,2 kg/persona/año en las heces, más una estimación de 0,18 kg/persona/año procedentes de detergentes y otros productos de limpieza domésticos. Es decir, en total 0,66-0,78 kg/persona/año (Balmér, 2004).

### 1.1.4 Métodos en la depuración de aguas residuales.

Las aguas residuales constituyen un importante foco de contaminación de los sistemas acuáticos, siendo necesarios los sistemas de depuración antes de evacuarlas, como medida importante para la conservación de dichos sistemas. La depuración de las aguas residuales es un proceso que persigue eliminar, en la mayor cantidad posible, la contaminación que lleva un vertido antes de que éste incida sobre un cauce receptor, de forma que los niveles de contaminación que queden en el efluente ya tratado puedan ser asimilados de forma natural.

Hay distintos tipos de tratamiento de las aguas residuales donde cada uno de los métodos específicos se clasifican en operaciones unitarias. Las operaciones unitarias pueden ser operaciones unitarias físicas, operaciones unitarias químicas y operaciones unitarias biológicas. Una planta depuradora de aguas residuales está formada por la combinación de las operaciones unitarias necesarias para conseguir cumplir los requisitos de vertido marcados para el efluente. Entre la Tabla 3 se enumeran los tratamientos más usuales.

<b>a) Físicos</b>	<p><b>Sedimentación.</b></p> <p><b>Flotación.</b> Natural o provocada con aire.</p> <p><b>Filtración.</b> Con arena, carbón, cerámicas, etc.</p> <p><b>Evaporación.</b></p> <p><b>Adsorción.</b> Con carbón activo, zeolitas, etc.</p> <p><b>Desorción (Stripping).</b> Se transfiere el contaminante al aire (ej. amoníaco).</p> <p><b>Extracción.</b> Con líquido disolvente que no se mezcla con el agua.</p>
<b>b) Químicos</b>	<p><b>Coagulación-floculación.</b> Agregación de pequeñas partículas usando coagulantes y floculantes (sales de hierro, aluminio, polielectrolitos, etc.)</p> <p><b>Precipitación química.</b> Eliminación de metales pesados haciéndolos insolubles con la adición de lechada de cal, hidróxido sódico u otros que suben el pH.</p> <p><b>Oxidación-reducción.</b> Con oxidantes como el peróxido de hidrógeno, ozono, cloro, permanganato potásico o reductores como el sulfito sódico.</p> <p><b>Reducción electrolítica.</b> Provocando la deposición en el electrodo del contaminante. Se usa para recuperar elementos valiosos.</p> <p><b>Intercambio iónico.</b> Con resinas que intercambian iones. Se usa para quitar dureza al agua.</p> <p><b>Osmosis inversa.</b> Haciendo pasar al agua a través de membranas semipermeables que retienen los contaminantes disueltos.</p> <p><b>Desinfección.</b> Destruye, selectivamente, los organismos causantes de enfermedades. El método más utilizado es la cloración, desinfección con ozono y con radiación UV.</p>
<b>c) Biológicos.</b>	<p>Usan microorganismos que se nutren con diversos compuestos de los que contaminan las aguas. Los flóculos que se forman por agregación de microorganismos son separados en forma de lodos.</p> <p><b>Lodos activos.</b> Se añade agua con microorganismos a las aguas residuales en condiciones aerobias (burbujeo de aire o agitación de las aguas).</p> <p><b>Filtros bacterianos.</b> Los microorganismos están fijos en un soporte sobre el que fluyen las aguas a depurar. Se introduce oxígeno suficiente para asegurar que el proceso es aerobio.</p> <p><b>Biodiscos.</b> Intermedio entre los dos anteriores. Grandes discos dentro de una mezcla de agua residual con microorganismos facilitan la fijación y el trabajo de los microorganismos.</p> <p><b>Lagunas aireadas.</b> Se realiza el proceso biológico en lagunas de grandes extensiones.</p> <p><b>Degradación anaerobia.</b> Procesos con microorganismos que no necesitan oxígeno para su metabolismo.</p>

**Tabla 3. Tratamientos físicos, químicos y biológicos de las aguas residuales.**

Las aguas residuales se pueden someter a diferentes niveles de tratamiento, dependiendo del grado de purificación que se quiera. Es tradicional hablar de tratamiento primario, secundario,..., aunque muchas veces la separación entre ellos no es totalmente clara. Así se pueden distinguir:

✓ **Pretratamiento.** El pretratamiento prepara las aguas residuales para continuar el tratamiento mediante la reducción o eliminación de características no favorables del agua que de otro modo podría impedir la operación o aumentar excesivamente el mantenimiento

de los procesos intermedios y de los equipos. Es un proceso en el que usando rejillas y cribas se separan restos voluminosos como palos, telas, plásticos,...

✓ **Tratamiento primario.** Hace sedimentar los materiales suspendidos usando tratamientos físicos o físico-químicos. En algunos casos dejando simplemente las aguas residuales un tiempo en grandes tanques o, en el caso de los tratamientos primarios mejorados, añadiendo al agua contenida en estos grandes tanques, sustancias químicas quelantes que hacen más rápida y eficaz la sedimentación. También se incluyen en estos tratamientos la neutralización del pH y la eliminación de contaminantes volátiles como el  $\text{NH}_3$  (desorción).

✓ **Tratamiento secundario.** Elimina las partículas coloidales y similares. Puede incluir procesos biológicos y químicos. El proceso secundario más habitual es un proceso biológico en el que se facilita que las bacterias digieran la materia orgánica que llevan las aguas. Este proceso se suele hacer llevando el efluente que sale del tratamiento primario a tanques en los que se mezcla con agua cargada de fangos activos (microorganismos). Posteriormente se conduce este líquido a tanques cilíndricos, con sección en forma de tronco de cono, en los que se realiza la decantación de los lodos. Separados los lodos, el agua que sale contiene muchas menos impurezas y puede ser devuelta a la naturaleza para que continúe su ciclo o pasar por una serie de tratamientos más avanzados para mejorar la calidad.

✓ **Tratamientos terciarios.** El tratamiento terciario va más allá del nivel de tratamiento secundario convencional para eliminar cantidades significativas de N, P, metales pesados, compuestos orgánicos biodegradables, bacterias y virus. Además de los procesos biológicos de eliminación de nutrientes, las unidades de operación usadas frecuentemente para este propósito incluyen la coagulación química, floculación y sedimentación, seguido por la filtración y carbón activado. También es usual la desinfección del efluente para la eliminación de agentes infecciosos. Sistemas menos frecuentemente utilizados incluyen procesos de intercambio iónico y ósmosis inversa para la eliminación de iones específicos o para la reducción de los sólidos disueltos.

En una EDAR además de la línea de aguas se encuentra también la línea de fangos donde se tratan los fangos o lodos obtenidos en los tratamientos de las aguas descritos anteriormente. La Figura 3 muestra un esquema simple con las principales partes de una EDAR dividida en las dos líneas de tratamiento que la componen.

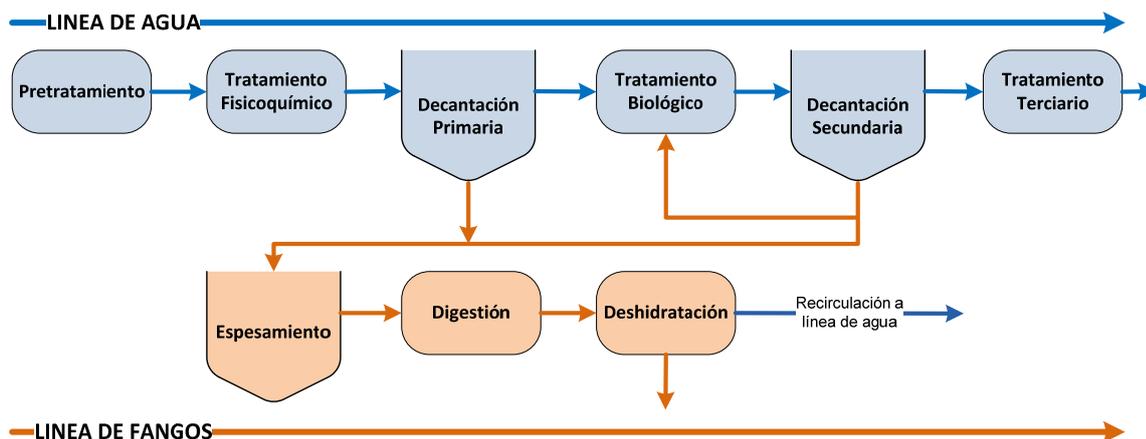


Figura 3. Esquema simple de una EDAR.

### 1.1.5 Procesos de eliminación biológica de nutrientes.

#### 1.1.5.1 Procesos de eliminación biológica de nitrógeno.

En las EDARs urbanas, entre un 5-10 % del nitrógeno total contenido en el agua residual influente es eliminado en la decantación primaria en forma de nitrógeno orgánico particulado. Por otro lado, en un sistema de fangos activados convencional, se elimina entre un 10-30 % del nitrógeno total para satisfacer las necesidades nutricionales de la biomasa, que se estiman entre un 12-13 % en peso de la biomasa formada (Sedlak, 1991). En la mayoría de los casos esta eliminación no es suficiente para conseguir cumplir requisitos de vertido por lo que se requiere de la aplicación de tratamientos adicionales. El proceso más aceptado y utilizado corresponde con el proceso biológico en dos etapas de nitrificación – desnitrificación, que se basa en transformar el nitrógeno contenido en las aguas residuales en nitrógeno gas (Figura 4). A continuación se describen en detalle cada una de estas etapas.

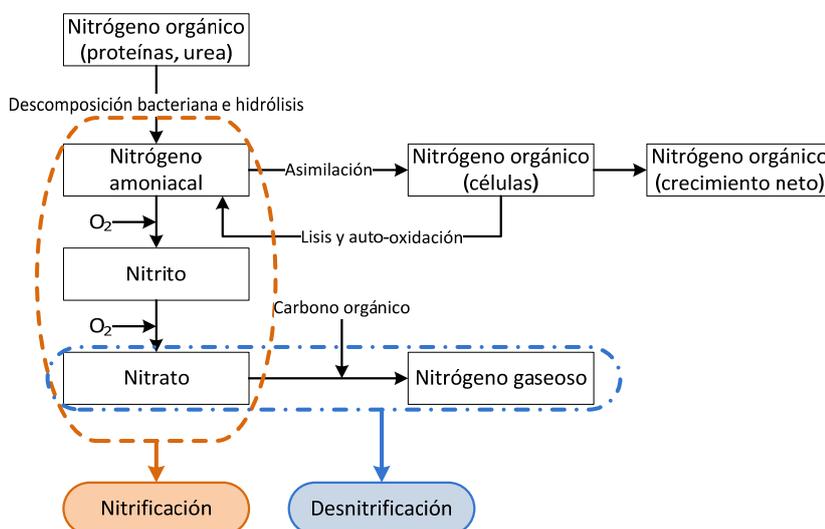
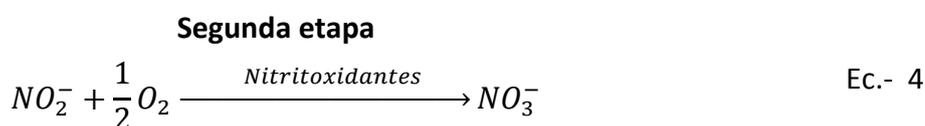
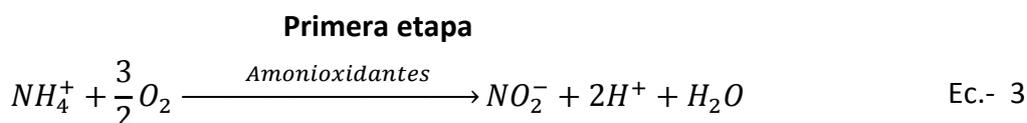


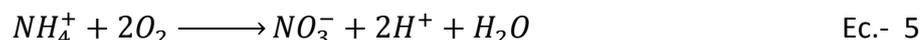
Figura 4. Transformaciones del nitrógeno en los procesos de tratamiento biológico (Metcalf y Eddy, 1995).

**1.1.5.1.1 Nitrificación.**

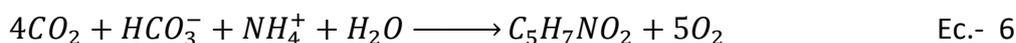
La nitrificación consiste en la transformación del nitrógeno amoniacal en nitrato por acción de un conjunto de bacterias autótrofas nitrificantes. Las bacterias encargadas de realizar este proceso utilizan el carbono inorgánico ( $\text{CO}_2$  o  $\text{HCO}_3^-$ ) como fuente de carbono, y obtienen la energía necesaria para su crecimiento a partir de la oxidación del nitrógeno amoniacal. La nitrificación del nitrógeno amoniacal se realiza en dos etapas llevadas a cabo por dos grupos diferentes de microorganismos (bacterias amoniooxidantes y nitritoxidantes). Las correspondientes reacciones bioquímicas representativas de cada etapa son:



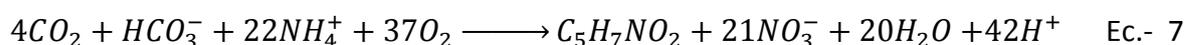
En las reacciones bioquímicas de ambas etapas se produce energía que es utilizada por los microorganismos para el crecimiento y mantenimiento celular. Para condiciones habituales de operación en una EDAR, la primera etapa corresponde con la etapa limitante del proceso de nitrificación, por lo que la reacción energética global queda representada por la Ec.- 5.



También se ha de considerar la reacción de síntesis de los microorganismos implicados, que como se ha comentado anteriormente, asimilan una fracción del amonio del agua residual para el tejido celular. Esta reacción de síntesis, asumiendo como fórmula química de la biomasa  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ , corresponde con la Ec.- 6.



Por tanto, la reacción global representativa del proceso de nitrificación obtenida a partir de las reacciones de oxidación y síntesis corresponde con la Ec.- 7.



Teniendo en cuenta esta reacción global se puede observar como en el proceso de nitrificación se produce un consumo considerable de alcalinidad, cada mg/l de  $\text{N-NH}_4$

oxidado provoca una disminución de 7.14 mg/l de alcalinidad expresada como CaCO<sub>3</sub>, lo que provoca un importante descenso del pH del medio.

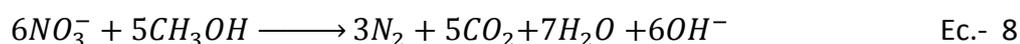
En la etapa de nitrificación se consigue oxidar el nitrógeno amoniacal a nitrato, pero para transformar ese nitrato a nitrógeno gas, y por tanto poder reducir el contenido de nitrógeno del agua residual, se requiere de una segunda etapa, denominada desnitrificación.

#### 1.1.5.1.2 Desnitrificación.

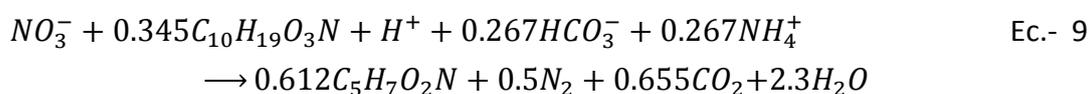
La segunda etapa del proceso biológico de eliminación de nitrógeno es la desnitrificación. El proceso de desnitrificación es el proceso biológico mediante el cual las bacterias heterótrofas facultativas, en ausencia de oxígeno, utilizan el nitrato como aceptor de electrones para degradar la materia orgánica. De este modo, las bacterias, en presencia de una fuente de carbono, reducen el nitrato a nitrógeno gas dando fin al proceso de eliminación biológica de nitrógeno.

Para que este proceso tenga lugar de forma eficiente es fundamental mantener condiciones anóxicas (término que se emplea para indicar la ausencia de oxígeno disuelto en el medio y la presencia de nitrato como aceptor de electrones) en el reactor, ya que las bacterias heterótrofas facultativas prefieren utilizar el oxígeno como aceptor de electrones antes que el nitrato. El crecimiento bacteriano en presencia de nitrato resulta menos eficiente que el crecimiento en presencia de oxígeno, ya que no se genera la misma cantidad de energía en forma de ATP por unidad de DQO degradada (Brock, 1994).

La reacción general de desnitrificación utilizando metanol como fuente de carbono, se representa a partir de la siguiente ecuación:



Si en la anterior reacción se considera la síntesis de biomasa (C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>), la degradación de la materia orgánica del agua residual como fuente de carbono (considerada como C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N) y el consumo de nitrógeno amoniacal como nutriente, la reacción global de eliminación de nitrato se puede escribir como (WEF y ASCE, 1998):



Como se puede observar en esta reacción, el proceso de desnitrificación compensa la disminución de alcalinidad del proceso de nitrificación ya que en el proceso de desnitrificación aumenta el pH. Este aumento del pH se produce como consecuencia del consumo de protones.

Los esquemas de eliminación biológica de nitrógeno más empleados se describen a continuación.

#### **1.1.5.1.3 Esquemas de tratamiento.**

Los esquemas de tratamiento para la eliminación biológica de nitrógeno alternan las fases aerobias y anóxicas bajo diferentes condiciones de operación. Estos esquemas se clasifican en 2 tipos atendiendo al número de etapas de decantación:

- *Sistemas de cultivo simple.* Estos sistemas utilizan el mismo cultivo biológico para realizar los procesos de eliminación de materia orgánica, nitrificación y desnitrificación.
- *Sistemas de cultivo múltiple.* Estos procesos se llevan a cabo por diferentes cultivos biológicos. Así, en estos sistemas, un cultivo realiza las operaciones de eliminación de materia orgánica y nitrificación y otro cultivo distinto el proceso de desnitrificación.

Los procesos simples son los más utilizados, ya que los sistemas de cultivo múltiple presentan unos elevados costes de construcción y operación, que en algunos casos se incrementan debido a la necesidad de adicionar metanol u otra fuente de carbono para que se pueda llevar a cabo el proceso de desnitrificación (WEF, ASCE, 1992).

Los procesos simples, pueden ser clasificados a su vez, en función de la posición relativa de las etapas aerobia y anóxica, en sistemas de predesnitrificación y postdesnitrificación.

- ***Sistemas de predesnitrificación.*** Son aquellos en los que el agua residual es tratada primero en una etapa anóxica y posteriormente en una aerobia. Los nitratos llegan al reactor anóxico por medio de una corriente de recirculación interna del reactor aerobio al reactor anóxico, utilizándose para la desnitrificación la materia orgánica contenida en el agua residual. Esta alternativa supone una reducción en las necesidades de oxígeno requeridas para la eliminación de la materia orgánica

carbonosa porque parte de la materia orgánica es eliminada utilizando nitrato como aceptor de electrones.

- **Sistemas de postdesnitrificación.** En este caso, el agua residual es tratada primero en una etapa aerobia y posteriormente en una anóxica. En estos sistemas la materia orgánica contenida en el agua residual es consumida en la etapa aerobia y se hace, por tanto, necesaria la adición de una fuente de carbono externa en la posterior etapa anóxica.

Los esquemas de tratamiento de sistemas de cultivo en suspensión más importantes, se muestran en la Figura 5.

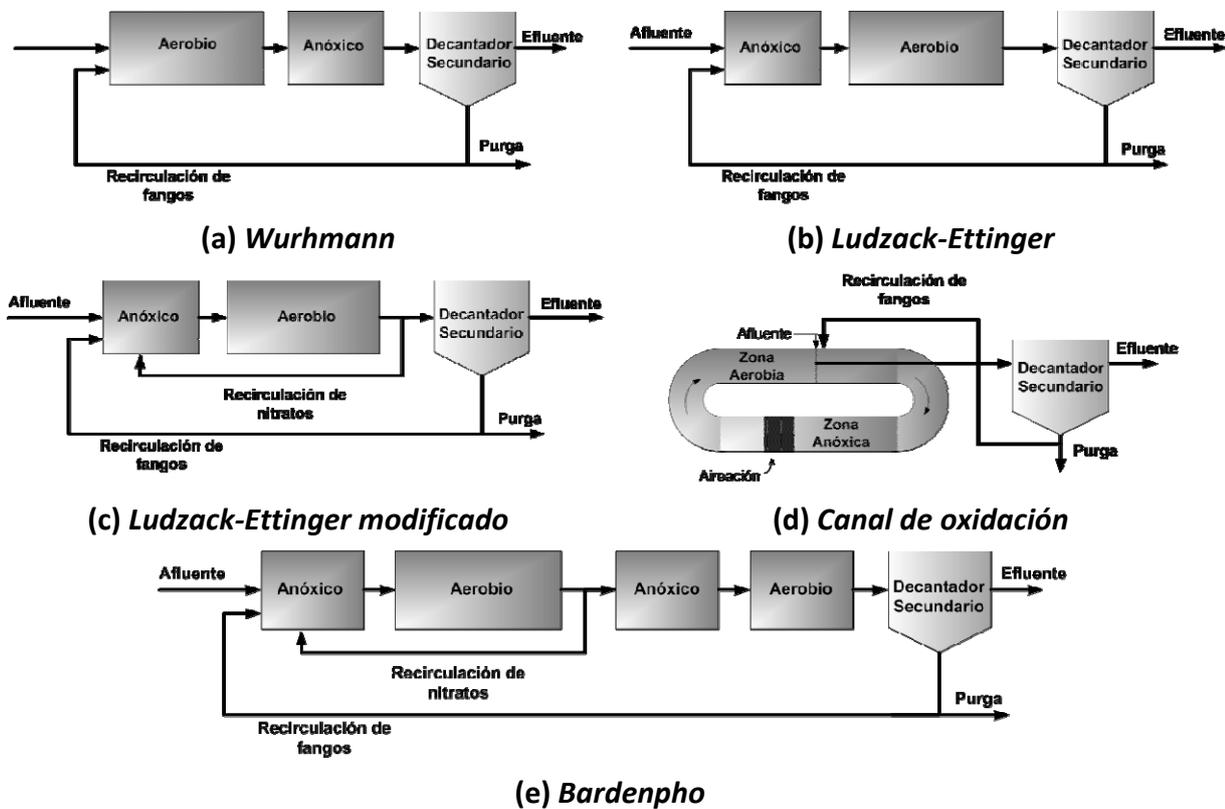


Figura 5. Esquemas de eliminación biológica de nitrógeno. (a) Wuhrmann, (b) Ludzack-Ettinger, (c) Ludzack-Ettinger modificado, (d) Canal de oxidación, (e) Bardenpho.

- **Esquema Wuhrmann.** Corresponde con un proceso de tipo postdesnitrificación. Por tanto, este esquema requiere la adición de una fuente de carbono orgánico en el reactor anóxico para que tenga lugar el proceso de desnitrificación, obteniéndose por lo general bajos rendimientos en eliminación de nitrógeno. (Figura 5 (a)).

- **Esquemas Ludzack-Ettinger y Ludzack-Ettinger modificado.** Son procesos de predesnitrificación. La diferencia entre ambos procesos radica en que, en el proceso modificado, la corriente de recirculación interna (de nitratos) es independiente de la recirculación de fangos. En el esquema *LE* la recirculación de fangos conlleva también la recirculación de nitratos (Figura 5 (b) y (c)).
- **Esquema Bardenpho.** Representa una variación del esquema Ludzack-Ettinger modificado, añadiendo dos etapas más al proceso. Estas dos etapas comprenden, un reactor anóxico o de postdesnitrificación y un reactor aerobio o de postaireación. En la etapa de postdesnitrificación la materia orgánica utilizada es la procedente de la degradación de la biomasa endógena. De esta manera, se consigue un aumento en el rendimiento de eliminación de nitrógeno oxidado. La etapa de postaireación elimina por arrastre el  $N_2$  gas formado durante la desnitrificación, mejorando de esta forma la sedimentabilidad del fango. (Figura 5 (e)).
- **Canal de oxidación.** En estos sistemas, el agua residual se hace circular alrededor de un canal ovalado o circular donde se lleva a cabo la nitrificación y desnitrificación del agua mediante la alternancia de zonas aerobias y anóxicas. Como se puede observar en la Figura 5 (d), la zona aerobia comienza en la zona de aireación y se extiende hasta que el oxígeno disuelto disminuye a cero. Entre este punto y el aireador se establece la zona anóxica. La entrada de agua residual y la recirculación de nitratos se establece al inicio de la zona anóxica para utilizar el carbono del agua residual en la desnitrificación. (Figura 5 (d)).

#### 1.1.5.2 Procesos de eliminación biológica de fósforo.

Las primeras investigaciones sobre la eliminación biológica de fósforo comenzaron en los años 50. Concretamente, en 1955, Greenburg *et al.*, (1955) advirtieron que ciertos microorganismos presentes en un proceso de fangos activados eran capaces de acumular más cantidad de fósforo que la estrictamente necesaria para su crecimiento.

La observación anterior constituye la base de los procesos de eliminación biológica de fósforo. En una planta convencional de fangos activados, las bacterias utilizan únicamente el fósforo necesario para satisfacer sus necesidades metabólicas, lo que da lugar a unas tasas típicas de eliminación del orden del 20%. En cambio, en una planta diseñada para llevar a cabo la eliminación de fósforo, se crea el medio necesario para favorecer la proliferación del tipo de bacterias que son capaces de almacenar fósforo en cantidades mayores a las

requeridas por su metabolismo (Brett *et al.*, 1997). A estas bacterias se las conoce como bacterias acumuladoras de polifosfatos (PAO, Polyphosphate Accumulating Organisms).

Para que la eliminación biológica de fósforo tenga lugar en las estaciones depuradoras de aguas residuales, es necesario someter a la biomasa a unas condiciones de ausencia de oxígeno y nitrato, es decir anaerobias, antes de entrar a una fase donde esté presente el aceptor de electrones, fase anóxica (cuando el nitrato está presente) o a una fase aerobia (cuando es el oxígeno el que está presente) (Baetens, 2001).

Cuando el agua residual entra en una fase anaerobia, las bacterias PAO, son capaces de almacenar ácidos orgánicos de cadena corta, especialmente ácido acético, en forma de polímeros internos llamados polihidroxialcanoatos (PHA). Las principales formas de estos polihidroxialcanoatos son el poli-beta-hidroxibutirato (PHB) y el poli-beta-hidroxivalerato (PHV), siendo PHB el formado cuando el sustrato principal es acetato. La energía necesaria para almacenar este polímero la obtienen de la descomposición del glucógeno almacenado intracelularmente y de la hidrólisis del polifosfato (poli-P). Durante este proceso el fosfato es liberado al medio produciendo un incremento de la concentración de ortofosfatos en el mismo. A esta fase anaerobia debe seguirle una fase aerobia o una fase anóxica. Bajo condiciones óptimas, cuando se llega a la fase aerobia o anóxica no deben quedar ya ácidos grasos volátiles por lo que, bajo estas condiciones, las bacterias PAO utilizan la fuente de carbono almacenada internamente durante la fase anaerobia, PHB. Mediante esta utilización del PHB se obtiene la energía necesaria para el crecimiento, producción de glucógeno y almacenamiento del ortofosfato presente en el agua en forma de poli-P, asegurando de este modo las reservas de energía necesarias para la posterior etapa anaerobia. Este proceso permite un incremento en la eliminación neta de fósforo mayor que el producido por la sola síntesis celular de las bacterias heterótrofas no acumuladoras de polifosfatos.

El fósforo eliminado mediante este proceso, almacenado en forma de poli-P, es extraído del sistema a través del fango en exceso después de la etapa aerobia o anóxica.

## **1.2 Nuevos procesos biológicos para la eliminación del nitrógeno amoniacal.**

Tal y como se ha comentado, el método biológico convencional de eliminación de nitrógeno implica una secuencia de etapas de nitrificación y desnitrificación heterótrofa, pero existe la posibilidad de mejorar las estrategias biológicas de eliminación de nitrógeno para proporcionar un mayor rendimiento en el proceso a un menor coste. Los estudios se centran

en las limitaciones técnicas y económicas durante la nitrificación-desnitrificación de aguas residuales con alta carga de nitrógeno y baja carga de carbono orgánico (Paredes *et al.*, 2007), lo que es característico del sobrenadante de la deshidratación de fangos y de algunas aguas residuales industriales. Recientemente se han propuesto nuevos procesos de eliminación de nitrógeno.

### 1.2.1 Procesos de Nitrificación – Desnitrificación simultáneos (proceso SND).

El proceso SND (Simultaneous Nitrification and Denitrification) indica que la nitrificación y desnitrificación ocurren al mismo tiempo en un único reactor (Keller *et al.*, 1997; Helmer y Kunst, 1998). Existen dos mecanismos en este tipo de proceso: físico y biológico (Robertson y Kuenen, 1984; Baumann *et al.*, 1996; Hibiya *et al.*, 2003). El mecanismo físico es que el proceso SND sucede como la consecuencia de los gradientes de la concentración de oxígeno disuelto (OD) dentro de los flóculos de fango activado o biofilms debido a las limitaciones en la difusión (Figura 6). Las bacterias autótrofas nitrificantes se encuentran en las regiones aerobias con OD por encima de 1-2 mg/l, mientras que las bacterias desnitrificantes se desarrollan en las zonas anóxicas con una concentración de OD < 0.5 mg/l (Zhu *et al.*, 2008).

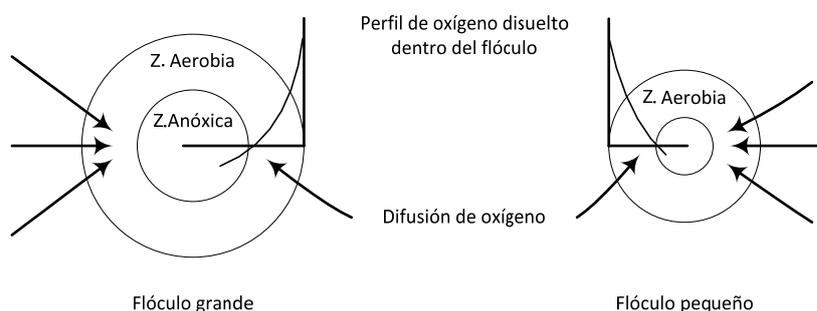


Figura 6. Esquema del perfil de OD dentro de los flóculos microbianos. Pochana y Keller, 1999.

El mecanismo biológico del proceso contradice al concepto tradicional de ingeniería de los procesos de nitrificación autótrofa aerobia y desnitrificación heterótrofa anóxica. En aguas residuales y suelos se han identificado muchas especies de heterótrofas nitrificantes y aerobias desnitrificantes (Patureau *et al.*, 1998; Hu y Kung, 2000; Kim *et al.*, 2005). Desde un punto de vista microbiológico, el proceso es consecuencia de la oxidación de  $\text{NH}_4$  por heterótrofas nitrificantes y la reducción de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  por desnitrificantes aerobias (Robertson *et al.*, 1988, 1995; Wyffels *et al.*, 2003).

El proceso SND ha aportado ventajas sobre los procesos convencionales (Pochana *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005). Con una desnitrificación y nitrificación que tiene lugar al mismo tiempo en tanques aireados, el proceso puede reducir los costes de tanques anóxicos, y simplificar el proceso general de diseño.

Hay tres factores importantes en el proceso SND: fuente de carbono, concentración de OD y tamaño del flóculo (Lee *et al.*, 2001; Holman y Wareham, 2005). El carbono orgánico es crítico en el proceso debido a que una DBO alta provoca la inhibición de las bacterias autótrofas nitrificantes mientras que una baja DBO conduce a una deficiencia de dadores de electrones para las desnitrificantes (Tam *et al.* 1992). La concentración de OD tiene un doble efecto en su rendimiento (Pochana y Keller, 1999; Hu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Una baja concentración de OD suprime el proceso de nitrificación mientras que concentraciones altas inhiben a la desnitrificación. Por último, algunos investigadores atribuyen la aparición del proceso SND al tamaño de los flóculos del fango activo, que normalmente se encuentra entre 80-100  $\mu\text{m}$  (Li y Ganczarczyk, 1990, 1993; Pochana y Keller, 1999). El proceso SND tiene lugar normalmente en flóculos de tamaño grande ( $> 125 \mu\text{m}$ ) debido a la limitación en la difusión del oxígeno.

### **1.2.2 Proceso de nitrificación parcial – desnitrificación (proceso SHARON).**

El proceso de nitrificación parcial es aquel en el que la nitrificación se detiene tras la primera etapa (el amonio se transforma en nitrito, pero éste no es oxidado a nitrato). El proceso de nitrificación parcial puede ser acoplado con el proceso de desnitrificación (desnitrificación a partir de nitrito) para reducir el nitrito a nitrógeno gas ( $\text{N}_2$ ). El proceso acoplado sería llevado a cabo mediante alternancia de condiciones aerobias y anóxicas. La Figura 7 muestra la posible ruta metabólica en el proceso de nitrificación parcial – desnitrificación. Comparado con el proceso tradicional de nitrificación y desnitrificación vía nitrato, el proceso tiene las siguientes ventajas (Beccari *et al.*, 1983; Turk y Mavinic, 1989; Peng y Zhu, 2006):

- 1.- El 25% menos de consumo de oxígeno en la fase aerobia implica un ahorro importante de energía en el proceso completo.
- 2.- El requerimiento de dadores de electrones es de hasta un 40% menor en la fase anóxica.
- 3.- La velocidad de desnitrificación a partir de nitrito es 3 a 5 veces mayor que la de desnitrificación a partir de nitrato (Gee y Kim, 2004).

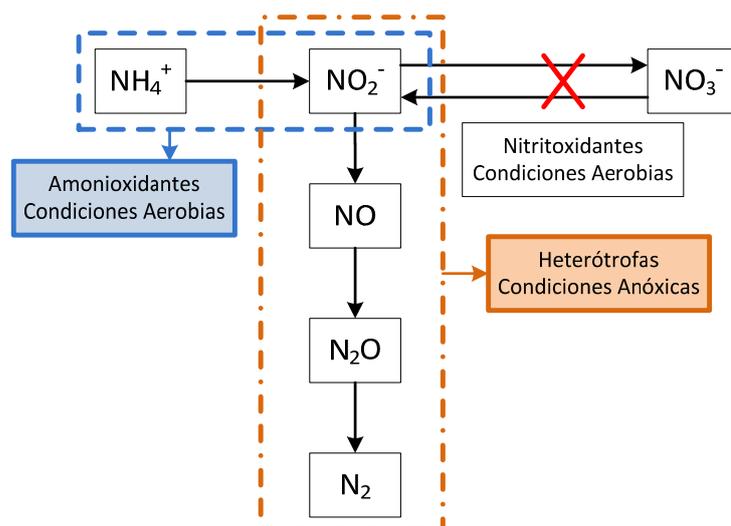


Figura 7. Ruta metabólica para nitrificación-desnitrificación.

Se ha comprobado que el proceso de nitrificación parcial vía nitrito es técnicamente factible y económicamente favorable, especialmente cuando se tratan aguas residuales con alta concentración de amonio o baja relación C:N (Turk y Mavinic, 1989; Villaverde et al., 1997). Un proceso donde se aplica el concepto de nitrificación parcial es el proceso SHARON (Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite process). Este proceso, primer proceso a gran escala con nitrito como intermedio, es operado en un reactor continuo de tanque agitado y es efectivo para la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales con alto contenido en nitrógeno (Hellingsa *et al.*, 1998; Jetten *et al.* 1997a). El sistema ha sido usado para el tratamiento de aguas residuales procedentes de la deshidratación del fango primario, de residuos de fangos activos, de secadoras de fangos y de incineradoras (Van Dongen *et al.*, 2001).

La eliminación del sistema de las bacterias nitritoxidantes es un punto crítico para el proceso de nitrificación parcial ya que estas bacterias oxidan el nitrito a nitrato y convierten una nitrificación parcial en nitrificación completa (Picioreanu *et al.*, 1997; Hellingsa *et al.*, 1998; Hidaka *et al.*, 2002; Peng y Zhu, 2006; Magrí *et al.*, 2007a). Hay diferentes parámetros para eliminar del sistema de forma selectiva a las bacterias nitritoxidantes, donde se incluye la concentración de OD, temperatura, TRC, concentración de sustrato, inhibidores químicos,... Es posible alcanzar una nitrificación parcial mediante la regulación de uno o más de estos factores. Es necesario considerar la viabilidad económica cuando se están utilizando estos parámetros de control del proceso.

Se han definido diferentes concentraciones de OD para llevar a cabo la nitrificación parcial, que van desde 0.3 a 2.5 mg/l (Wyffels *et al.* 2004a, 2004b). Altas concentraciones de OD (> 2 mg/l) podrían convertir la nitrificación parcial en completa, mientras que concentraciones

inferiores a 0.5 mg/l puede reducir considerablemente la tasa de nitrificación. Se ha verificado en diversos estudios que una concentración de 1.0-1.5 mg O<sub>2</sub>/l es adecuada para la nitrificación parcial – desnitrificación en sistemas reales de tratamiento de aguas residuales urbanas (Hanaki *et al.*, 1990; Hao *et al.*, 2002a; Peng *et al.*, 2003).

Las bacterias amonioxidantes tienen mayor tasa máxima de crecimiento que las bacterias nitritoxidantes a una temperatura de 20 °C, mientras que la tasa de crecimiento de las bacterias amonioxidantes fue menor que la de las nitritoxidantes a temperaturas inferiores a 15 °C (Hellings *et al.*, 1998). Por lo tanto, una alta temperatura no solamente favorece al crecimiento de las amonioxidantes, también incrementa la diferencia entre las tasas de crecimiento de ambos grupos de bacterias (Balmelle, 1992; Hunik, 1993; Yoo *et al.*, 1999). Debido al efecto de la temperatura las bacterias amonioxidantes necesitan mayor tiempo de retención celular (TRC) que las nitritoxidantes a temperaturas por debajo de 15 °C, mientras que la tendencia se invierte a temperaturas por encima de este valor. Por ello, amonioxidantes y nitritoxidantes pueden ser selectivamente acumuladas con un ajuste apropiado del TRC (Hellings *et al.*, 1998). Seleccionando un adecuado TRC es posible llevar a cabo en el reactor el lavado de las bacterias con un crecimiento más lento, las bacterias nitritoxidantes, permitiendo la oxidación del amonio pero no del nitrito. El N del agua residual fue eliminado vía nitrito en un proceso SHARON usando un TRH aerobio menor de 2 días (Jetten *et al.*, 1997a; Mulder *et al.*, 2001; Helio *et al.*, 2004).

La concentración de sustrato usado en el sistema va a influir en la población de bacterias que se desarrollaran en este, ya que dentro de las bacterias amonioxidantes se encuentran grupos de bacterias que crecen más rápidamente que otras (Zheng *et al.*, 2004). Aquellas especies de bacterias amonioxidantes con un crecimiento más lento tienen una gran afinidad por el sustrato y son dominantes en sistemas con una baja concentración de amonio, mientras que aquellas especies que crecen más rápidamente tienen baja afinidad por el sustrato y prosperan a altas concentraciones de este. En los procesos de nitrificación parcial a altas concentraciones de amonio (> 50 mg/l), como el proceso SHARON, las bacterias dominantes serán aquellas con un crecimiento más rápido (Surmacz-Gorska *et al.*, 1997). Por otro lado, las altas concentraciones de ácido nitroso y amoníaco pueden tener efectos negativos sobre la nitrificación. Las concentraciones de estos componentes están relacionadas con la temperatura y el pH en el medio. El efecto de inhibición por parte del HNO<sub>2</sub> sobre las bacterias amonioxidantes es mayor a pH más bajos y es limitado a pH altos (a una concentración de nitrito de 300 mg/l la concentración de HNO<sub>2</sub> oscila desde 0.52 a 0.00525 mg/l a pH entre 6.0 y 8.0) (Hellings *et al.*, 1998). Aunque hay diversos estudios donde se considera la inhibición de las bacterias por las altas concentraciones de NH<sub>3</sub>, otros



### 1.2.4 Combinación de los procesos de nitrificación parcial y ANAMMOX.

El proceso ANAMMOX puede ofrecer una alternativa para el tratamiento de la corriente de deshidratación de fangos, además, de otras corrientes con alto contenido en nitrógeno y bajo contenido en carbono. En el proceso ANAMMMOX el amonio y el nitrito son consumidos de forma casi equimolar, por lo que podría ser combinado con un proceso de nitrificación parcial, tal como el proceso SHARON (van Dongen *et al.*, 2001), donde únicamente la mitad del amonio sea oxidado a nitrito (Figura 9). Como muestra la figura parte del amonio del agua residual es oxidado a nitrito y el efluente de este proceso, que contiene amonio y nitrito a partes iguales, sirve como influente al proceso Anammox, convirtiendo amonio/nitrito en nitrógeno gas.

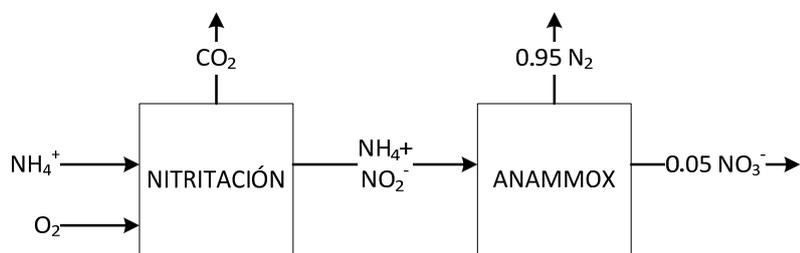


Figura 9. Proceso combinado nitrificación parcial – Anammox.

Ambos procesos autótrofos aumentarían la sostenibilidad del tratamiento de aguas residuales ya que se omite la necesidad de la adición de carbono (reducción del 100% de fuente de carbono externa), el consumo de oxígeno se reduce en un 50 % (Van Hulle *et al.*, 2005) y la emisión de óxido nítrico durante la oxidación de amoníaco es considerablemente menor (Jetten *et al.*, 1997). Además el bajo rendimiento de las bacterias Anammox lleva a una baja producción de fangos, lo que supone ahorros en el tratamiento de estos.

Sin embargo hay una serie de problemas en este proceso combinado:

- ✓ El oxígeno residual en el efluente del proceso de nitrificación parcial podría inhibir a la actividad de las bacterias Anammox ya que son muy sensibles al oxígeno.
- ✓ La relación óptima de  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$  en el proceso Anammox es de 1.0:1.3. Esta relación puede ser difícil de mantener de forma estable con el tiempo, debido a la participación de complejas reacciones bioquímicas y diversos grupos de microorganismos en el proceso.

Un reparto del influente, según se muestra en la Figura 10, entre los dos reactores (nitrificación parcial y proceso Anammox) puede reducir la competencia entre los dos grupos de bacterias (Zhu *et al.*, 2008).

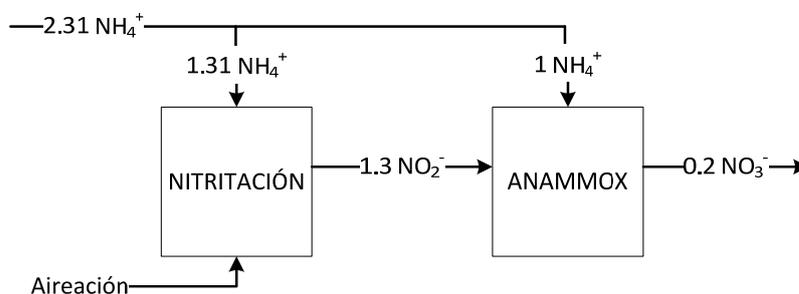


Figura 10. Esquema mejorado del proceso combinado nitrificación parcial – Anammox.

### 1.2.5 Procesos para eliminación de N con oxígeno limitado (procesos CANON y OLAND).

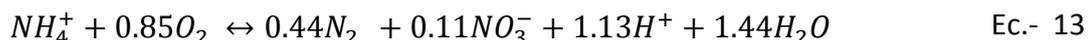
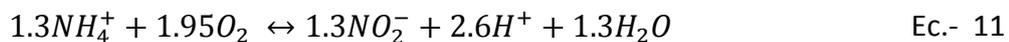
En muchos estudios se observó la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales que contenían amonio y cantidades limitadas de carbono orgánico bajo condiciones de oxígeno limitado. Se descubrió que el proceso que se llevaba a cabo en estos casos combinaba una nitrificación parcial con oxidación anóxica de amoníaco en un solo reactor o biofilm (Khin y Annachhatre, 2004), produciéndose una eliminación de grandes cantidades de amonio sin necesidad de añadir una fuente de carbono y con bajas concentraciones de OD. Además las investigaciones determinaron que el proceso involucra al  $\text{NH}_3$  como dador de electrones y al  $\text{NO}_2^-$  como aceptor, con el  $\text{N}_2$  como principal producto de reacción (Helmer *et al.*, 1999; Helmer y Kunst, 1998; Helmer *et al.*, 2001; Siegrist *et al.*, 1998).

El uso de técnicas moleculares tales como PCR (polymerase chain reaction) y FISH (fluorescence in situ hybridization) para detectar la presencia de bacterias Anammox en sistemas de biofilm mostraron la presencia de *Kuenenia stuttgartiensis* (una de las bacterias Anammox identificadas) en estos estudios (Egli *et al.*, 2001; Helmer-Madrok *et al.*, 2002; Pynaert *et al.*, 2003). Con métodos similares se demostró también la presencia en el sistema de bacterias amonioxidantes y la ausencia o casi ausencia de bacterias nitritoxidantes. Los resultados sugieren que la interacción de estos dos grupos de bacterias (involucrando procesos de nitrificación y Anammox) bajo condiciones de oxígeno limitado resulta en una conversión completa del amonio a nitrógeno gas mediante bacterias autótrofas.

Se han desarrollado dos procesos que utilizan el principio de ausencia de carbono orgánico y condiciones de oxígeno limitado en un solo reactor o biofilm: (1) proceso autótrofo de eliminación de nitrógeno sobre nitrito (CANON, Completely Autotrophic Nitrogen removal

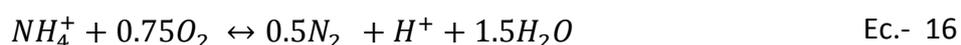
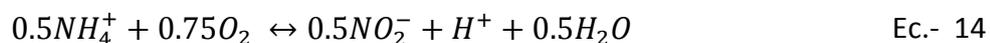
Over Nitrite) y (2) proceso autótrofo de oxígeno limitado de nitrificación-desnitrificación (OLAND, Oxygen Limited Autotrophic Nitrification Denitrification). Estos dos procesos difieren entre sí únicamente en la configuración del reactor.

Bajo condiciones de oxígeno limitado, los dos grupos de bacterias involucrados en los procesos de nitrificación y Anammox convierten secuencialmente el amonio a nitrito y después a nitrógeno gas en un mismo reactor. Las amonioxidantes convierten el amonio a nitrito (Ec.- 11). El nitrito producido por las amonioxidantes puede ser usado como aceptor de electrones con el amonio como dador de electrones para el proceso Anammox (Ec.- 12). La ecuación combinada de ambas reacciones (Ec.- 13) muestra la reacción que tiene lugar en el proceso CANON (Third *et al.*, 2005a). Como muestra esta ecuación, la mayoría del amonio presente en el agua residual es convertido a nitrógeno gas y una pequeña cantidad de nitrato.



Como ocurre en el proceso de nitrificación, las bacterias nitritoxidantes en el proceso CANON compiten por el oxígeno con las amonioxidantes. Bajo condiciones con limitación de oxígeno, como las amonioxidantes tienen una mayor afinidad por éste comparado con las bacterias nitritoxidantes, las nitritoxidantes quedan fuera del proceso. Las bacterias nitritoxidantes también compiten por el nitrito con las bacterias anammox. Pero la ausencia de OD favorecerá a las bacterias anammox sobre las nitritoxidantes. Las bacterias Anammox son inhibidas por el oxígeno, incluso en condiciones microaeróbicas, por lo tanto, es necesario un control estricto del oxígeno para garantizar microambientes anóxicos en el reactor o biofilm para hacer posible el proceso Anammox. Así que el proceso CANON es una integración de la nitrificación parcial y el proceso Anammox en un único reactor. Este proceso es económicamente favorable ya que puede llevarse a cabo en condiciones de oxígeno limitado además de no requerir una fuente externa de carbono orgánico, porque es un proceso completamente autótrofo (Sliekers *et al.*, 2002; Third *et al.*, 2005)).

El proceso OLAND puede ser considerado como una variación del proceso CANON. Las ecuaciones del proceso se pueden resumir así (Verstraete and Philips, 1998):



La ecuación Ec.- 14 muestra la oxidación del amonio usando 0.75 moles de oxígeno por cada 0.5 moles de amonio. La ecuación Ec.- 15 muestra el proceso Anammox usando el amonio como dador de electrones y el nitrito como aceptor y produciéndose nitrógeno gas. Hay que destacar que la ecuación usada para el metabolismo Anammox en el proceso OLAND es ligeramente diferente a la ecuación que describe este mismo metabolismo en el proceso CANON. En el proceso OLAND, el amonio y el nitrito se asume que reaccionan en una relación de uno a uno produciendo únicamente nitrógeno gas. En cambio, en el proceso CANON se asume una relación de nitrito a amonio de 1.3 y se produce tanto nitrógeno gas como nitrato. La ecuación general del proceso OLAND (Ec.- 16) muestra unos requerimientos de oxígeno ligeramente menores que en el proceso CANON. Ya que las ecuaciones de ambos procesos muestran diferencias mínimas, esto sugiere que ambos procesos están describiendo la misma ruta de eliminación. Por lo tanto, estos procesos pueden ser denominados de forma colectiva como procesos de eliminación de nitrógeno con limitación de oxígeno.

El proceso de eliminación de nitrógeno con limitación de oxígeno es una alternativa eficiente a la eliminación convencional de nitrógeno que supone un ahorro de costes, especialmente para el tratamiento de aguas residuales que contienen altas concentraciones de amonio pero carecen de carbono orgánico. Es un proceso autótrofo que requiere pequeñas cantidades de oxígeno, lo cual conlleva ahorro de espacio y energía. El consumo de oxígeno es un 63 % menor y los requerimientos de carbono orgánico son un 100 % menos, comparado con los requerimientos para un proceso convencional de nitrificación – desnitrificación (Kuai y Verstraete, 1998).

### **1.2.6 Oxidación desnitrificante de amonio (proceso DEAMOX).**

Recientemente, se ha descrito un nuevo concepto, que también tiene por objetivo combinar procesos Anammox con otro proceso de eliminación de nitrógeno proporcionando este último el nitrito necesario para las reacciones Anammox. La oxidación desnitrificante de amonio (DEAMOX, DEnitrifying AMmonium OXidation) combina el proceso Anammox con condiciones desnitrificantes usando sulfuro ( $S^{2-}$ ) como dador de electrones para reducir nitrato a nitrito (Kalyuzhnyi *et al.*, 2006; Paredes *et al.*, 2007). Este nuevo concepto de tratamiento está destinado para aguas residuales con altas concentraciones de  $NH_4^+$  y  $S^{2-}$ .

La Figura 11 muestra el diagrama de flujo del proceso DEAMOX, así como las principales reacciones involucradas. El primer paso consiste en el pretratamiento en un reactor anaerobio del influente que contiene nitrógeno orgánico y sulfato (mineralización

anaeróbica del nitrógeno orgánico). Una parte del efluente de este primer paso, que contiene amonio y sulfuro, es usado para alimentar al reactor nitrificante, donde el amonio es oxidado a nitrato. El efluente de este segundo reactor es llevado al reactor DEAMOX junto con la parte restante del efluente del reactor anaerobio. El reparto entre el reactor anaerobio y anóxico dependerá de la composición del agua residual, especialmente de las concentraciones de amonio y sulfato. Dentro del reactor DEAMOX el nitrato es reducido a nitrito con el sulfuro como dador de electrones. La presencia de nitrito y amonio en el reactor DEAMOX también propicia la reacción Anammox. Se ha comprobado experimentalmente la existencia de actividad Anammox dentro de un reactor DEAMOX después de 410 días de operación. Es necesaria la realización de nuevos estudios para verificar este punto. La presencia de sulfuro de hidrógeno puede provocar la inhibición de todas las especies involucradas en el sistema. Además, este nuevo concepto de tratamiento está limitado a aguas residuales con elevado contenido en sulfato (Kalyuzhnyi *et al.*, 2006).

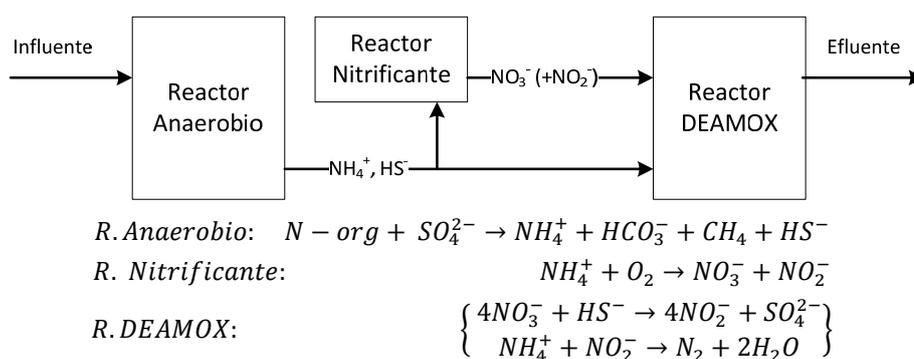


Figura 11. Esquema y reacciones del proceso DEAMOX.

### 1.2.7 Proceso de incremento de la biomasa nitrificante (Proceso BABE).

El principal criterio de diseño para un proceso de fangos activados con nitrificación es el TRC requerido por las bacterias autótrofas nitrificantes. El TRC requerido aumenta considerablemente en zonas con clima frío. Sin embargo, por adición de bacterias autótrofas nitrificantes al reactor de fangos activados es posible reducir el TRC necesario en el proceso. Esto puede ser considerado como una opción para mejorar el proceso. Se puede usar esta estrategia para conseguir una nitrificación completa en sistemas con alta carga, o liberar espacio en plantas con buena nitrificación para desnitrificación. Este proceso de adición de bacterias se puede realizar con fango nitrificante cultivado externamente a la planta, pero tiene dos desventajas:

- Las bacterias introducidas podrían no ser el tipo de autótrofas nitrificantes óptimo para la planta específica y,
- si se añaden células suspendidas, estas son eliminadas de forma muy efectiva por los protozoos del fango.

De aquí el interés en producir bacterias autótrofas nitrificantes en un reactor continuo inoculado con fango del reactor aerobio y alimentado con el efluente de la digestión. De esta forma las bacterias autótrofas nitrificantes que se desarrollan en el fango son las que están presentes en el sistema, estas crecen dentro de flóculos de fango y por lo tanto no son degradadas por los protozoos. Además, la carga de N para la planta de tratamiento se reduce de manera importante (Henze *et al.*, 2008).

Se ha propuesto un esquema de operación para integrar el proceso descrito. En este nuevo sistema desarrollado se utiliza el fango de recirculación como inóculo del proceso y no es necesaria una retención de fango porque las bacterias crecen ya en el fango. Este proceso recibe el nombre de proceso BABE (Bio-Augmentation Batch Enhanced) (Zilverentant, 1999) y permite conseguir la nitrificación completa en sistemas de fangos activados que trabajan a tiempos de retención celulares inferiores al óptimo para el proceso de nitrificación. El proceso es posible gracias al enriquecimiento de la biomasa en bacterias autótrofas nitrificantes que se produce al implantar un reactor de nitrificación en la corriente de recirculación de fangos. Este nuevo reactor se alimenta con el agua procedente de la deshidratación de fangos y un pequeño porcentaje del caudal de recirculación de fangos. La Figura 12 muestra un esquema de este proceso. El proceso BABE es ideal para mejorar el grado de nitrificación en plantas de tratamiento que se encuentran al límite de su capacidad con mínimas necesidades de espacio.

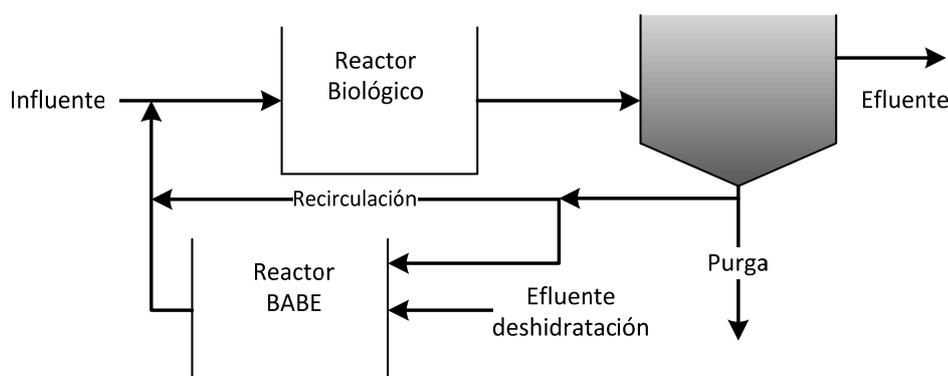


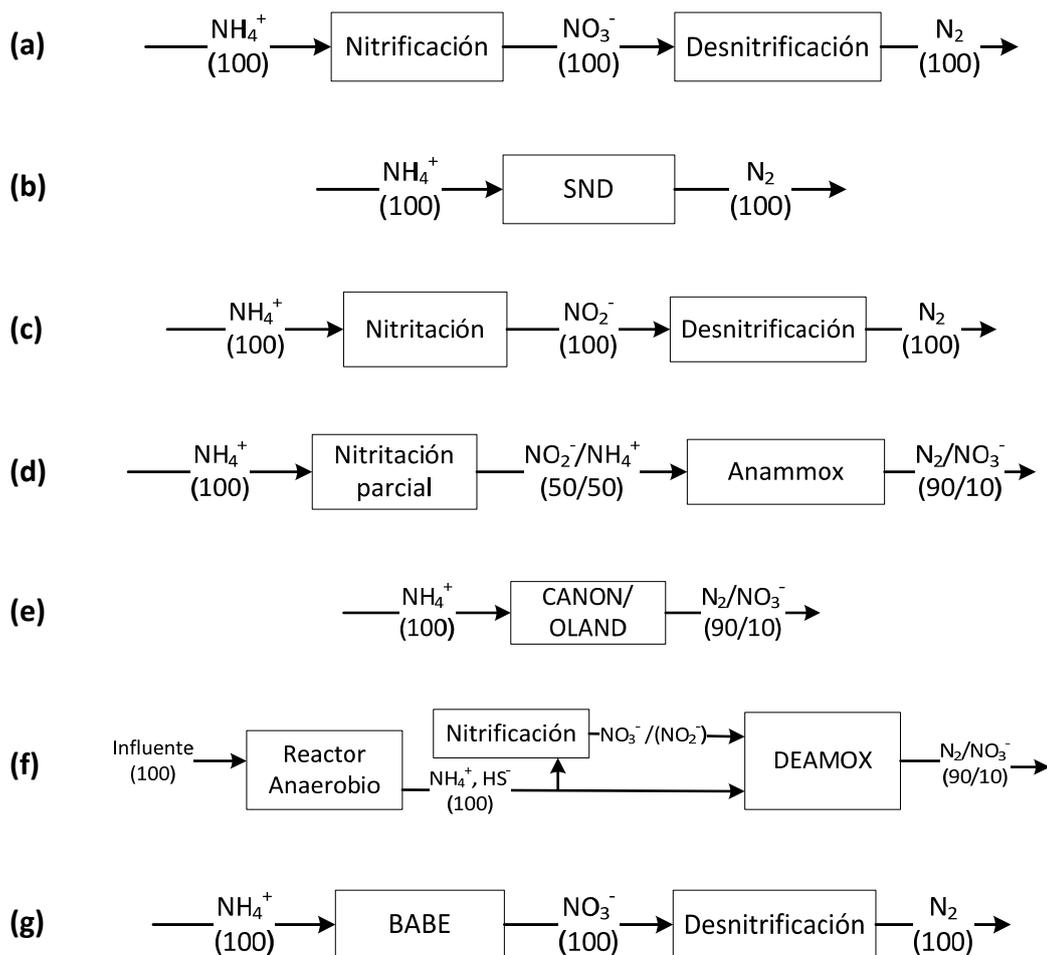
Figura 12. Esquema del proceso BABE.

El proceso BABE aprovecha la elevada concentración de N amoniacal del agua de deshidratación y la alta concentración de bacterias autótrofas nitrificantes presentes en la corriente de recirculación de fangos respecto de la línea de aguas, para reducir el tiempo de retención necesario para conseguir la nitrificación.

Diversos estudios muestran que manteniendo un TRC en el reactor BABE relativamente bajo (varias horas) y sin necesidad de un sistema de retención de fango se producirá el crecimiento de las bacterias autótrofas nitrificantes ya presentes en el fango recirculado (Salem *et al.*, 2003). El volumen del nuevo reactor es bastante inferior al aumento de volumen que sería necesario para la nitrificación en la línea de aguas del nitrógeno amoniacal recirculado. La relación entre el caudal de agua de deshidratación y el fango recirculado es un parámetro clave para optimizar el proceso. Un caudal de recirculación de fangos demasiado elevado disminuye el rendimiento del proceso porque reduce la temperatura del reactor (la temperatura de la línea de aguas es inferior a la del agua de deshidratación). Por el contrario, un caudal de recirculación de fangos demasiado bajo también disminuye el rendimiento del proceso porque reduce la concentración de bacterias autótrofas nitrificantes. Las simulaciones realizadas por Salem *et al.* (2003), para una EDAR en Holanda mostraban que el rendimiento óptimo (mínimo volumen necesario) se obtenía introduciendo en el reactor un 0.5% del caudal de recirculación de fangos. De todas formas, el caudal de recirculación que permite minimizar el volumen del reactor BABE depende de la temperatura a la que se encuentra la corriente de recirculación de fangos. Cuanto mayor sea esa temperatura, el caudal de recirculación podrá incrementarse aumentando la concentración de bacterias autótrofas nitrificantes sin que disminuya en exceso la temperatura.

### **1.2.8 Comparación de los diferentes procesos de eliminación de nitrógeno.**

Los diferentes procesos de eliminación de nitrógeno se muestran en la Figura 13. Como se ha discutido en esta revisión bibliográfica, el método convencional de nitrificación – desnitrificación requiere dos reactores para operar en condiciones aerobias y anóxicas, altas cantidades de oxígeno y una fuente de carbono orgánico.



**Figura 13. Diagramas de flujo de: (a) nitrificación – desnitrificación convencional, (b) procesos SND, (c) nitrificación parcial – desnitrificación, (d) nitrificación parcial – Anammox, (e) proceso CANON/OLAND, (f) Proceso Deamox, (g) Proceso BABE.**

Las nuevas tecnologías tienen ventajas en términos de ahorro en volumen de reactores, aireación y fuentes de carbono. Cada nueva tecnología posee características prometedoras, que ofrecen ventajas sobre el método convencional de nitrificación – desnitrificación, y posibles problemas.

En el proceso SND (Figura 13 b) se puede alcanzar el 100% de eliminación de nitrógeno total, pero la baja concentración de oxígeno requerido por este proceso reduce sustancialmente la tasa de nitrificación, lo que limita su aplicación. Por otro lado, la desnitrificación todavía puede ser llevada a cabo por desnitrificantes aerobias a altos niveles de OD en el proceso de lodos activados, pero es difícil de cultivar este tipo de bacterias (Zhu *et al.*, 2008).

El proceso de nitrificación parcial – desnitrificación (Figura 13 c) usa el concepto convencional de nitrificación - desnitrificación pero empleando menos oxígeno ya que se oxida solamente el amonio hasta nitrito. Este método obviamente usa menos recursos, incluyendo menos

material orgánico para reducir el nitrito a nitrógeno gas. Sin embargo, su alta temperatura de operación limita su aplicación.

El proceso Anammox puede funcionar con altas cargas de nitrógeno y se ha empleado en plantas de tratamiento a gran escala, pero el problema del abastecimiento de nitrito al proceso no ha quedado resuelto, y las aguas residuales tratadas todavía contienen nitratos. Además, la inoculación y el enriquecimiento de bacterias Anammox es difícil. El problema del suministro de nitrito se ha resuelto mediante la combinación de la nitrificación parcial con Anammox, que proporciona abundante nitrito para las amonioxidantes anaerobias. La combinación del proceso de nitrificación con el proceso Anammox (Figura 13 d) requiere menos oxígeno y no necesita una fuente de carbono. El proceso Anammox se utiliza actualmente para el tratamiento del sobrenadante de digestión de fangos.

Los procesos de eliminación con limitación de oxígeno que se llevan a cabo en un único reactor o biofilms (Figura 13 e), tal como los procesos CANON y OLAND, poseen claras ventajas de ahorro de las fuentes de carbono y los costes de aireación. El reto principal en este tipo de procesos es el enriquecimiento de microorganismos anaerobios capaces de oxidar el amonio con nitrito como aceptor de electrones.

El proceso DEAMOX (Figura 13 f) muestra su potencial aplicación en la eliminación de nitrógeno pero está limitado solamente a aguas residuales con elevado contenido en sulfato.

El proceso BABE (Figura 13 g) es una tecnología cada vez mas estudiada ya que supone un incremento en la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales, sin necesidad de invertir un volumen alto.

La biología molecular y la biotecnología ambiental pueden ayudar a identificar los microorganismos funcionales, caracterizar las comunidades microbianas y desarrollar nuevos procesos de eliminación de nitrógeno. Deben realizarse extensas investigaciones para aplicar y optimizar estos nuevos procesos en las plantas de tratamiento de aguas residuales. El mayor esfuerzo de investigación debería ser invertido en los sistemas que combinan estos nuevos procesos para mejorar la eficiencia de eliminación de nitrógeno.

### **1.3 Bacterias responsables del proceso de nitrificación.**

#### **1.3.1 Clasificación y características de las bacterias.**

Como se ha comentado en apartados anteriores, hay dos grupos de bacterias filogenéticamente distintos que en conjunto realizan el proceso de nitrificación. Las bacterias amonioxidantes obtienen energía mediante la oxidación del amoníaco no ionizado (Suzuki *et al.*, 1974) a nitrito, mientras que las bacterias nitritoxidantes oxidan los nitritos a nitratos. El primer proceso se suele denominar nitrificación mientras que el siguiente recibe el nombre de nitratación.

Originalmente, las bacterias responsables del proceso de nitrificación fueron agrupadas en una familia, llamada Nitrobacteraceae, donde las bacterias amonioxidantes se caracterizan por el prefijo *Nitroso-* y las bacterias nitritoxidantes se denominan con el prefijo *Nitro-* (Watson *et al.*, 1989). Sin embargo, posteriores estudios filogenéticos han concluido que las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes no están tan estrechamente relacionadas (Teske *et al.*, 1994; Woese *et al.*, 1984, 1985). Las bacterias del género Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosolobus y Nitrosovibrio, participan en la primera etapa de la nitrificación, es decir, son bacterias amonioxidantes (Tabla 4). La segunda fase la llevan a cabo las bacterias del género Nitrobacter, Nitrococcus, Nitrospira y Nitrospina (Watson, 1971; Watson *et al.*, 1986; Meincke *et al.*, 1989).

		CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE	
DOMINIO: Eubacteria	PHYLUM: Proteobacteria	β -proteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosomonas</i>	<i>N. aestuarii</i>	AMONIOXIDANTES
						<i>N. communis</i>	
						<i>N. europaea</i>	
						<i>N. eutropha</i>	
		<i>N. halophila</i>					
		<i>N. marina</i>					
	<i>N. nitrosa</i>						
	<i>N. oligotropha</i>						
	<i>N. ureae</i>						
	<i>Nitrospira</i>	<i>N. briensis</i>					
<i>N. multiformis</i>							
<i>N. tenuis</i>							
<i>Nitrosolobus</i> *	<i>N. multiformis</i>						
<i>Nitrosovibrio</i> *							
γ -proteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	<i>Nitrosococcus</i>	<i>N. oceani</i>			
				<i>N. halophilus</i>			
		Ectothiorhodospiraceae	<i>Nitrococcus</i>	<i>N. nitrous</i>			
				<i>N. mobilis</i>			
α - proteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Nitrobacter</i>	<i>N. alkalicus</i>			
				<i>N. hamburgensis</i>			
				<i>N. vulgaris</i>			
δ - proteobacteria	Desulfobacterales	Noctuoidea	Nitrospina	<i>N. winogradskyi</i>			
				<i>N. gracilis</i>			
PHYLUM: Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	<i>Nitrospira</i>	<i>N. Marina</i>	<i>N. moscoviensis</i>	NITRITOXIDANTES

Nota: estos dos géneros actualmente se incluyen en el género Nitrospira.

**Tabla 4. Clasificación de bacterias amonioxidantes y bacterias nitritoxidantes.**

Todos los miembros de estos dos grupos son bacterias gram-negativas quimioautótrofas. Las bacterias quimioautótrofas se caracterizan por la capacidad de utilizar un compuesto químico inorgánico como fuente de electrones para la inmovilización de carbono inorgánico en biomasa. Los quimioautótrofos por lo general son aerobios, emplean el oxígeno como aceptor final de electrones. La Tabla 5 y Tabla 6 presentan las características de los principales géneros de bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes, respectivamente. Todos los géneros de nitrificantes se pueden distinguir inicialmente por la forma celular. Hay bacterias en forma de varilla, elipsoidales, esféricas, espirales, vibrioide o lobular. Todas las especies tienen la típica pared celular gram-negativa. Muchas de las bacterias nitrificantes tienen complejos de membranas intracitoplasmáticas, los cuales se pueden disponer como vesículas aplanadas o tubos dispuestos al azar. Las células pueden ser móviles o no móviles, y los flagelos de células móviles son polares, laterales o peritricos. Además las células se observan aisladas, en parejas y, ocasionalmente, en cadenas cortas.

Características	Género	Grupo	Hábitats
Gram-negativas en forma de varillas cortas o largas, móviles (flagelo polar) o inmóviles, sistemas de membrana periféricos	<i>Nitrosomonas</i>	Beta	Suelos, aguas residuales, agua dulce, ambientes marinos
Esferas grandes, móviles, sistemas de membrana vesicular o periférico	<i>Nitrosococcus</i>	Gamma	Agua dulce, ambientes marinos
Espirales, móviles (flagelo peritricos), ningún sistema de membrana obvio	<i>Nitrospira</i>	Beta	Suelos
Pleomórfico, lobular, las células compartimentadas, móviles (flagelo peritricos)	<i>Nitrosolobus</i>	Beta	Suelos

Tabla 5. Características de las bacterias amonioxidantes.

Características	Género	Grupo	Hábitats
varillas cortas, se reproducen por gemación, a veces móviles (flagelos terminal único) o no móvil, sistema de membrana organizada como un casquete polar	<i>Nitrobacter</i>	Alpha	Suelos, agua dulce, ambientes marinos
Largas varillas delgadas, inmóviles, sin sistema de membrana obvio	<i>Nitrospina</i>	Delta	Ambientes marinos
Grandes esferas, móviles (uno o dos flagelos terminales), sistemas de membrana distribuidos aleatoriamente en tubos	<i>Nitrococcus</i>	Gamma	Ambientes marinos
Células en forma de helicoidal a vibrioide, inmóviles, sin membranas internas	<i>Nitrospira</i>	Nitrospirae	Ambientes marinos, suelos

Tabla 6. Características de las bacterias nitritoxidantes.

### 1.3.2 Ecología y detección de las bacterias.

Las bacterias autótrofas nitrificantes están ampliamente extendidas en la naturaleza. Se encuentran en la mayoría de los ambientes aerobios donde hay presentes considerables cantidades de amonio. Ambos grupos de bacterias se desarrollan en lagos y corrientes de agua, que tienen aportes de amonio, y en la termoclina de los lagos, donde tanto el amonio como el oxígeno están presentes. Sin embargo, de acuerdo con sus características ecofisiológicas, se ha observado que varias especies aparecen solo o mayoritariamente en sitios concretos, por ejemplo, en ríos, lagos de agua dulce, lagos salados, océanos, aguas salobres, plantas de tratamiento de aguas residuales, rocas o piedras naturales de edificios históricos, y suelos ácidos (Boer *et al.*, 1991; Mansch y Bock, 1998; Koops y Pommerening-Roser, 2001). Algunas especies tienen un requisito de sal necesario para su desarrollo, otras prefieren ambientes eutróficos u oligotróficos y pueden tolerar temperaturas altas o bajas (Golovacheva, 1976; Koops *et al.*, 1991). Además, las bacterias nitrificantes se encuentran en ambientes ya sea con una concentración de oxígeno baja o condiciones anóxicas, como en

los lagos de la Antártida y a una profundidad de 60 m en los suelos de permafrost (Voytek *et al.*, 1999, Wagner *et al.*, 2001).

Es posible obtener, cultivos enriquecidos de bacterias autótrofas nitrificantes mediante el uso de medios selectivos que contienen amonio o nitrito como dador de electrones y bicarbonato como única fuente de carbono. Las bacterias autótrofas nitrificantes son organismos de crecimiento lento. Para la división celular en ambientes naturales, la mayoría de las especies nitrificantes necesitan de varios días o semanas, dependiendo del sustrato y la disponibilidad de oxígeno, así como de la temperatura y pH.

Las tasas de crecimiento lento de estas bacterias han dificultado los cultivos realizados para investigar tanto el número como la composición y dinámica de la población en diferentes ambientes. El número de nitrificantes en sistemas complejos tradicionalmente ha sido determinado por la técnica del número más probable (NMP) (Matulewich *et al.*, 1975) y sembrado selectivo de placas. Sin embargo, estas técnicas que requieren mucho tiempo, a menudo subestiman el número de bacterias, y no permiten distinciones a nivel de especie (Belser, 1979; Konuma *et al.*, 2001). Por lo tanto, se han desarrollado otros métodos para la identificación in situ y conteo basados en la especificidad de los anticuerpos y las secuencias de ácidos nucleicos con el fin de evitar las limitaciones de la técnica NMP.

Las bacterias autótrofas nitrificantes se pueden detectar en muestras ambientales mediante el uso de anticuerpos o sondas de oligonucleótidos 16S rRNA. La técnica de anticuerpos fluorescentes puede ser aplicada para el recuento microscópico directo de bacterias en muestras complejas (Belser y Schmidt, 1978; Stanley y Schmidt, 1981; Völsch *et al.*, 1990; Sanden *et al.*, 1994). Pero en la técnica de los anticuerpos, los cuales reconocen epítomos de la pared celular, las células objetivo tienen que ser aisladas primero como cultivos puros y los anticuerpos producidos a menudo sólo reconocen unas pocas cepas de una especie determinada. Posteriormente se desarrollaron los anticuerpos para la detección de enzimas de amonioxidantes y nitritoxidantes (Aamand *et al.*, 1996; Pinck *et al.*, 2001), que salvan los problemas de los anticuerpos que sólo reconocen epítomos de la pared celular. Estos nuevos anticuerpos se usaron con éxito en la detección de bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en muestras ambientales (Bartosch *et al.*, 1999, 2002; Fiencke *et al.*, 2004), así como en estudios fisiológicos de la enzima clave (Pinck *et al.*, 2001).

Otra alternativa es detectar bacterias autótrofas nitrificantes empleando una variedad de diferentes técnicas que, en general, usan el nucleótido 16S rRNA (Degrange y Bardin, 1995; Hiorns *et al.*, 1995; McCaig *et al.*, 1999), así como la secuencia de la enzima clave

(Rotthauwe *et al.*, 1997; Nold, *et al.*, 2000). El análisis cuantitativo de la estructura de población de bacterias se puede realizar mediante la aplicación de sondas de oligonucleótidos de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Wagner *et al.*, 1995, Mobarry *et al.*, 1996; Voytek *et al.*, 1999).

### **1.3.2.1 Técnica de hibridación *in situ* (FISH).**

La técnica FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) es un técnica citogenética utilizada para detectar y localizar la presencia o ausencia de determinadas secuencias de ADN o ARN. Mediante el análisis FISH podemos identificar “*in situ*” bacterias que pertenecen a un grupo taxonómico específico (especie, género, clase, etc.). Esta técnica utiliza secuencias de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos (*sondas*), que se unen a la fracción 16S del rRNA de la bacteria diana, produciendo una fluorescencia en las bacterias con la fracción de rRNA homóloga (Serafim *et al.*, 2002).

Estas técnicas se basan en la aplicación de los procesos de hibridación que se producen entre secuencias complementarias de material genético. La doble hélice de ADN puede ser desnaturalizada, es decir, se desenrolla y se separan 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. Una secuencia de ADN se puede unir a otra de ADN o también a una secuencia de ARN complementaria, produciéndose un híbrido ADN – ADN, o ADN – ARN. Así que una secuencia de ADN o de ARN de cadena simple, complementaria de la secuencia de interés (*sondas*), puede utilizarse para identificar con gran precisión la presencia de la secuencia en preparaciones de ADN, ARN. La sonda, está marcada de forma que los híbridos formados sean fácilmente detectables.

Las sondas empleadas en esta técnica se deben construir. Debe ser lo suficientemente grande como para hibridar específicamente con su objetivo, pero no tan grande como para impedir el proceso de hibridación. Lo más importante de este método es su casi absoluta especificidad, que ningún otro método de identificación es capaz de alcanzar. Para que una sonda sea específica, debe hibridar con su diana, pero no con las otras cadenas de ácidos nucleicos de la muestra. La especificidad varía con la extensión de la cadena y las condiciones de hibridación, por lo que es posible ajustar dicha especificidad a diferentes niveles filogenéticos.

La diana es la cadena de ARN o ADN que se puede detectar utilizando la sonda. Estas secuencias pueden localizarse en cromosomas, en plásmidos, en ribosomas y mitocondrias. Ciertas regiones de los ribosomas se encuentran en todos los seres vivos, otras son comunes a todas las bacterias, y unas pocas se hallan en los miembros del mismo género o especie, lo que permite utilizar la estructura ribosómica para determinar la taxonomía bacteriana.

En las técnicas de hibridación in situ, el ADN de la célula puede ser teñido de forma independiente del marcaje de la sonda específica. Esto se conoce como contra-tinción y tiñe la cantidad total de bacterias presentes en la muestra. De esta forma, podemos saber la cantidad de bacterias hibridadas respecto a la cantidad total de bacterias. El compuesto más utilizado es el DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol), que emite fluorescencia en azul cuando es excitado por luz ultravioleta.

La técnica FISH, permite detectar la presencia de grupos de bacterias en una muestra, con una gran especificidad. Tan sólo será necesario que haya sido diseñada la sonda específica para la detección del organismo que se desea a estudiar. En el análisis de la población bacteriana presente en una muestra las sondas utilizadas pueden ser diseñadas en el propio laboratorio, o adquiridas a través de centros que se dedican ello, y en los que se pueden adquirir las sondas marcadas con un fluorocromo específico, o incluso sin marcar. En la Tabla 7 se pueden ver las principales sondas disponibles para la detección de bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes.

<b>SONDA</b>	<b>BACTERIAS AMONIOXIDANTES</b>
<b>b-AO233</b>	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria
<b>Cluster6a192 (6a192)</b>	Nitrosomonas oligotropha lineage (Cluster 6a)
<b>NEU</b>	Most halophilic and halotolerant Nitrosomonas spp.
<b>NITROSO4E</b>	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria
<b>Nm143-446-1</b>	Nitrosomonas sp. Nm143-related clones
<b>Nm143-446-2</b>	Nitrosomonas sp. Nm143-related clones
<b>Nmar831</b>	Nitrosomonas marina-related clones
<b>NmII</b>	Nitrosomonas communis lineage
<b>NmIII</b>	Nitrosomonas marina lineage
<b>NmIV</b>	Nitrosomonas cryotolerans lineage
<b>Nmo218</b>	Nitrosomonas oligotropha-lineage
<b>Nmo254</b>	Nitrosomonas
<b>Nmo254a</b>	Nitrosomonas
<b>NmoCL6a_205</b>	Nitrosomonas cluster 6a
<b>NmoCL6b_376</b>	Nitrosomonas cluster 6b
<b>NmoCL7_439</b>	Nitrosomonas cluster 7
<b>NmV (Ncmob)</b>	Nitrosococcus mobilis ("Nitrosomonas") lineage
<b>Nsc825</b>	betaproteobacterial AOB
<b>Nscoc1248</b>	Nitrosococcus oceani, Nitrosococcus halophilus
<b>Nscoc128</b>	Nitrosococcus oceani, N. halophilus (Gammaproteobacteria)
<b>Nscoc65</b>	Nitrosococcus oceani, Nitrosococcus halophilus
<b>Nscry1004</b>	Nitrosomonas cryotolerans
<b>Nse1472</b>	Nitrosomonas europea, halophila, eutropha, Kraftisried-Isolat Nm103
<b>Nsm156</b>	Nitrosomonas spp., Nitrosococcus mobilis
<b>NSMR34</b>	Nitrospira tenius-like ammonia-oxidizing bacteria
<b>NSMR76</b>	Nitrosomonas marina-like ammonia-oxidizing bacteria
<b>Nso1225</b>	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria
<b>Nso190</b>	Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria
<b>Nsp436</b>	Nitrospira spp.
<b>NspCL1_249</b>	Nitrospira cluster 1
<b>NspCL2_458</b>	Nitrospira cluster 2
<b>NspCL3_454</b>	Nitrospira cluster 3
<b>NspCL4_446</b>	Nitrospira cluster 4
<b>Nsv443</b>	Nitrospira spp.
<b>SONDA</b>	<b>BACTERIA NITRITOXIDANTES</b>
<b>NB1000</b>	Nitrobacter spp.
<b>Ncc214</b>	Nitrococcus mobilis
<b>NIT3</b>	Nitrobacter spp.
<b>Nsn227</b>	Nitrospina gracilis
<b>Nspmar62</b>	Nitrospira marina-related clones
<b>Nsr1145</b>	Nitrospira spp.
<b>NSR1156</b>	Nitrospira moscoviensis, freshwater Nitrospira spp.
<b>NSR447</b>	Nitrospira spp.
<b>NSR826</b>	Nitrospira moscoviensis, freshwater Nitrospira spp.
<b>Nsr989</b>	Nitrospira marina
<b>Ntcoc206</b>	Nitrococcus mobilis
<b>Ntcoc84</b>	Nitrococcus mobilis
<b>Ntspa1026</b>	Nitrospira moscoviensis, activated sludge clones A4 and A11
<b>Ntspa1151</b>	Sublineage II of the genus Nitrospira
<b>Ntspa1431</b>	Sublineage I of the genus Nitrospira
<b>Ntspa454</b>	Nitrospira moscoviensis 710-9 clone
<b>Ntspa662</b>	genus Nitrospira
<b>Ntspa685</b>	Nitrospira moscoviensis, Nitrospira marina and 710-9 clone
<b>Ntspa712</b>	most members of the phylum Nitrospirae
<b>NTSPA714</b>	Phylum Nitrospira, not Thermodesulfobivrio islandicus
<b>Ntspn693</b>	Nitrospina gracilis
<b>Ntspn994</b>	Nitrospina gracilis

Tabla 7. Sondas FISH publicadas para hibridar sobre el 16S rRNA de los organismos relevantes más comunes en la oxidación de amonio y nitrito.

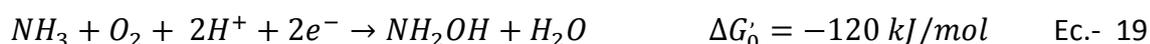
### 1.3.3 Metabolismo de las bacterias.

Como se ha comentado anteriormente, las bacterias autótrofas nitrificantes son bacterias quimiolitotróficas que se caracterizan por la capacidad de crecer mediante la oxidación de compuestos de nitrógeno inorgánico (amonio y nitrito). Estas bacterias obtienen todo el carbono celular del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que se fija a través del ciclo de Calvin/Benson.

A continuación se describen las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por los dos grupos de bacterias involucradas en el proceso de nitrificación.

#### 1.3.3.1 Bioquímica de las bacterias amonioxidantes.

En condiciones aerobias, las bacterias amonioxidantes extraen su energía de la oxidación del amonio a nitrito, que es catalizada por dos enzimas clave, amonio monooxigenasa (AMO) y oxidorreductasa hidroxilamina (HAO). La enzima AMO oxida el amonio a hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH), compuesto intermedio del proceso (Ec.- 19). Esta oxidación se divide en dos partes (Ec.- 17 y Ec.- 18). La reducción exergónica (variación de la energía libre de Gibbs es negativa) de O<sub>2</sub> en el agua (Ec.- 18) permite la oxidación endergónica (incremento de energía libre es positivo) del amonio (Ec.- 17). En consecuencia, la oxidación del amonio necesita dos electrones exógenamente suministrados (Wood, 1988; Schmidt y Bock, 1998).



La hidroxilamina es después oxidada por la enzima periplasmática HAO a nitrito (Ec.- 20).



Esta segunda oxidación está también compuesta por varias partes en las cuales se forman la enzima ligada nitroxilo (NOH) y el óxido nítrico (NO) (Hooper y Terry, 1979; Hooper y Balny, 1982). La enzima NOH puede ser liberada como el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y óxido nítrico (NO) (Anderson, 1965; Anderson y Levine, 1986). Dos electrones de la oxidación de hidroxilamina (Ec.- 20) se transfieren a la oxidación del amonio (Ec.- 19) y los otros dos electrones pasan a la cadena respiratoria para la generación de energía (Ec.- 21). La reacción global muestra que la oxidación del amonio causa la producción de ácido nitroso (Ec.- 23).



Bajo condiciones anóxicas, *Nitrosomonas eutropha* puede crecer con el dióxido de nitrógeno/tetraóxido de dinitrógeno (NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) como fuente de oxígeno en lugar del O<sub>2</sub> para la oxidación del amonio a hidroxilamina (Schmidt y Bock, 1997, 1998). Además, la AMO aislada puede oxidar el amonio con el NO<sub>2</sub> bajo condiciones anóxicas (Fiencke *et al.*, 2004). En ambos casos, se forma NO. Basándose en estos hallazgos, se postuló que NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> también podrían ser utilizados como dadores de oxígeno mediante procesos aeróbicos y el NO producido reacciona con O<sub>2</sub> para regenerar NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Zart y Bock, 1998). Este ciclo especulado de óxido de nitrógeno es apoyado por la formación de NO y NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> durante la oxidación aerobia del amonio (Stuven y Bock, 2001).

El amonio puede ser utilizado directamente como sustrato o puede obtenerse mediante la hidrolización de urea (Koops *et al.*, 1991). La capacidad de utilizar la urea como fuente de amonio puede ser importante para las bacterias amonioxidantes en los suelos ácidos, donde la concentración de amonio real es baja como consecuencia de que el pH es bajo (Boer y Kowalchuk, 2001).

### 1.3.3.2 Bioquímica de las bacterias nitritoxidantes.

Las bacterias nitritoxidantes extraen su energía de la oxidación de los nitritos en nitratos (Ec.- 24). Un único paso está involucrado en esta oxidación, que se lleva a cabo por la enzima nitrito oxidoreductasa en *Nitrobacter*. En los géneros *Nitrococcus*, *Nitrospina* y *Nitrospira*, la enzima clave se llama sistema nitrito-oxidante. Para la oxidación del nitrito, no se consume O<sub>2</sub> debido a que el átomo de oxígeno en la molécula de nitrato se deriva de agua. Los dos electrones liberados durante la oxidación son transportados a través de los citocromos al O<sub>2</sub> para la conservación de la energía (Ec.- 25). Cuando el nitrito se oxida a nitrato no hay producción de protones (Ec.- 26).



### 1.3.4 Factores que afectan al crecimiento de las bacterias.

La velocidad de nitrificación depende de factores ambientales tales como temperatura, pH, concentración de sustrato y presencia de compuestos tóxicos (Henze *et al.*, 2002). En este apartado se van a enumerar y comentar los principales factores que influyen en el desarrollo de las bacterias responsables del proceso de oxidación de amonio y nitrito. Entre los factores podemos distinguir aquellos que afectarán al crecimiento de las bacterias si su cantidad es limitada y otros que inhiben directamente a las bacterias si superan un cierto límite en el medio.

**Amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)/ Nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).** Son las fuentes de energía (dadores de electrones) de las bacterias que oxidan amonio y de las que oxidan nitrito (respectivamente). Por esta razón se consideran los factores limitantes más importantes en el crecimiento de las bacterias, junto con el oxígeno. El amoníaco es el sustrato real de las bacterias AOB, mientras que las bacterias NOB usan la forma no ionizada del nitrito (ácido nitroso) como su sustrato (Anthonisen *et al.*, 1976; Wiesmann, 1994). La cinética característica del crecimiento de las bacterias autótrofas nitrificantes es de tipo Monod, con la que el grado de limitación por sustrato viene determinado por la constante de semisaturación incluida. Generalmente, la constante de saturación de las bacterias amonioxidantes es mayor que la de las nitritoxidantes; sin embargo, presentan una variabilidad notable según la bibliografía consultada.

Por otro lado, tanto el sustrato de las bacterias amonioxidantes (NH<sub>3</sub>) como el de las bacterias nitritoxidantes (HNO<sub>2</sub>) puede llegar a inhibirlas si se encuentran en un medio con una concentración muy elevada de estos (Anthonisen *et al.*, 1976; Vadivelu *et al.*, 2007; Van Hulle *et al.*, 2007). Las bacterias nitritoxidantes son más sensibles que las amonioxidantes a los efectos de inhibición provocados por ambos compuestos (Vadivelu *et al.*, 2007), aunque hay una enorme disparidad en los valores recopilados en bibliografía.

Anthonisen *et al.* (1976), como resultado del estudio de la inhibición de la nitrificación por NH<sub>3</sub> y HNO<sub>2</sub>, determinaron un rango de inhibición por NH<sub>3</sub> de las bacterias AOB y NOB de 10

a 150 mg N-NH<sub>3</sub>/l y 0.1-1.0 mg N-NH<sub>3</sub>/l, respectivamente. También se concluyó en estos estudios que el HNO<sub>2</sub> tiene un impacto considerable sobre las bacterias NOB (0.2-2.8 mg N-HNO<sub>2</sub>/l) pero no sobre las bacterias AOB. Estos resultados son algo diferentes a los publicados por Vadivelu *et al.* (2007), que no detectaron ninguna inhibición de la actividad de las bacterias AOB a concentraciones de hasta 16 mg N-NH<sub>3</sub>/l, pero observaron una total inhibición de su actividad a concentraciones de HNO<sub>2</sub> de 0.4 mg N-HNO<sub>2</sub>/l. En cuanto a las bacterias nitritoxidantes, determinaron una total inhibición de la actividad a concentraciones superiores a 6 mg N-NH<sub>3</sub>/l y 0.02 mg N-HNO<sub>2</sub>/l. Por otro lado existen estudios en los que las inhibiciones por el sustrato se consideran despreciables (Hellings *et al.*, 1999; Volcke *et al.*, 2006; Moussa *et al.*, 2005 entre otros). Esta gran diversidad de resultados se puede deber a diferentes comunidades de bacterias y/o la aclimatación de la biomasa a condiciones extremas.

**Oxígeno disuelto (O<sub>2</sub>).** Debido a que las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes requieren en el proceso de oxidación una importante cantidad de oxígeno, el efecto de la limitación del crecimiento debido a una falta de oxígeno ha sido estudiado ampliamente. Cuando las bacterias no tienen una limitación de sustrato, el efecto del oxígeno disuelto se ajusta a una cinética de Monod, que incluye una constante de semisaturación para el oxígeno que se encuentra entre 0.25 -2.5 mg/l para cultivos puros de bacterias nitrificantes (Painter, 1986).

Resulta un hecho constatado que las bacterias que oxidan amonio tienen una constante de saturación diferente que la de las bacterias que oxidan nitrito. Existen estudios que determinan que las bacterias amonioxidantes tienen una menor afinidad por el oxígeno que las bacterias nitritoxidantes (Hellings *et al.*, 1998; Pérez, 2004) y otros, que por el contrario, proponen una constante de afinidad mayor para las nitritoxidantes (Wiesmann, 1994; Pirsing, 1996; Guisasola *et al.*, 2005; Ciudad *et al.*, 2006). Pero hay que tener también en cuenta que elevadas concentraciones de oxígeno pueden llegar a tener un efecto inhibitorio. Sin embargo, esta inhibición por oxígeno parece solo tener relevancia en procesos en los cuales se añade oxígeno puro o una elevada presión parcial de oxígeno, y no en los que se aporta aire (Prosser, 1989).

**Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).** La limitación de CO<sub>2</sub> en el crecimiento autótrofo se produce por fuente de carbono. Es difícil encontrar este tipo de limitación debido a la elevada solubilidad del CO<sub>2</sub>. Es más probable que se produjese primero una limitación por oxígeno disuelto. No obstante, si el caudal de aireación no contuviese CO<sub>2</sub>, se debería asegurar cierto nivel de

carbonatos en el medio, para que no existiese limitación por fuente de carbono en el desarrollo de las bacterias.

**pH.** El proceso de nitrificación es muy sensible al pH del medio. Las bacterias autótrofas nitrificantes requieren de un rango determinado de pH para poder llevar a cabo el proceso de oxidación de amonio y nitrito en condiciones óptimas.

En la limitación del crecimiento de las bacterias debido al pH se pueden diferenciar dos causas. La primera es que el pH afecta directamente a la actividad enzimática, lo que provoca una pérdida de actividad en las células. Este efecto es debido a la activación – desactivación de las bacterias relacionado con la inhibición de los sitios activos de las enzimas por la unión de  $H^+$  y  $OH^-$  (García y Fernández-Polanco, 1996). La segunda causa es que la concentración de protones afecta al equilibrio ácido-base de los sustratos de ambos grupos de bacterias:  $NH_3/NH_4^+$  y  $HNO_2/NO_2^-$  (lo cual puede provocar inhibición), y afecta también a la concentración disponible de  $HCO_3^-$  (fuente de carbono).

El intervalo óptimo de crecimiento de estas bacterias descrito por Metcalf y Eddy, 1995 fue de 7.5-8.6. Sin embargo, en estudios posteriores este rango de pH se ha modificado considerablemente dependiendo las condiciones en las que se llevó a cabo el estudio, así por ejemplo, Jones *et al.*, (2007) determinaron un rango de pH de 5.5-9.5 en un SBR diseñado para el tratamiento de la recirculación de agua de la línea de fango.

**Temperatura.** Al igual que para todas las bacterias, el crecimiento de las bacterias nitrificantes varía con la temperatura. Existe un rango óptimo de temperaturas característico de cada grupo de bacterias. El valor de la temperatura afecta a los valores de las constantes de equilibrio ácido/base, gas/líquido, a la solubilidad de las sustancias, a los coeficientes de difusión y a la actividad enzimática.

El incremento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. La muerte a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de las proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas. La falta de crecimiento a temperaturas muy bajas se debe a la reducción de la velocidad de crecimiento por la reducción de la velocidad de reacción y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. Es importante tener en cuenta que a temperaturas bajas, el metabolismo celular se ralentiza y las células paran de crecer; aunque no tienen porqué morir. Sin embargo, cuando

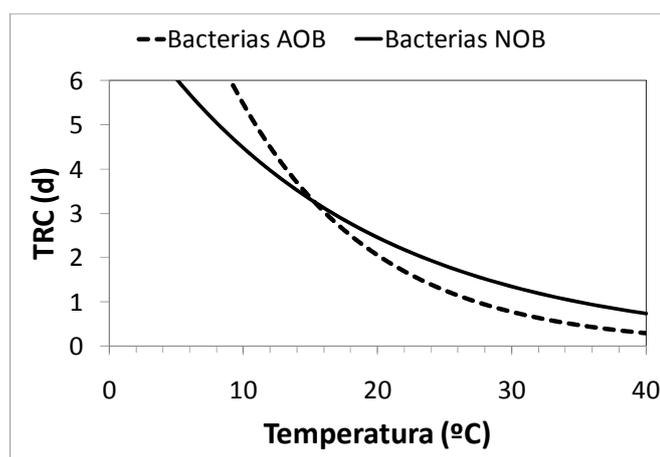
la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura.

La correlación entre la tasa máxima de crecimiento de las bacterias autótrofas nitrificantes y la temperatura es descrita normalmente por la ecuación de van't Hoff-Arrhenius a temperaturas de 5 a 40 °C (Ec.- 10) (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Sin embargo, hay que recordar el hecho de que esta ecuación no proporciona una buena estimación a temperatura muy altas, o cuando la temperatura a estudiar está muy alejada de la temperatura de referencia.

$$\mu_t = \mu_{ref} \cdot e^{\theta \cdot (T - T_{ref})} \quad \text{Ec.- 27}$$

En donde  $\mu_t$  es la tasa máxima de crecimiento específica ( $d^{-1}$ ),  $\mu_{ref}$  es la tasa máxima de crecimiento ( $d^{-1}$ ) a la temperatura de referencia ( $T_{ref}$ ) y  $\theta$  es el coeficiente de temperatura.

Como se ha comentado ya en apartados anteriores, la temperatura tiene un efecto diferente sobre la actividad de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes. Las bacterias AOB tienen mayor tasa máxima de crecimiento que las bacterias NOB a una temperatura superior a 15 °C, pero esta tendencia se invierte a temperaturas inferiores (Hellings *et al.*, 1998). Como se puede ver en la Figura 14 una alta temperatura no solamente favorece al crecimiento de las AOB, también incrementa la diferencia entre las tasas de crecimiento de ambos grupos de bacterias (Balmelle, 1992; Hunik, 1993; Yoo *et al.*, 1999).



**Figura 14.** Tiempo de retención celular (TRC) mínimo para las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en función de la temperatura.

Aparte de la actividad de las bacterias, la temperatura también afecta a la solubilidad de oxígeno en el agua. Un aumento de la temperatura produce una reducción en la solubilidad de los gases, lo que supone un incremento en los costes de aireación. Finalmente, la

temperatura también gobierna el grado de disociación en los equilibrios químicos como  $\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$ ,  $\text{HNO}_2^- - \text{NO}_2$  y  $\text{CO}_2 - \text{HCO}_3^- - \text{CO}_3^{2-}$ .

**Transferencia de materia.** En el caso de cultivos en suspensión, la transferencia de materia entre fases puede limitar el crecimiento de las bacterias (ej. el  $\text{O}_2$  que se suministra en fase gas tiene que pasar a la fase líquida para poder ser utilizado por las bacterias). En el caso de biomasa inmovilizada hay que tener en cuenta además la transferencia entre la fase líquida y la sólida y la posterior difusión en el sólido (Garrido *et al.*, 1997).

**Salinidad.** La salinidad también tiene una influencia en la actividad de nitrificación (Somville 1984, Rysgaard *et al.* 1999, Claros *et al.*, 2010), así como en la estructura comunitaria de las bacterias (Pommerening-Roser *et al.* 1996, Stephen *et al.* 1998, Purkhold *et al.* 2000).

Las bacterias son capaces de sobrevivir en ambientes con altos niveles de salinidad, manteniendo su citoplasma en el mismo nivel osmótico que del medio ambiente circundante (Oren 1999). Se han detectado bacterias amonioxidantes en ambientes marinos y moderadamente salinos (Stephen *et al.* 1996; Bano y Hollibaugh, 2000; Ward *et al.* 2000). Sin embargo, recientes estudios han determinado una reducción de la actividad de las bacterias o una inhibición total al someter a la biomasa a elevada salinidad (Claros *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2002; Moussa *et al.*, 2006). Por otro lado, estudios como los llevados a cabo por Vredenberg *et al.* (1997) y Dinceer *et al.*, (1999) determinaron que la salinidad tiene un efecto más negativo sobre las bacterias nitritoxidantes que las amonioxidantes, mientras que Moussa *et al.* (2006) concluyó lo contrario. Esta disparidad en los resultados pueden ser debidas principalmente a diferencias en el fango usado en los experimentos, las condiciones experimentales (pH,  $T^a$ , OD,...) o las sales empleadas en los ensayos.

**Presencia de sustancias tóxicas y otros.** De la misma forma en que el pH o la temperatura afectan positiva o negativamente al crecimiento de las bacterias según el valor de estos parámetros en el medio de cultivo, el efecto de las sustancias tóxicas sobre las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes depende de la concentración de dicha sustancia y del tiempo de exposición de las bacterias a esta. Las sustancias tóxicas más estudiadas en el ámbito de las aguas residuales son: tiourea, cianuro, fenoles, anilina (efecto importante sobre las *Nitrosomonas*), clorato y cianato (mayor toxicidad sobre *Nitrobacter*). Los compuestos orgánicos (proteínas, aminas, taninos,...) pueden también inhibir la actividad de las bacterias autótrofas nitrificantes (Blum y Speece, 1991).

#### 1.4 **Modelación matemática en el tratamiento de las aguas residuales.**

La elevada complejidad de los procesos biológicos que tienen lugar en una EDAR así como su comportamiento altamente dinámico hace necesario el uso de modelos matemáticos en el campo del tratamiento de aguas residuales. El desarrollo de un modelo matemático sirve para describir el comportamiento actual y previsible de un proceso mediante unas bases teóricas bien establecidas. Al realizar la modelación se lleva a cabo un gran esfuerzo por conocer, primero de forma cualitativa y después cuantitativa, el sistema, asignando un sentido físico para cada parámetro y estudiando su efecto por separado, los cuales tendrán una interacción combinada sobre el proceso global.

Las principales aplicaciones de los modelos matemáticos, que finalmente determinan su estructura y complejidad, se pueden agrupar en:

- ✓ **Investigación:** para comprobar las consecuencias de los nuevos conocimientos y explicar adecuadamente los procesos observados.
- ✓ **Diseño:** para diseñar EDARs y comprobar la influencia de variaciones en las condiciones de entrada y/o en los parámetros del proceso en su funcionamiento.
- ✓ **Operación y control:** para elaborar y probar estrategias de control que lleven el proceso al punto deseado de funcionamiento a pesar de las perturbaciones internas y externas.
- ✓ **Diagnóstico:** para interpretar los datos históricos de la planta, detectar posibles anomalías y sugerir las causas.

Un modelo matemático es un conjunto de ecuaciones diferenciales donde se relacionan las variables de estado del proceso de manera que su resolución proporciona la trayectoria seguida por estas variables en el tiempo. Estas ecuaciones son el resultado de la combinación de las ecuaciones de conservación de materia y energía con las ecuaciones de velocidad de los procesos implicados, que pueden ser tanto físicos como químicos y/o biológicos. La definición del modelo también puede incorporar una serie de restricciones propias del modelo, como las leyes de equilibrio, u otras restricciones externas referentes a la legislación, normas de seguridad,... Una vez formulado el modelo, éste se puede resolver y comparar con datos experimentales. Las diferencias observadas pueden ser utilizadas para refinar e incluso redefinir el modelo hasta conseguir una buena representación de los hechos experimentales.

De manera general, la evolución de una variable de estado con el tiempo viene definida por una ecuación diferencial ordinaria del tipo:

$$\frac{dx}{dt} = f(x, u, t, \theta) \quad x_{t=0} = x_0 \quad \text{Ec.- 28}$$

Donde  $f$  hace referencia a la estructura matemática del modelo,  $x$  representa el vector de variables de estado implicadas en el sistema,  $u$  hace referencia a las entradas del sistema y  $\theta$  es el conjunto de parámetros del modelo.

Independientemente de la estructura del modelo, las ecuaciones matemáticas que relacionan las entradas y salidas contienen tres tipos de constituyentes: variables, constantes y parámetros. Las variables están formadas por las entradas y salidas del modelo y las diferentes variables de estado, mientras que la diferencia entre constantes y parámetros es menos evidente. Generalmente se consideran constantes todos aquellos parámetros que nunca cambian su valor en todas las posibles aplicaciones del modelo. Parámetros son pues los constituyentes del modelo cuyo valor puede cambiar según las características del sistema donde se aplica, de manera que su determinación para cada caso particular es imprescindible.

#### **1.4.1 Modelación de los procesos biológicos.**

Los procesos biológicos que tienen lugar en una estación depuradora de aguas residuales consisten en transformaciones bioquímicas que realizan los microorganismos durante su crecimiento. La modelación matemática de estos procesos de crecimiento es pues fundamental para poder simular el funcionamiento de una EDAR. El grado de detalle con que se describe los procesos determina la complejidad final del modelo, pero también el grado de variabilidad de sus parámetros.

##### **1.4.1.1 Bases del crecimiento microbiano: La cinética de Monod.**

La mayor parte de los modelos desarrollados para la simulación de los procesos biológicos de degradación se basan en el modelo empírico de crecimiento propuesto por Monod a mediados del siglo XX (Monod, 1942). Este modelo (Ec.- 29) fue el primero en introducir el concepto de sustrato limitante en el crecimiento ( $S$ ):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Ec.- 29}$$

Según este modelo, los microorganismos crecen de manera exponencial siempre y cuando no haya limitaciones de sustrato en el medio. Por tanto, la velocidad de crecimiento de los microorganismos ( $X$ ) vendrá definida por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot X \quad \text{Ec.- 30}$$

En la expresión cinética de Monod, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) viene dada en función de la concentración de sustrato que limita el crecimiento mediante dos parámetros: la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y el coeficiente de afinidad por el sustrato ( $K_S$ ). El significado biológico de los parámetros es el siguiente:  $\mu_{max}$  indica la velocidad máxima de crecimiento en condiciones donde el sustrato no limita el crecimiento, y  $K_S$  hace referencia a la concentración de sustrato que hace que la velocidad específica de crecimiento sea la mitad de su valor máximo.

La aplicación del modelo de Monod a medios en los que el crecimiento de los microorganismos puede estar limitado por más de un tipo de sustrato o por la presencia de compuestos inhibidores del crecimiento ha llevado a posteriores modificaciones en la ecuación cinética del crecimiento.

Para tener en cuenta la limitación de crecimiento por varios sustratos se propusieron dos tipos de modelos alternativos:

- ◇ *Modelos interactivos.* En estos modelos se supone que ambos nutrientes controlan la velocidad de reacción en forma simultánea. Se propone la “ecuación múltiple de Monod”:

$$\mu = \hat{\mu} \left( \frac{S_{S1}}{S_{S1} + K_{S1}} \right) \left( \frac{S_{S2}}{S_{S2} + K_{S2}} \right) \quad \text{Ec.- 31}$$

El valor de la tasa de crecimiento depende de los dos sustratos involucrados. En cualquier caso las concentraciones de los sustrato  $S_1$  y  $S_2$  son tal que ambos términos son inferiores a la unidad, ambos sustratos actúan reduciendo  $\mu$  por debajo de  $\hat{\mu}$ .

- ◇ *Modelos no-interactivos.* En este caso se considera que solo uno de los sustratos es limitante. De esta forma la tasa de crecimiento será la mínima obtenida por las funciones de Monod independientes de cada sustrato (Ec.- 32).

$$\mu = \min \left( \frac{\hat{\mu}S_{S1}}{S_{S1} + K_{S1}}, \frac{\hat{\mu}S_{S2}}{S_{S2} + K_{S2}} \right) \quad \text{Ec.- 32}$$

En la modelación de los procesos que tienen lugar en los sistemas de tratamiento de aguas residuales suele emplearse los modelos interactivos, ya que este tipo de formulación es apropiada cuando los sustratos limitantes son el dador y aceptor de electrones.

En cuanto a la inhibición del crecimiento, esta puede ser incluida en los modelos de diversas formas en función del tipo de inhibición de la sustancia correspondiente:

**Inhibición no competitiva:**

$$\frac{K_{I,i}}{K_{I,i} + S_i} \quad \begin{array}{l} S_i = \text{concentracion de sustancia inhibidora} \\ K_{I,i} = \text{coeficiente de inhibición} \end{array} \quad \text{Ec.- 33}$$

**Inhibición competitiva:**

$$\frac{S_j}{S_j + K_{S,j} \cdot \left( 1 + \frac{S_i}{K_{I,i}} \right)} \quad \begin{array}{l} \text{La sustancia inhibidora } i \text{ compite con el sustrato } j. \\ K_{I,i} \text{ representa el valor de } S_i \text{ que provoca un aumento de } K_{S,j} \\ \text{al doble de su valor} \end{array} \quad \text{Ec.- 34}$$

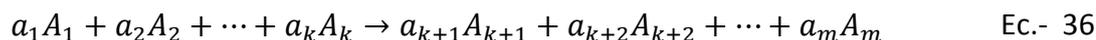
**Inhibición acompetitiva:**

$$\frac{S_j}{K_{S,j} + S_j \cdot \left( 1 + \frac{S_i}{K_{I,i}} \right)} \quad \begin{array}{l} \text{Caso parecido al anterior, pero aquí el grado de inhibición} \\ \text{también es función de la cantidad de sustrato presente.} \end{array} \quad \text{Ec.- 35}$$

El tipo de inhibición más utilizada en el campo de los tratamientos de aguas residuales es la inhibición no competitiva, la cual puede venir dada por una sustancia externa, por un producto formado por el propio proceso o por el mismo sustrato del proceso en cantidades elevadas.

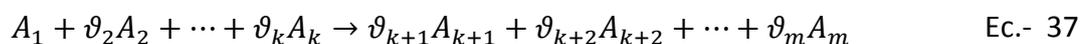
**1.4.1.2 Estequiometria y cinética de los procesos biológicos.**

Las transformaciones que llevan a cabo los microorganismos pueden describirse por medio de reacciones bioquímicas. Por lo tanto, dichas transformaciones quedan definidas mediante relaciones estequiométricas y ecuaciones cinéticas. Normalmente, las relaciones estequiométricas se expresan en unidades molares siendo su fórmula general:



donde  $a_1$  hasta  $a_k$  representan los coeficientes estequiométricos de cada uno de los reactivos ( $A_1$  hasta  $A_k$ ). De la misma forma, los productos de la reacción química (desde  $A_{k+1}$  hasta  $A_m$ ) tienen asociados sus correspondientes coeficientes estequiométricos (desde  $a_{k+1}$  hasta  $a_m$ ).

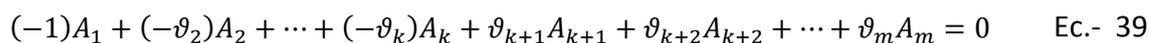
En cambio, en el tratamiento biológico de aguas residuales las unidades molares no se suelen utilizar, expresando normalmente las relaciones estequiométricas en unidades másicas. Además, al escribir las reacciones químicas se suele normalizar los coeficientes estequiométricos en base a uno de los reactivos utilizados o productos formados. Por ejemplo, si se normaliza en base al reactivo  $A_1$ , la reacción se convierte en:



Los coeficientes estequiométricos normalizados ( $\vartheta_i$ ) se calculan del siguiente modo:

$$\vartheta_i = \frac{a_i}{a_1} \quad \text{Ec.- 38}$$

La reacción química cumple el balance de masas, es decir, se puede reescribir de la forma:



Los coeficientes estequiométricos de los reactivos tienen signo negativo (se consumen) y los de los productos son positivos (se forman).

Puesto que hay una relación entre los reactivos que se consumen y los productos que se forman, también existe una relación entre las velocidades a las que son consumidos o formados. Si se define  $r_i$  como la velocidad de transformación del componente  $i$  y  $r$  como la velocidad de la reacción química, la relación queda expresada del siguiente modo:

$$\frac{r_1}{(-1)} = \frac{r_2}{(-\vartheta_2)} = \dots = \frac{r_k}{(-\vartheta_k)} = \frac{r_{k+1}}{(\vartheta_{k+1})} = \dots = \frac{r_m}{(\vartheta_m)} = r \quad \text{Ec.- 40}$$

donde  $r_i$  es la velocidad de consumo de los reactivos  $A_i$  para  $i = 1\dots k$ , y la velocidad de formación de los productos  $A_i$  para  $i = k+1\dots m$ .

Por regla general, en el tratamiento biológico de aguas residuales un componente  $i$  ( $i = 1 \dots m$ ) participa en más de una reacción química  $j$  ( $j = 1 \dots n$ ), pudiendo ser reactivo en unas y producto en otras:

$$\begin{aligned}
 (-1)A_1 + (-\vartheta_{2,1})A_2 + \dots + (-\vartheta_{k,1})A_k + \vartheta_{k+1,1}A_{k+1} + \dots + \vartheta_{m,1}A_m &= 0 & r_1 \\
 (-\vartheta_{1,2})A_1 + (-\vartheta_{2,2})A_2 + \dots + (-1)A_k + \vartheta_{k+1,2}A_{k+1} + \dots + \vartheta_{m,2}A_m &= 0 & r_2 \\
 \dots + \dots + \dots + \dots + \dots + \dots + \dots &= 0 & \\
 (-\vartheta_{1,n})A_1 + (-\vartheta_{2,n})A_2 + \dots + (-\vartheta_{k,n})A_k + \vartheta_{k+1,n}A_{k+1} + \dots + (-1)A_m &= 0 & r_n
 \end{aligned}
 \tag{Ec.- 41}$$

El coeficiente  $\vartheta_{i,j}$  representa el coeficiente estequiométrico normalizado del componente  $i$  en la reacción química  $j$ . Por lo tanto, la velocidad de transformación de un componente  $i$  ( $r_i$ ) se obtendrá de la suma de todas las velocidades de las reacciones en las que participa multiplicadas por su coeficiente estequiométrico en dicha reacción (Ec.- 42).

$$r_i = \sum_{j=1}^n \vartheta_{i,j} \cdot r_j
 \tag{Ec.- 42}$$

Si el resultado es un valor negativo, el componente  $i$  desaparecerá en el proceso global. En cambio, si  $r_i$  es positivo el componente  $i$  se estará formando.

### 1.4.1.3 Formato y notación.

Muchos de los modelos cinéticos describen sistemas complejos, en los que la mayoría de sus componentes participan en más de un proceso dificultando el seguimiento de sus transformaciones. Para la presentación de los modelos de forma clara, sencilla y estructurada se utiliza la notación matricial. En 1987, la IAW Task Group optó por esta modalidad en el desarrollo del modelo ASM1 (Activated Sludge modelo N°1, Henze *et al.*, 1987), demostrando su gran utilidad.

Este tipo de notación se basa en colocar los coeficientes estequiométricos  $\vartheta_{i,j}$  en una tabla, conocida como matriz de Petersen, indicando como varía cada componente  $i$ , presentado en columnas sucesivas, en cada uno de los procesos  $j$ , presentado en filas sucesivas. En la Tabla 8 se puede ver un ejemplo de esta notación con el crecimiento de las bacterias heterótrofas en un medio aerobio utilizando sustrato soluble orgánico como fuente de energía y materia. En el ejemplo mostrado todos los coeficientes están normalizados respecto al correspondiente a la biomasa. Como se puede ver en la tabla el valor del coeficiente es cero cuando el componente no participa en el proceso, negativo cuando dicho componente se

consume y positivo cuando se genera. Además de los coeficientes estequiométricos se debe presentar en la matriz o fuera de ella la ecuación de velocidad para cada uno de los distintos procesos.

Componente i →	1	2	3	Velocidad de crecimiento
Proceso j ↓	X <sub>B</sub>	S <sub>S</sub>	S <sub>O</sub>	r <sub>j</sub>
	<i>Biomasa</i> (mg DQO/l)	<i>Sustrato</i> (mg DQO/l)	<i>Oxígeno disuelto</i> (mg DQO/l)	(mg DQO/l/d)
<b>1 Crecimiento aerobio</b>	1	$-\frac{1}{Y}$	$-\frac{1-Y}{Y}$	$\mu \cdot \frac{S_S}{K_S + S_S} \cdot X_B$
<b>2 Lisis</b>	-1	1		$b \cdot X_B$

Tabla 8. Notación matricial para el crecimiento de las bacterias heterótrofas bajo condiciones aerobias.

La aparición del modelo ASM1 supuso, además de la aparición de un nuevo concepto de simulación dinámica de los procesos de tratamiento de las aguas residuales, un creciente avance en la estandarización de la notación y estructura de los modelos. La notación utilizada permite distinguir entre los componentes solubles, representados por una “S” seguida del subíndice que representa cada componente, y los componentes particulados, representados con una “X” seguida de su correspondiente subíndice. Por lo que respecta a los parámetros del modelo, cabe distinguir entre parámetros estequiométricos y parámetros cinéticos. Los parámetros estequiométricos son aquellos que se utilizan para el cálculo de los coeficientes estequiométricos de cada proceso, como son los rendimientos de los microorganismos, representado por una “Y” seguida del subíndice relativo a cada tipo de microorganismos considerado en el modelo. Los parámetros cinéticos son aquellos que se utilizan en las expresiones cinéticas de cada proceso, como la velocidad de crecimiento máxima de cada microorganismo, representada por una “μ” seguida del subíndice relativo al tipo de microorganismo.

La notación matricial permite comprobar las ecuaciones de continuidad o conservación en las filas de la matriz. Las ecuaciones de conservación se aplican a la masa, cargas eléctricas, DQO, SST, N y P para asegurar que ninguno de estos términos se crea ni se destruye, tan solo se transforman. La ecuación de continuidad válida para cualquier proceso j y todas las variables (c) sujetas a conservación, tiene la siguiente forma:

$$\sum_i \vartheta_{i,j} \cdot i_{c,i} = 0 \quad \text{Ec.- 43}$$

donde  $\vartheta_{i,j}$  es el coeficiente estequiométrico del componente i en el proceso j, y  $i_{c,i}$  indica el contenido en material c del componente i. Este factor permite el paso de las unidades del componente i a las de la variable c a la cual se aplica la ecuación de conservación.

Estas ecuaciones de continuidad resultan de gran utilidad para el cálculo de algunos coeficientes estequiométricos, siempre y cuando se conozca el resto. De este modo, se ahorra la necesidad de su determinación experimental. En los modelos de fangos activados más utilizados, la ecuación de continuidad de la DQO se utiliza para determinar el coeficiente estequiométrico del oxígeno.

#### **1.4.2 Modelos existentes en el tratamiento de aguas residuales.**

##### **1.4.2.1 Modelos matemáticos para el proceso de fangos activados.**

Los modelos biológicos para la descripción del de fangos activados han evolucionado en gran medida desde los primeros modelos, donde solo se consideraba la eliminación de materia orgánica (Mckinney, 1962), hasta los más actuales, donde se han ido incorporando progresivamente nuevos procesos para tener en cuenta también la eliminación biológica de nitrógeno y fósforo.

A principios de los años 80, la *International Water Association* (IWA) (antigua IAWPRC, International Association on Water Pollution Research and Control), organizó un grupo de trabajo para revisar los distintos modelos existentes de fangos activados e incorporar los procesos de nitrificación y desnitrificación. Fruto de esta iniciativa, el año 1986 aparece la primera versión del modelo (Grady *et al.*, 1986), que posteriormente sería publicado con el nombre de *Activated Sludge Model N° 1* (ASM1, Henze *et al.*, 1987). Este modelo considera dos grupos e bacterias (autótrofas y heterótrofas) y divide la actividad de los microorganismos en los siguientes procesos: crecimiento de las bacterias heterótrofas en condiciones aerobias y en condiciones anóxicas (desnitrificación), crecimiento de las bacterias autótrofas, lisis de las heterótrofas, lisis de las autótrofas, amonificación del nitrógeno orgánico soluble, hidrólisis de la materia orgánica suspendida y hidrólisis del nitrógeno orgánico suspendido.

Posteriormente, el modelo ASM1 fue revisado y actualizado con la finalidad de corregir los defectos y limitaciones de este. La nueva versión de este modelo se denominó *Activated Sludge Model N° 3* (ASM3, Gujer *et al.*, 1999). Una de las características más destacadas de este nuevo modelo es que el proceso de degradación de la materia orgánica soluble esta dividido en dos etapas: una primera en que la materia orgánica soluble es almacenada en el interior de la bacteria, y una segunda, en la cual ésta es asimilada por el organismo. Además el nitrógeno orgánico no es considerado como un elemento independiente sino que forma parte de la materia orgánica, de manera que, los procesos de hidrólisis del nitrógeno

orgánico suspendido y la amonificación quedan implícitos en los procesos de hidrólisis de la materia orgánica suspendida y degradación de la materia orgánica soluble, respectivamente. Otra novedad importante de este modelo consiste en considerar que las bacterias tienen una velocidad de lisis en condiciones anóxicas menor que en condiciones aerobias. Por el contrario el ASM3 no considera el crecimiento de las bacterias heterótrofas directamente a partir del sustrato y tampoco tiene en cuenta los procesos de eliminación biológica de fósforo.

El primer modelo que consideró los procesos de eliminación de fósforo fue publicado en 1988 por el grupo de investigación de la Universidad de Cape Town. Su trabajo fue resumido en diversos artículos científicos (Wentzel *et al.*, 1988, 1989a, 1989b, 1990). Posteriormente el grupo de trabajo en modelación matemática de la IWA se encargó del desarrollo de un modelo de consenso para la simulación de los procesos de fangos activados con eliminación biológica de materia orgánica, nitrógeno y fósforo. Así, en el año 1995 se publicó el modelo *Activated Sludge Model Nº 2* (ASM2, Henze *et al.*, 1995).

El modelo ASM2 incluye un tercer grupo de bacterias (PAO) encargadas de la eliminación biológica de fósforo, incluyendo los siguientes procesos de: almacenamiento de PHA (polihidroxialcanoatos), almacenamiento de PP (polifosfatos) en condiciones aerobias, crecimiento en condiciones aerobias, lisis de las bacterias PAO, ruptura del PHA asociada a la lisis y ruptura de PP asociada a la lisis. En este modelo la hidrólisis de fósforo orgánico y posterior transformación a ortofosfato fue incluida de manera implícita, igual que para el caso del nitrógeno, en los procesos de hidrólisis de la materia orgánica particulada y la degradación de la materia orgánica soluble, respectivamente. De esta manera, la estequiometría de estos procesos es la que determina la cantidad de fosfato y amonio liberados al medio después de los procesos de hidrólisis y degradación de la materia orgánica. El ASM2 va a incorporar también los procesos de hidrólisis y fermentación en condiciones anaerobias, necesarios para poder simular la generación de ácidos volátiles a partir de la degradación anaerobia de la materia orgánica fermentable. Se tiene en cuenta también en el modelo los procesos de precipitación y redisolución, que permiten simular la eliminación química de fosforo por precipitación con sales de hierro y aluminio.

Sin embargo, el ASM2 no consideraba la capacidad desnitrificante por parte de las bacterias PAO que fue ratificado por diversos autores con posterioridad a su publicación e incorporado en diversos modelos alternativos al modelo de la IWA (Baker y Dold, 1997; Maurer y Gujer, 1998). Para tener en cuenta este hecho, la IWA publicó una extensión del modelo ASM2 con el nombre de *Activated Sludge Model Nº 2d* (ASM2d, Henze *et al.*, 1999),

que incorpora los procesos de almacenamiento del PP y crecimiento de las bacterias PAO en condiciones anóxicas. El ASM2d es el modelo más ampliamente aceptado por la comunidad científica para representar los procesos de eliminación biológica de materia orgánica, nitrógeno y fósforo.

Paralelamente a los trabajos desarrollados por la IWA, existen otros grupos de investigación que han desarrollado otros modelos para los procesos de fangos activados. Destacar los modelos propuestos por el grupo de investigación de la Universidad de Delft y el grupo de investigación de la EAWAG (*Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology*, siglas en alemán). El grupo de la Universidad de Delft propuso un modelo con un enfoque diferente al de la IWA. Este modelo está basado en los mecanismos bioenergéticos y en la estequiometría de los procesos metabólicos de los microorganismos (Smolders *et al.*, 1994<sup>a</sup>, 1994<sup>b</sup>, 1995). Por otro lado, el grupo de investigación de la EAWAG incluyó en su modelo los procesos de precipitación del fósforo inducido biológicamente por las bacterias PAO (Maurer *et al.*, 1999). Considera la precipitación reversible del fosfato en forma de dihidroxifosfato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{HPO}_4(\text{OH})_2$ ) seguida de una precipitación irreversible de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ).

#### **1.4.2.2 Modelos matemáticos para el proceso de digestión anaerobia.**

El proceso de digestión anaerobia constituye uno de los métodos más utilizados para el tratamiento de residuos orgánicos, existiendo en la bibliografía una amplia variedad de modelos matemáticos desarrollados para describir el comportamiento de dicho proceso. A continuación se describen los principales modelos matemáticos utilizados por la comunidad científica en los últimos años.

##### **Modelo propuesto por von Münch (1999).**

En 1999 Münch *et al.*, desarrollaron un modelo matemático para representar la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) en prefermentadores utilizando el menor número de variables posibles. El modelo está basado en el modelo desarrollado por Negri *et al.* (1993). Describe los efectos de los principales parámetros de diseño y operación sobre la velocidad de producción de AGV, como son el tiempo de retención hidráulico (TRH), tiempo de retención celular (TRC) y tipo de alimentación. Las principales características del modelo se pueden resumir en los siguientes puntos:

- ✓ El sustrato se divide únicamente en soluble e insoluble. No se consideran los sustratos inertes.
- ✓ Asume que la etapa limitante en la formación de especies monoméricas es la hidrólisis.
- ✓ No realiza ninguna distinción entre los diferentes tipos de AGV formados, considerando que su composición permanece constante en todo momento.
- ✓ No considera los procesos de acetogénesis ni la formación de metano a partir de hidrógeno. Todos los ácidos grasos de cadena corta, sin distinción, son los únicos precursores del metano.
- ✓ El modelo no considera los efectos de la temperatura, de la intensidad de agitación, de las inhibiciones químicas ni de la presencia de oxígeno en la producción de AGV.

### ***Modelo propuesto por Costello (1991).***

En 1991 D. J. Costello *et al.* propusieron un modelo matemático para sistemas de tratamiento anaerobio basado en el modelo desarrollado por Mosey (1983) para la formación de ácidos volátiles de cadena corta a partir de glucosa en el proceso de digestión anaerobia; la principal modificación que hicieron a este modelo consistió en añadir al ecosistema anaerobio un grupo de bacterias que degradaban el ácido láctico.

El modelo de Costello utiliza la glucosa como sustrato estándar para el desarrollo de las relaciones estequiométricas de cada una de las reacciones llevadas a cabo por los distintos grupos de bacterias anaerobias en la degradación secuencial de la glucosa a metano, dióxido de carbono e hidrógeno. El modelo considera 6 grupos distintos de bacterias: bacterias acidogénicas que degradan glucosa soluble, generando ácido acético, ácido butírico o ácido láctico, bacterias que degradan el ácido láctico producido por las bacterias anteriores generando ácido acético o ácido propiónico, bacterias acetogénicas que degradan el ácido butírico producido por las bacterias acidogénicas generando ácido acético, bacterias acetogénicas que degradan el ácido propiónico producido por las bacterias formadoras de ácidos, generando ácido acético, bacterias acetoclásticas que producen metano y dióxido de carbono a partir del ácido acético y bacterias hidrogenotróficas, que reducen el dióxido de carbono consumiendo hidrógeno para producir metano.

Este modelo considera el equilibrio químico de los diferentes ácidos grasos generados y del carbonato para el cálculo del pH. El crecimiento de los microorganismos siguen el modelo de Monod, con la inclusión de diversas funciones switch de inhibición por pH, por hidrógeno y por ácidos grasos volátiles. La inhibición por producto de reacción es únicamente debida al

ácido acético, ya que considera que la inhibición causada por el resto de ácidos volátiles es despreciable.

El modelo incluye el ácido láctico como producto de la degradación de la glucosa siguiendo la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas. En cambio, el propiónico se obtiene por la degradación de ácido láctico, el cual es degradado a ácido acético o propiónico en función de la presión parcial de H<sub>2</sub>. Por tanto, el modelo también considera el papel del hidrógeno como un regulador de la proporción de cada ácido formado.

### ***Modelo propuesto por Siegrist (2002).***

El modelo matemático de digestión anaerobia que desarrollaron Siegrist *et al.* (2002), describe el comportamiento dinámico para la digestión mesofílica (35 ± 5 °C) y termofílica (55 ± 5 °C). Es una versión extendida y mejorada del desarrollado en 1993 que comprendía únicamente la digestión anaerobia mesofílica.

El planteamiento del modelo es similar al de los modelos para fangos activados de la IWA ya que representa los procesos físicos, químicos y biológicos mediante una matriz estequiométrica. Está basado en el esquema de reacciones descrito por Gújer y Zehnder en 1983 (Figura 15). El modelo presta especial atención a la desabsorción de gas, la degradación de acetato y propionato, la hidrólisis de DQO degradable particulada, y a la inhibición debida al pH, amoníaco, hidrógeno y acetato.

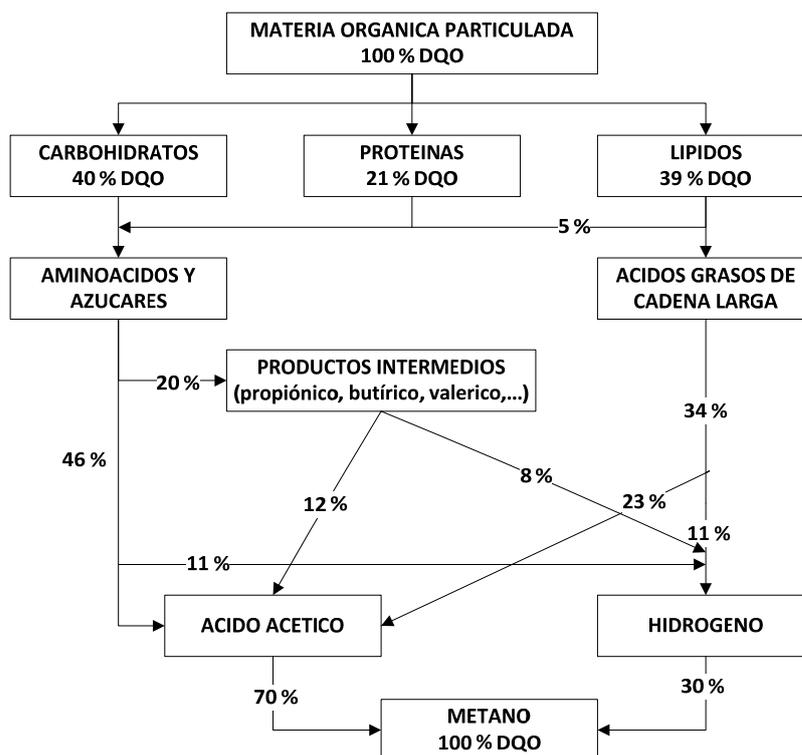


Figura 15. Esquema de reacciones propuesto para la digestión anaerobia del fango (Gujer y Zehnder, 1983).

El modelo considera los siguientes procesos: desabsorción del gas formado, hidrólisis del sustrato orgánico particulado por la acción de enzimas y transformación en aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga, fermentación de aminoácidos y azúcares, oxidación anaerobia de los ácidos grasos de cadena larga, oxidación anaerobia de productos intermedios (sólo incluye ácido propiónico), metanogénesis acetotrófica y metanogénesis hidrogenotrófica.

Las bacterias que participan en los procesos anteriores al morir producen materia orgánica particulada biodegradable e inerte. El modelo incluye procesos de muerte de los distintos grupos de bacterias y 4 procesos químicos adicionales para describir el equilibrio ácido-base de  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ , ácido acético/acetato, y ácido propiónico/propionato, necesarios para el cálculo del pH.

### **Anaerobic Digestion Model N° 1 (ADM1) (2001).**

Dada la aceptación de los modelos de fangos activados publicados por el grupo de trabajo de la IWA, y ante la diversidad de los modelos existentes para representar el proceso de digestión anaerobia, en 1998 se formó un grupo de trabajo de especialistas en digestión anaerobia con el objetivo de desarrollar un modelo que recogiera los principales trabajos y aportaciones de los especialistas de este campo. Así en septiembre del 2001 se presentó en

el 9º Congreso sobre Digestión Anaerobia celebrado en Amberes (Bélgica) un modelo matemático para representar este proceso, que fue publicado posteriormente para dar a conocer detalladamente todas sus características (Anaerobic Digestion Model Nº 1, Batstone *et al.*, 2002).

El modelo de digestión anaerobia (ADM1) considera dos tipos principales de procesos: bioquímicos (irreversibles) y fisicoquímicos (reversibles). Los procesos biológicos, ya sean intra o extracelulares (hidrólisis), los llevan a cabo distintos grupos de microorganismos y están modelados como reacciones irreversibles. En los procesos fisicoquímicos no intervienen los microorganismos y comprenden las reacciones ácido-base y la transferencia de materia entre las fases líquida y gaseosa. Estos procesos están modelados como reacciones reversibles.

El modelo considera 7 grupos de bacterias que llevan a cabo los procesos de:

- ◇ Acidogénesis a partir de azúcares (monosacáridos).
- ◇ Acidogénesis a partir de aminoácidos.
- ◇ Acetogénesis a partir de los ácidos grasos de cadena larga.
- ◇ Acetogénesis a partir de los ácidos de 4 átomos de C (butírico y valérico).
- ◇ Acetogénesis a partir del ácido propiónico.
- ◇ Metanogénesis acetoclástica.
- ◇ Metanogénesis hidrogenotrófica.

Los procesos considerados, además de los ya mencionados son: desintegración de la materia orgánica inerte, carbohidratos, proteínas y lípidos, hidrólisis de los carbohidratos, las proteínas y los lípidos, y los procesos de muerte de los distintos grupos de bacterias consideradas.

Los procesos fisicoquímicos que se tienen en cuenta en el modelo permiten el cálculo de determinados factores de inhibición tales como el pH, la concentración de gases disueltos y la concentración de ácidos no disociados, así como la estimación del caudal de biogás obtenido y de la alcalinidad debida al carbonato. Los procesos fisicoquímicos que tienen lugar en un digestor anaerobio se pueden clasificar en tres grandes grupos: procesos que tienen lugar en la fase líquida (equilibrios de disociación ácido-base), procesos de transferencia gas-líquido (desabsorción de gases formados) y procesos de precipitación/redisolución. El modelo solo considera los dos primeros tipos, omitiendo los procesos de precipitación debido a su complejidad.

### **1.4.2.3 Integración de procesos en un solo modelo biológico general.**

El desarrollo de un modelo matemático global válido para la simulación de todos los procesos que tenga lugar en una EDAR implica, aparte de las consideraciones hidráulicas del sistema, una identificación de todas las fracciones de carbono, nitrógeno y fósforo; una definición correcta de las relaciones estequiométricas entre los diferentes componentes considerados por el modelo de cada una de las formas anteriores, y una definición adecuada de las cinéticas de los procesos en cada una de las condiciones anaerobias, anóxicas y aerobias que pueden darse en el sistema.

La representación matricial de un modelo global ha de incluir todos los componentes y procesos analizados en los apartados anteriores, realizando las modificaciones y adaptaciones necesarias para la correcta fusión de los procesos en un solo modelo, evitando duplicidades y simplificando el máximo el número de componentes y procesos necesarios.

Siguiendo estas premisas el grupo de investigación CALAGUA, integrado por investigadores de la Universidad de Valencia y la Universidad Politécnica de Valencia, ha desarrollado un modelo de aplicación general para cualquier proceso en el tratamiento de aguas residuales urbanas, denominado *Biological Nutrient Removal Model Nº 1* (BNRM1, Seco *et al.*, 2004). Las modificaciones incorporadas en el modelo propuesto por el grupo CALAGUA permiten una mejor representación del proceso de depuración del agua residual. Por esta razón, para el desarrollo de este trabajo de investigación, se partirá del modelo BNRM1 el cual se describirá en un apartado siguiente.

### **1.4.3 Biological Nutrient Removal Model No.1 (BNRM1).**

El modelo BNRM1 supone una perspectiva diferente de la modelación determinista para procesos biológicos ya que un único modelo se utiliza para simular procesos físicos, químicos y biológicos. Puede ser utilizado para el diseño y simulación de las principales operaciones de tratamiento de una EDAR, permitiendo tener en cuenta los efectos combinados de los diferentes procesos de tratamiento. De esta forma el funcionamiento global de la EDAR puede ser optimizado. Por ello este modelo es el que se encuentra actualmente implementado en el software de simulación DESASS (DESIGN and SIMULATION of Activated Systems) desarrollado también por el grupo de investigación CALAGUA.

Los procesos físicos considerados por el modelo BNRM1 son: sedimentación y clarificación (sedimentación floculada, zonal y compresión), elutriación de los ácidos grasos volátiles y

procesos de transferencia de materia entre las fases líquida y gaseosa. Los procesos químicos considerados comprenden las principales reacciones ácido-base, asumiendo condiciones de equilibrio químico local e instantáneo y los procesos de precipitación. Los procesos biológicos considerados son: eliminación de materia orgánica, nitrógeno y fósforo, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

#### **1.4.3.1 Componentes y procesos del modelo.**

##### **1.4.3.1.1 Componentes del modelo.**

El modelo considera un total de 27 componentes, 13 solubles y 14 particulados. En la Tabla 9 y la Tabla 10 se pueden ver todos los componentes del modelo.

<p><b>S<sub>A</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Ácido Acético. Debido a que la fermentación se ha incluido como un proceso biológico, los productos de la fermentación se deben modelar separadamente de los otros componentes orgánicos solubles.</p>
<p><b>S<sub>CH4</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Metano. Es el principal producto generado en los sistemas de digestión anaerobia.</p>
<p><b>S<sub>F</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Sustratos orgánicos fácilmente biodegradables, fermentables. Es la fracción de la DQO soluble que está disponible directamente para la degradación por los organismos heterótrofos. Se asume que S<sub>F</sub> puede servir como sustrato para el proceso de fermentación.</p>
<p><b>S<sub>H2</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Hidrógeno. Subproducto generado en los sistemas de digestión anaerobia, se forma en el proceso de fermentación pero en su mayoría es transformado en metano y dióxido de carbono.</p>
<p><b>S<sub>I</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Materia orgánica inerte. La principal característica de este elemento es que no puede ser degradado. Se asume que este elemento es parte del influente.</p>
<p><b>S<sub>IC</sub> (mol/L<sup>3</sup>):</b> Carbono inorgánico. Es la suma analítica de las concentraciones de carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). El ácido carbónico está en equilibrio con el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) disuelto, siendo la concentración de este último del orden de 100 veces superior a la de ácido carbónico. Por este motivo la concentración de CO<sub>2</sub> también se incluye en este componente.</p>
<p><b>S<sub>N2</sub> (M<sub>N</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Nitrógeno gaseoso, N<sub>2</sub>. Se asume que solamente es un producto de la desnitrificación.</p>
<p><b>S<sub>NH4</sub> (M<sub>N</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Amonio más N amoniacal. Para el balance de las cargas eléctricas, se asume que el S<sub>NH4</sub> es solamente NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sin embargo, en la realidad está compuesto de NH<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.</p>
<p><b>S<sub>NO3</sub> (M<sub>N</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Nitrato más nitrito (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Se asume que está compuesto por nitrato y nitrito, debido a que el nitrito no está incluido como un componente del modelo.</p>
<p><b>S<sub>O2</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Oxígeno disuelto.</p>
<p><b>S<sub>PO4</sub> (M<sub>P</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Fósforo soluble inorgánico, principalmente ortofosfatos.</p>
<p><b>S<sub>PRO</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Ácidos grasos de cadena corta, excepto el ácido acético. Para los cálculos estequiométricos se asume que S<sub>PRO</sub> equivale al ácido propiónico porque es el ácido que suele presentar mayor concentración después de acético.</p>
<p><b>S<sub>H</sub> (M<sub>H</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Protón. Representa la concentración total de protones en disolución, siendo la suma analítica de las concentraciones de protones libres en disolución (H<sup>+</sup>), y protones combinados formando parte de otras especies (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>....).</p>

Tabla 9. Componentes solubles del modelo BNRM1.

<b>X<sub>ACET</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Bacterias acetogénicas. Son los organismos responsables de la transformación de los ácidos grasos volátiles que no pueden ser transformados en metano en ácido acético.
<b>X<sub>ACID</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Bacterias acidogénicas. Son los organismos responsables de la generación de ácidos grasos volátiles por fermentación y de la hidrólisis de la materia orgánica particulada en condiciones anaerobias.
<b>X<sub>AUT</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Organismos nitrificantes autótrofos. Son los responsables de la nitrificación. Se asume que estos organismos incluyen tanto las bacterias amonioxidantes como las nitritoxidantes.
<b>X<sub>H</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Organismos heterótrofos. Se asume que estos organismos pueden crecer en condiciones aerobias y anóxicas. Responsables de los procesos de hidrólisis de los sustratos particulados y pueden usar todos los sustratos solubles orgánicos degradables (S <sub>A</sub> y S <sub>F</sub> ).
<b>X<sub>I</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Material orgánico inerte. Este material no se puede degradar. X <sub>I</sub> puede ser una fracción del influente o puede producirse dentro del proceso de lisis (muerte celular).
<b>X<sub>MAC</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Bacterias metanogénicas acetoclásticas. Estos organismos son anaerobios estrictos y son los responsables de la conversión del ácido acético en metano.
<b>X<sub>MH2</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas. Estos organismos son anaerobios estrictos y son los responsables de la conversión del hidrógeno en metano.
<b>X<sub>NV</sub> (M<sub>SST</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Sólidos suspendidos no volátiles. Este componente no participa en los procesos biológicos, únicamente se concentra por sedimentación.
<b>X<sub>PAO</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Organismos acumuladores de polifosfatos (PAOs). Se asume que representan a todos los organismos acumuladores de polifosfatos. La concentración de X <sub>PAO</sub> no incluye los productos que se almacenan intracelularmente (X <sub>PP</sub> y X <sub>PHA</sub> ).
<b>X<sub>PHA</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> es un producto almacenado intracelularmente en las bacterias PAO. Éste incluye polihidroxialcanoatos (PHA), glucógeno, etc. Se suele asociar con X <sub>PAO</sub> , sin embargo, no está incluido en la masa de estas bacterias. Se asume que tiene la composición química de polihidroxibutirato, (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> .
<b>X<sub>PP</sub> (M<sub>P</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Polifosfato. El polifosfato es un producto almacenado intracelularmente en las PAO. Se presenta solamente asociado con X <sub>PAO</sub> , sin embargo, no está incluido en la masa de X <sub>PAO</sub> . Forma parte del fósforo particulado. Se asume que tiene la composición química (K <sub>0.33</sub> Mg <sub>0.33</sub> PO <sub>3</sub> ) <sub>n</sub> .
<b>X<sub>S</sub> (M<sub>DQO</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Sustrato lentamente biodegradable. Es un sustrato orgánico particulado y coloidal de alto peso molecular que necesita ser hidrolizado antes de estar disponible para la degradación. Se asume que los productos de la hidrólisis (S <sub>F</sub> ) se pueden fermentar.
<b>X<sub>MEOH</sub> (M<sub>SST</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Hidróxidos metálicos. Este componente se añade al sistema para llevar a cabo el proceso de precipitación química del fósforo. Se asume que este componente está compuesto de Fe(OH) <sub>3</sub> . Es posible reemplazar este componente por otros reactivos.
<b>X<sub>MEP</sub> (M<sub>SST</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Fosfatos metálicos. Este componente resulta de la precipitación química del fósforo. Se asume que está compuesto de FePO <sub>4</sub> .
<b>X<sub>SST</sub> (M<sub>SST</sub>/L<sup>3</sup>):</b> Sólidos suspendidos totales, SST. No son un componente del modelo pero se calcula su concentración a partir de los correspondientes factores estequiométricos.

Tabla 10. Componentes particulados del modelo BNRM1.

**1.4.3.1.2 Procesos cinéticos.**

El modelo BNRM1 se compone de un total de 37 procesos cinéticos, entre procesos biológicos y físicos. En la Tabla 11 se enumeran dichos procesos.

<i>j</i>	Proceso	<i>j</i>	Proceso
<b>BACTERIAS HETERÓTROFAS</b>		<b>BACTERIAS AUTÓTROFAS</b>	
1	Hidrólisis aerobia	20	Crecimiento aerobio de $X_{AUT}$
2	Hidrólisis anóxica	21	Lisis de $X_{AUT}$
3	Hidrólisis anaerobia	<b>BACTERIAS ACIDOGÉNICAS</b>	
4	Crecimiento aerobio a partir de $S_F$	22	Hidrólisis anaerobia
5	Crecimiento aerobio a partir de $S_A$	23	Crecimiento de $X_{ACID}$
6	Crecimiento aerobio a partir de $S_{PRO}$	24	Lisis de $X_{ACID}$
7	Crecimiento anóxico a partir de $S_F$	<b>BACTERIAS ACETOGÉNICAS</b>	
8	Crecimiento anóxico a partir de $S_A$	25	Crecimiento de $X_{ACET}$
9	Crecimiento anóxico a partir de $S_{PRO}$	26	Lisis de $X_{ACET}$
10	Lisis de $X_H$	<b>BACTERIAS METANOGÉNICAS</b>	
<b>BACTERIAS PAO</b>		27	Crecimiento de $X_{MAC}$
11	Almacenamiento de $X_{PHA}$ a partir de $S_A$	28	Lisis de $X_{MAC}$
12	Almacenamiento de $X_{PHA}$ a partir de $S_{PRO}$	29	Crecimiento de $X_{MH2}$
13	Almacenamiento aerobio de $X_{PP}$	30	Lisis de $X_{MH2}$
14	Crecimiento aerobio a partir de $X_{PHA}$	<b>FISICOQUÍMICOS</b>	
15	Almacenamiento anóxico de $X_{PP}$	31	Precipitación
16	Crecimiento anóxico a partir de $X_{PHA}$	32	Redisolución
17	Lisis de $X_{PAO}$	33	Desabsorción de $O_2$
18	Lisis de $X_{PP}$	34	Desabsorción de $H_2$
19	Lisis de $X_{PHA}$	35	Desabsorción de $CH_4$
		36	Desabsorción de $CO_2$
		37	Desabsorción de $N_2$

Tabla 11. Procesos cinéticos considerados en el modelo.

**1.4.3.1.3 Procesos de equilibrio ácido-base. Cálculo del pH.**

El modelo BNRM1 incluye como procesos gobernados por el equilibrio las interacciones ácido-base en las que participan los componentes considerados. Serralta *et al.* (2004) desarrollaron un algoritmo para el cálculo del pH aplicado a los procesos biológicos de EDARs. Este algoritmo se incorporó al modelo BNRM1 (Seco *et al.*, 2004).

Para el desarrollo del modelo se ha asumido un equilibrio químico instantáneo para estos sistemas ácido-base. Esta asunción simplifica el cálculo de las concentraciones de las especies presentes porque los procesos gobernados por el equilibrio se pueden describir mediante un conjunto de ecuaciones algebraicas no lineales. Estas ecuaciones incluyen una expresión de la ley de acción de masas para cada una de las especies formadas en cada uno de los equilibrios y un balance de materia para cada uno de los componentes.

Ley de acción de masa:

$$K_i = \{S_i\} \cdot \prod_{j=1}^n X_j^{-a_{ij}} \quad \text{Ec.- 44}$$

Balance de materia:

$$T_j = \sum_{i=1}^n a_{ij} \cdot [S_i] \quad \text{Ec.- 45}$$

Donde:

$\{S_i\}$  = actividad de la especie i.

$K_i$  = constante de equilibrio para la formación de la especie i.

$X_j$  = actividad del componente j.

$a_{ij}$  = coeficiente estequiométrico del componente j en la especie i.

$T_j$  = concentración total del componente j.

La actividad de cada uno de los componentes está relacionada con su concentración a través del coeficiente de actividad  $\gamma_i$ , tal y como muestra la siguiente ecuación:

$$\{S_i\} = \gamma_i \cdot C_i \quad \text{Ec.- 46}$$

A partir de la aplicación de estas expresiones a los distintos componentes y especies considerados en el modelo, se obtiene el conjunto de ecuaciones que se muestran en la Tabla 12.

$$\begin{aligned}
 \{H^+\} \cdot \{OH^-\} &= 10^{-13.998} \\
 \frac{\{HPO_4^{2-}\}}{\{H^+\} \cdot \{PO_4^{-3}\}} &= 10^{12.34} \\
 \frac{\{H_2PO_4^-\}}{\{H^+\}^2 \cdot \{PO_4^{-3}\}} &= 10^{19.533} \\
 \frac{\{H_3PO_4\}}{\{H^+\}^3 \cdot \{PO_4^{-3}\}} &= 10^{21.7} \\
 \frac{\{H^+\} \cdot \{NH_3\}}{\{NH_4^+\}} &= 10^{-9.252} \\
 \frac{\{CH_3COOH\}}{\{H^+\} \cdot \{CH_3COO^-\}} &= 10^{4.76} \\
 \frac{\{CH_3CH_2COOH\}}{\{H^+\} \cdot \{CH_3CH_2COO^-\}} &= 10^{4.874} \\
 \frac{\{HCO_3^-\}}{\{H^+\} \cdot \{CO_3^{-2}\}} &= 10^{10.33} \\
 \frac{\{H_2CO_3\}}{\{H^+\}^2 \cdot \{CO_3^{-2}\}} &= 10^{16.681} \\
 [H^+] + [HPO_4^{2-}] + 2 \cdot [H_2PO_4^-] + 3 \cdot [H_3PO_4] + [HCO_3^-] + 2 \cdot [H_2CO_3^-] \\
 + [CH_3COOH] + [CH_3CH_2COOH] - [OH^-] - [NH_3] &= H_T \\
 [PO_4^{3-}] + [HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] + [H_3PO_4] &= P_T \\
 [NH_4^+] + [NH_3] &= NH_T \\
 [CO_3^{-2}] + [HCO_3^-] + [H_2CO_3^-] &= C_T \\
 [CH_3COO^-] + [CH_3COOH] &= Ac_T \\
 [CH_3CH_2COO^-] + [CH_3CH_2COOH] &= Pr_T
 \end{aligned}$$

**Tabla 12.** Ecuaciones del modelo para los procesos de disociación. {i} actividad de la especie i, [i] concentración de la especie i, Z<sub>T</sub> concentración total del componente Z.

La resolución de estas ecuaciones algebraicas se efectúa mediante la aplicación del programa MINTQA2, (Allison *et al.*, 1991). Se trata de un programa de libre distribución, desarrollado por la U.S.E.P.A (United States Environmental Protection Agency) (Allison *et al.*, 1991), que permite calcular las concentraciones de todas las especies presentes en el equilibrio en sistemas acuosos. Los datos que necesita el programa para calcular la composición en el equilibrio consisten en la determinación de las concentraciones totales de todos los componentes y otras medidas relevantes tales como la temperatura, pH...

El procedimiento de resolución de las ecuaciones implica una iteración secuencial entre las ecuaciones diferenciales de los modelos biológicos y las ecuaciones algebraicas del modelo químico. La resolución de las ecuaciones diferenciales proporciona la evolución de las concentraciones totales de los distintos componentes en función del tiempo, mientras que la resolución de las ecuaciones algebraicas del modelo químico proporciona la evolución de las concentraciones de las distintas especies en función del tiempo. La Figura 16 muestra de forma esquemática el procedimiento de cálculo para los estados estacionario y transitorio.

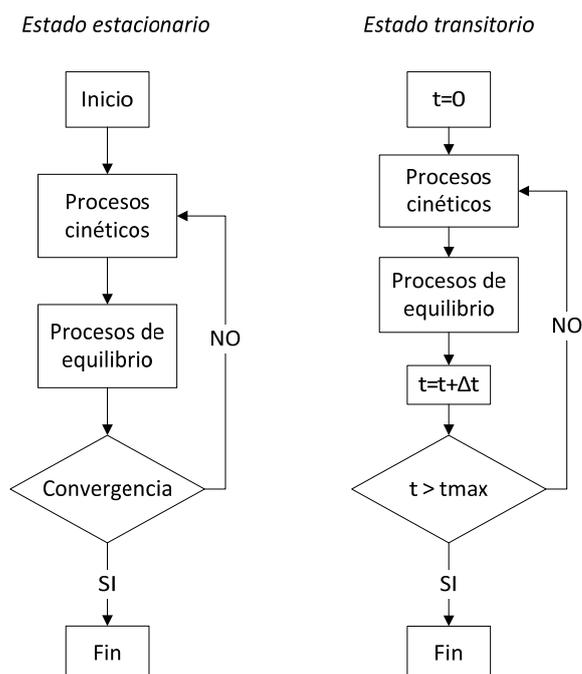


Figura 16. Esquema del proceso de resolución de las ecuaciones en estado estacionario y transitorio.

### 1.4.3.2 Ecuaciones de continuidad.

La estequiometría del modelo BNRM1 se basa en 6 ecuaciones de continuidad aplicadas a la DQO, nitrógeno, fósforo, sólidos suspendidos totales, carbono y protones. Estas ecuaciones de continuidad permiten la estimación de un coeficiente estequiométrico conocidos los restantes. Estas ecuaciones se utilizan para calcular los coeficientes estequiométricos de  $S_{O_2}$  ( $S_{NO_3}$  y  $S_{N_2}$  en la desnitrificación) a partir de la DQO,  $S_{NH_4}$  a partir del nitrógeno,  $S_{PO_4}$  a partir del fósforo,  $X_{SST}$  a partir de los sólidos suspendidos totales,  $S_{IC}$  a partir del carbono, y  $S_H$  a partir de los protones. Los factores de conversión necesarios para aplicar las ecuaciones de continuidad se muestran en la Tabla 13.

Ec. Continuidad para →		DQO	Nitrógeno	Fósforo	Sólidos	Carbono	Protón
Factor →		$i_{DQO,i}$	$i_{N,i}$	$i_{P,i}$	$i_{SST,i}$	$i_{C,i}$	$i_{H,i}$
Componente ↓	Unidad	g DQO	g N	g P	g SST	mol C	mol H
$S_{O_2}$	g $O_2$	-1					
$S_{NH_4}$	g N		1				-1/14
$S_{NO_3}$	g N	-64/14	1				1/14
$S_{N_2}$	g N		1				
$S_F$	g DQO	1	$i_{NSF}$	$i_{PSF}$		$i_{CSF}$	
$S_A$	g DQO	1				2/64	1/64
$S_{PRO}$	g DQO	1				3/112	1/112
$S_{PO_4}$	g P			1			2/31
$S_I$	g DQO	1	$i_{NSI}$	$i_{PSI}$		$i_{CSI}$	
$S_H$	mol H						-1
$S_{H_2}$	g DQO	1					
$S_{CH_4}$	g DQO	1				1/64	
$S_{IC}$	mol C					1	2
$X_S$	g DQO	1	$i_{NXS}$	$i_{PXS}$	$i_{SSTXS}$	$i_{CXS}$	
$X_I$	g DQO	1	$i_{NXI}$	$i_{PXI}$	$i_{SSTXI}$	$i_{CXI}$	
$X_{BM}$ (biomasa)	g DQO	1	$i_{NBM}$	$i_{PBM}$	$i_{SSTBM}$	$i_{CBM}$	
$X_{PP}$	g P			1	3.23		
$X_{PHA}$	g DQO	1			0.6	1/36	
$X_{SST}$	g SST				-1		
$X_{MeOH}$	g SST				1		
$X_{MeP}$	g SST			0.205	1		
$X_{NV}$	g SST				1		

Tabla 13. Factores de conversión  $i_{c,i}$  aplicados en las ecuaciones de continuidad del modelo.

Los factores de conversión de las ecuaciones de continuidad deben ser definidos previamente para poder aplicar las ecuaciones. Estos factores indican el contenido de cada uno de los componentes en cada uno de los materiales para los cuales se aplica la ecuación de continuidad. Mientras que los factores de conversión de la materia orgánica suspendida inerte ( $X_I$ ) y lentamente biodegradable ( $X_S$ ) dependen de las características del influente empleado en cada caso, los valores referidos a los distintos grupos de bacterias se han calculado asumiendo que toda la biomasa tiene la misma composición química  $C_5H_7NO_2P_{0.09}$  (Tabla 14).

Factor de conversión	Valor	Unidad
$i_{NBM}$	0.087	g N/g DQO
$i_{PBM}$	0.017	g P/g DQO
$i_{SSTBM}$	0.700	g SST/g DQO
$i_{CBM}$	0.031	mol C/g DQO

Tabla 14. Valores de los factores de conversión para la biomasa obtenidos considerando la composición de las biomasa como  $C_5H_7NO_2P_{0.09}$ .

Las principales ventajas que presenta el modelo BNRM1 son:

- ✓ Las interrelaciones entre las diferentes unidades del proceso pueden ser tenidas en cuenta con una única herramienta de simulación.
- ✓ Considera los efectos de las recirculaciones desde la línea de fangos a la corriente principal. Permite optimizar el funcionamiento global de la planta.
- ✓ Considera los tres tipos de bacterias: aerobias, facultativas y anaerobias. Las condiciones ambientales en cada unidad de tratamiento determinan qué grupos pueden proliferar.
- ✓ Las conversiones artificiales de biomasa a materia orgánica biodegradable no son necesarias para enlazar los procesos de tratamiento del agua con los de fango.

## **1.5 Modelación del proceso de nitrificación.**

### **1.5.1 Modelos de nitrificación en una etapa versus nitrificación en dos etapas.**

El proceso de nitrificación ha sido tradicionalmente modelado como un proceso de una única etapa (Henze *et al.*, 2000). Esta suposición era válida ya que raramente existía acumulación de nitrito en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, el reciente desarrollo de nuevos procesos y tecnologías en los que es importante la separación entre procesos (oxidación de amonio y oxidación de nitrito) han hecho necesaria la inclusión de la ruta metabólica completa en los modelos biológicos de estos sistemas. Además hay situaciones específicas en las que el nitrito tiene un papel muy importante, como por ejemplo: operación inestable de una planta de tratamiento de aguas residuales (falta de oxígeno,  $T^{\circ}$  baja, bajo TRC, presencia de inhibidores), procesos en el tratamiento del sobrenadante procedente de la línea de fangos, plantas de tratamiento de aguas residuales industriales,... En estos sistemas el modelo de una única etapa no es adecuado y como consecuencia es necesario incluir el nitrito en el modelo de estos sistemas.

La inclusión del nitrito en los modelos del tratamiento de aguas residuales supone la modificación de los modelos tradicionales tanto de nitrificación como desnitrificación. Pero además de los procesos de nitrificación y desnitrificación, la inclusión del nitrito como un nuevo componente tendrá consecuencias para la descripción de otros procesos del sistema de tratamiento de aguas residuales, como la absorción de fósforo, la respiración endógena, la hidrólisis y los procesos de almacenamiento (ya que el  $\text{HNO}_2$  es un agente inhibidor de casi todos los procesos).

Hay numerosos grupos de investigación que trabajan en este campo, con el objetivo de desarrollar un modelo adecuado, con inclusión de nitrito, para reproducir los resultados observados en los procesos de tratamiento de las aguas residuales y sobrenadantes de la digestión de fangos.

### 1.5.2 Revisión de los principales modelos de nitrificación vía nitrito.

Hoy en día hay varios modelos biológicos diferentes en los que se describe por separado las dos etapas del proceso de nitrificación. Un resumen de dichos modelos puede encontrarse en Sin *et al.*, 2008. Algunos de estos modelos se centran en los procesos que tienen lugar en el tratamiento de aguas residuales con una alta carga de nitrógeno, como el sobrenadante de la línea de fangos digeridos anaerobiamente (Hellings *et al.*, 1999; Volcke, 2006; Wett y Rauch, 2003; entre otros). Por otro lado, hay modelos que son más convenientes para los procesos de los sistemas de fangos activados (como Sin y Vanrolleghem, 2006; Kaelin *et al.*, 2009) (Ver Tabla 15).

Referencia	Modelo de procesos en ...
Hellings <i>et al.</i> , 1999	
Volcke <i>et al.</i> , 2006	
Van Hulle <i>et al.</i> , 2007	Corrientes de recirculación de sobrenadante de la línea de fangos
Wett y Rauch 2003	
Pambrun <i>et al.</i> , 2006	
Jones <i>et al.</i> , 2007	
Kaelin <i>et al.</i> , 2009	
Sin y Vanrolleghem, 2006	Corriente principal de planta
Sin <i>et al.</i> , 2008	
Hao <i>et al.</i> , 2002	
Moussa <i>et al.</i> , 2005	Ambas
Kampschreur <i>et al.</i> , 2007	

**Tabla 15. Principales modelos de nitrificación vía nitrito y agua residual en la que se han desarrollado.**

Además de los modelos desarrollados en el tratamiento de aguas residuales existen modelos como el RWQM1 (River Water Quality Model Nº 1) propuesto para el modelado de procesos en ríos (Reichert *et al.*, 2001). Este modelo fue descrito por la IWA en 2001 e incorpora el proceso de nitrificación en dos etapas (nitritación, nitratación y equilibrios químicos). Este modelo supuso un gran paso en el campo de la modelación por incorporar balances de masa, equilibrios de pH,... Otra referencia relevante a tener en cuenta es la propuesta de Grau *et al.*, 2007, que aunque no es en sí mismo un modelo, describe una metodología de modelado para plantas de depuración a partir de listas de transformaciones compatibles, donde se incluye como posibles transformaciones la nitrificación vía nitrito y los equilibrios de pH (adaptadas del RWQM1).

La revisión de los principales modelos de nitrificación en dos etapas de la Tabla 15 permite observar que existe cierta diversidad en las estructuras matemáticas de los modelos desarrollados hasta el momento. Estas diferencias se deben fundamentalmente a los supuestos realizados en cada caso y a la elección de las cinéticas de limitación por sustrato e inhibición. En la Tabla 16 se resumen las principales diferencias entre algunos de los modelos de nitrificación en dos etapas (Sin *et al.*, 2008).

	<b>Bacterias amonioxidantes</b>	<b>Bacterias nitritoxidantes</b>
<b>Sustrato</b>	<i>NH<sub>3</sub> vs NH<sub>4</sub></i> : Excepto Hellinga <i>et al.</i> (1999), Volcke, (2006) y Van Hulle <i>et al.</i> (2007), los otros modelos asumen el NH <sub>4</sub> como el sustrato para el crecimiento de las bacterias AOB. El NH <sub>3</sub> como sustrato se considera principalmente en los modelos de los procesos del tratamiento de corrientes de recirculación. La función de Monod en la más usada para describir el proceso de limitación por el sustrato.	<i>NO<sub>2</sub> vs HNO<sub>2</sub></i> : Hellinga <i>et al.</i> (1999), Volcke, (2006) y Pambrun <i>et al.</i> (2006) consideran el HNO <sub>2</sub> como sustrato en el modelo, empleando diferentes cinéticas para describir el proceso. Otros autores asumen el nitrito como sustrato y describen la función de limitación con la ecuación de Monod.
<b>Inhibición por NH<sub>3</sub></b>	La inhibición por sustrato más estudiada es la producida por amoníaco ya que, debido al pH al que se trabaja habitualmente en los sistemas de depuración biológica, es la que se puede llegar a producir. <i>Para B. Amonioxidantes.</i> Solo se considera en algunos modelos (Wett y Rauch (2003), Van Hulle <i>et al.</i> (2007), Pambrun <i>et al.</i> (2006)). Los coeficientes de inhibición en estos modelos son muy altos, por lo que esta inhibición probablemente se pueda obviar en la práctica si el efluente a tratar no tiene una elevada carga de N.	<i>Para B. Nitritoxidantes.</i> Esta inhibición fue considerada por Pambrun <i>et al.</i> (2006) y Wett y Rauch (2003) usando una función switch, mientras que no se tuvo en cuenta en el resto de modelos. Al igual que en el caso de las AOB la importancia de esta inhibición dependerá de las concentraciones a las que se trabaja.
<b>Inhibición por HNO<sub>2</sub></b>	La inhibición de la nitrificación por ácido nitroso está mucho menos estudiada, seguramente porque es difícil alcanzar concentraciones de nitrito que provoquen inhibición. Los sistemas de depuración biológica trabajan habitualmente a pH superior a 7, lo que supone que se tengan que alcanzar elevadas concentraciones de nitrito para que el equilibrio se desplace hacia la formación de ácido nitroso. La inhibición por ácido nitroso de las bacterias es un proceso que numerosos autores no contemplan, aunque no se puede descartar cuando se alcanzan elevadas concentraciones de nitrito en el sistema. <i>Para B. Amonioxidantes.</i> Solamente se consideró en los modelos desarrollados para procesos del tratamiento de corrientes de recirculación mediante una función switch (Hellinga <i>et al.</i> (1999), Pambrun <i>et al.</i> (2006), Volcke, (2006) y Van Hulle <i>et al.</i> (2007)). En los procesos de la corriente principal los niveles de nitrito no suelen ser altos.	<i>Para B. Nitritoxidantes.</i> La inclusión de este término en el modelo depende de la concentración de nitrito en el sistema que va a ser modelado. La inhibición por HNO <sub>2</sub> fue considerada por Hellinga <i>et al.</i> (1999), Pambrun <i>et al.</i> (2006) y Wett y Rauch (2003) empleando diferentes cinéticas de inhibición en cada uno (función de inhibición no competitiva, cinética de Haldane,...).
<b>Efecto del pH</b>	Los modelos de los procesos de la corriente principal ignoran el efecto del pH en las tasas de crecimiento de las bacterias, ya que en las EDARs el pH generalmente permanece constante. Sin embargo, en los procesos de las corrientes de recirculación se tiene en cuenta el efecto del pH desde 3 puntos de vista: (i) inhibición directa del pH (Van Hulle <i>et al.</i> (2007)), (ii) efecto indirecto, ya que el pH influye en los equilibrios ácido/base (Hellinga <i>et al.</i> (1999), Wett y Rauch (2003)), (iii) combinación de ambos efectos (Jones <i>et al.</i> (2007)).	

Tabla 16. Características más relevantes de los principales modelos de nitrificación vía nitrito.

Aparte de la estructura del modelo, también existe una gran variabilidad entre los valores de los parámetros determinados en cada estudio. De hecho, casi se puede decir que cada modelo tiene un conjunto de valores de parámetros diferentes. Lo importante es entender a que se pueden deber estas diferencias.

En primer lugar es necesario tener en cuenta que no en todos los estudios se midió y/o identificó todos los parámetros incluidos en el modelo. Por el contrario, en la mayoría de los estudios consultados se midieron sólo algunos parámetros, mientras que los valores para los restantes parámetros fueron asumidos de diversas fuentes de la bibliografía (principalmente de Wiesmann, 1994, pero también de otros estudios). La selección de valores de parámetros a partir de la bibliografía es muy importante como se puede observar, por ejemplo, en el amplio rango de valores de rendimientos de las bacterias recopilados ( $Y_{NH}$  y  $Y_{NO}$ ), que son en la mayoría de los modelos asumidos y no medidos. Otras posibles fuentes que pueden contribuir a esta variabilidad de valores son:

- ◇ *Características del proceso y antecedentes.* Los modelos enumerados en la Tabla 15 se desarrollaron con aguas residuales de diferentes cargas (efluentes con alta carga o efluentes mas diluidos) y diferentes configuración y operación del proceso (escala laboratorio o planta piloto; reactor batch o reactor continuo; alta  $T^a$  o baja  $T^a$ ,...). La cinética del proceso de absorción del sustrato es en cierto modo una expresión de los antecedentes del proceso y la concentración media de sustrato con que es operado. Como estos factores afectan a la fisiología de las bacterias y su grado de adaptación, la medida de los coeficientes de afinidad e inhibición puede variar.
- ◇ *Técnica experimental.* Algunos de los valores de estos parámetros son estimados a partir de los datos recopilados en experimentos en laboratorio, mientras que otros parámetros se obtienen a partir de la calibración del modelo en planta piloto o plantas reales. Como estas técnicas no están estandarizadas, la forma en que se estima/mide el valor de los parámetros puede también contribuir a la variabilidad observada en estos valores.
- ◇ *Difusión del sustrato.* La disponibilidad de sustrato para las bacterias depende de la difusión, tamaño del flóculo, mezcla e hidráulica. Puesto que estos factores varían de un estudio a otro, esto afectará a los valores estimados de los parámetros.
- ◇ *Adaptación.* La adaptación de la biomasa puede incrementar la afinidad por el sustrato llevando a determinarse constantes de afinidad más bajas (es decir, la afinidad del sustrato depende de la concentración de este en el reactor). La tasa máxima de crecimiento de las bacterias probablemente depende del las condiciones de crecimiento y de los antecedentes del fango.
- ◇ *Estructura del modelo.* Los parámetros están relacionados con la estructura del modelo. Esto significa que el valor de un parámetro está condicionado por el otro. Este aspecto es particularmente importante con respecto a la propagación de errores. En otras palabras, una suposición errónea de un valor (por ejemplo, el rendimiento celular) podría compensarse con valores apropiados de otros

parámetros (por ejemplo la tasa de crecimiento o constante de afinidad). Esto se conoce como el problema de identificabilidad, es decir, un modelo puede reproducir una dinámica similar con diferentes combinaciones de valores de parámetros, y todo esto conduce al fenómeno de variabilidad de parámetros.

De acuerdo a la bibliografía consultada, es importante destacar que, independiente de sus características y funciones, cualquier modelo debería ser adaptado, calibrado y validado para un uso específico. Además, también parece claro que los procesos de nitrificación parcial empleados en el tratamiento de los sobrenadantes de la digestión de fangos de la planta podrían requerir rangos de valores de parámetros diferentes a los que se emplean habitualmente en las líneas principales de tratamiento de aguas residuales (Sin *et al.*, 2008).

En resumen, aunque existen varios modelos en los que se incluye el nitrito como componente de los diferentes procesos, aun no hay un único modelo con inclusión de este componente, apropiado para tratar las cuestiones mencionadas y proporcionar un rango de valores de parámetros fiable para simular adecuadamente las transformaciones del nitrito en los sistemas de fangos activos.

### **1.6 Calibración de modelos de tratamiento de aguas residuales.**

El proceso de calibración proporciona los valores de los parámetros que intervienen en el proceso biológico y que servirán para que los resultados del modelo matemático se ajusten a la realidad. La determinación de dichos parámetros se obtiene mediante la optimización de una función objetivo empleando algoritmos matemáticos específicos. En general, la función objetivo propuesta es la minimización de la suma del cuadrado del error, el cual viene dado por la diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo.

La calibración de cualquier modelo garantiza su aplicabilidad, lo cual lleva implícito tres cualidades del modelo, importantes y necesarias para su posterior uso:

- ✓ *Confianza.* Hay que demostrar que el modelo tiene capacidad de reproducir condiciones existentes y fiabilidad para resolver situaciones futuras.
- ✓ *Conocimiento y comprensión.* La determinación de los valores de los parámetros del modelo mediante la calibración convierte el modelo en una herramienta para conocer el comportamiento del proceso biológico en su totalidad, explicando cambios que ocurren en su comportamiento en base a variaciones de las condiciones de operación.

- ✓ *Resolución de problemas.* El disponer de un modelo adecuadamente calibrado puede permitir la reconstrucción de información perdida o el establecimiento de alarmas ante comportamientos anómalos o información errónea del sistema.

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes metodologías para la calibración de los parámetros del modelo. A continuación se describen las metodologías y protocolos de calibración más destacados aplicables a los modelos que representan el tratamiento biológico del agua residual.

### **1.6.1 Metodologías de calibración.**

Los procedimientos de calibración que se describen a continuación emplean métodos de optimización para la estimación de los parámetros del modelo matemático, basándose en la minimización del error cuadrático medio entre los datos simulados y experimentales. No obstante, pueden surgir problemas de identificabilidad de los parámetros asociados a la calidad de los datos experimentales y la complejidad del modelo biológico.

#### **1.6.1.1 Calibración en estado estacionario.**

Este procedimiento consiste en emplear datos promedios del comportamiento de la EDAR, considerando que estos datos medios representan el estado estacionario de la planta. Esta clase de metodología de calibración asocia todos los parámetros del modelo a un comportamiento estable de la planta.

Generalmente con una calibración del modelo en estado estacionario, solamente pueden ser determinados los parámetros responsables del comportamiento a largo plazo de la EDAR (Nowak *et al.*, 1999). Estos parámetros están correlacionados en cierto grado, lo cual significa que la modificación del valor de un parámetro se puede compensar por una modificación en el valor de otro coeficiente.

El procedimiento de calibración en estado estacionario permite la determinación experimental de parámetros que caracterizan el comportamiento de la EDAR en largos períodos de tiempo. Fundamentalmente, este procedimiento permite la identificación de parámetros asociados a la producción y composición de fangos.

### **1.6.1.2 Calibración dinámica.**

Si el propósito del procedimiento de calibración es describir y predecir situaciones dinámicas a un corto plazo, será conveniente un procedimiento de calibración basado en datos dinámicos. En numerosos trabajos se emplea un procedimiento de calibración a partir de datos dinámicos (Rieger *et al.*, 2001; Makinia *et al.*, 2006).

El procedimiento de calibración dinámica requiere que los datos se recojan con una determinada frecuencia de muestreo que depende de la constante de tiempo del proceso y de las variaciones del influente. El tiempo de retención hidráulico (TRH) es una de las constantes de tiempo del sistema más importantes. Idealmente, el período de tiempo entre muestras no debe ser mayor a la quinta parte del TRH, como así, también el período de toma de muestras debe ser 3 a 4 veces esta constante de tiempo. Sin embargo, puesto que las medidas son relativamente costosas estas recomendaciones no siempre se logran cumplir.

Esta metodología de calibración se emplea generalmente para lograr una profundización en el conocimiento del comportamiento dinámico del sistema. Sin embargo, la implementación de esta metodología de calibración requiere un costoso trabajo experimental. El empleo de sondas permite aliviar el esfuerzo experimental que requiere esta metodología. Existen una serie de dispositivos que permiten la determinación de variables como  $S_{NO_3}$ ,  $S_{NH_4}$ , SST, DQO,  $S_{PO_4}$ , etc., con las que se podrían muestrear zonas claves de la EDAR con una elevada frecuencia.

### **1.6.1.3 Calibración off-line en laboratorio.**

La información obtenida de la modalidad en estado estacionario o dinámica puede ser complementada con experiencias en laboratorio. Este tipo de metodología consiste en la calibración selectiva de los parámetros de elevada influencia del modelo matemático mediante experimentos en discontinuo (Penya Roja *et al.*, 2002).

Estos ensayos se realizan en el laboratorio bajo condiciones muy controladas, con fango biológico e influente de la EDAR en estudio. Consisten en experimentos específicamente diseñados para aislar los procesos biológicos, permitiendo de esta manera la calibración selectiva de los parámetros. Existen diferentes métodos de calibración selectiva de parámetros. En general se emplean técnicas respirométricas, principalmente para evaluar parámetros de las bacterias heterótrofas, autótrofas y PAO aerobias.

### 1.6.1.3.1 Técnicas respirométricas.

Para diseñar tratamientos biológicos es de vital importancia conocer el comportamiento de los microorganismos, es decir, su cinética. En contraste con las técnicas clásicas, uno de los métodos más rápidos y sencillos para el cálculo de parámetros cinéticos, son los ensayos respirométricos. Desde que fue propuesta, la técnica de la respirometría ha sido ampliamente utilizada como herramienta para la caracterización de aguas residuales, la evaluación de la actividad biológica de fangos activados y la calibración de modelos matemáticos (Spanjers y Vanrolleghem, 1995). Por respirometría se entiende la medición de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) de los microorganismos en el proceso de oxidación de un sustrato (Sperandio y Paul, 2000; Orhon y Okutman, 2003; Boursier *et al.*, 2005). El dispositivo experimental empleado en la determinación de OUR recibe el nombre de *respirómetro*, y el perfil de oxígeno disuelto (OD) frente al tiempo registrado por dicho dispositivo se denomina *respirograma*. El análisis respirométrico se emplea en general en procedimientos de caracterización del agua residual así como en ensayos destinados a la estimación de parámetros de los modelos biológicos ya que permite:

- ✓ Determinar la tasa de consumo de oxígeno en efluentes domésticos e industriales.
- ✓ Determinar la influencia tóxica y el poder inhibitorio de algunos compuestos sobre las poblaciones microbiológicas en las plantas de tratamiento de aguas residuales.
- ✓ Determinar la efectividad de cultivos microbiológicos y su comportamiento en la digestión de algún sustrato en particular.
- ✓ Determinar las características de biodegradación de productos químicos específicos o de mezclas químicas.
- ✓ Determinar los parámetros cinéticos para las reacciones de biodegradación.
- ✓ Monitorizar la aclimatación de un cultivo de microorganismos a materiales orgánicos refractarios.
- ✓ ....

Las principales razones para emplear las técnicas respirométricas son:

- ✓ Junto a la microscopía, facilita el conocimiento de los microorganismos presentes en los procesos de fango activo.
- ✓ La respirometría es una técnica sencilla, rápida, no-contaminante y asequible.
- ✓ No es posible evaluar el efecto de un proceso biológico con sólo medidas físicas o químicas: se necesitan parámetros derivados de la propia biomasa (fango activo), y esto sólo se consigue con la respirometría.

- ✓ Se puede analizar el efecto que el sustrato (agua residual) sobre la biomasa.
- ✓ Permite evaluar y controlar los procesos que tienen lugar en la depuración de aguas residuales de forma sencilla y eficiente.
- ✓ Permite optimizar los parámetros operativos del proceso y las posibilidades de un ahorro energético.
- ✓ Da un soporte fundamental a programas de simulación de procesos de depuración.

## **1.6.2 Protocolos de calibración.**

### **1.6.2.1 Protocolo de Calibración BIOMATH (Vanrolleghem *et al.*, 2003).**

El protocolo BIOMATH fue desarrollado por Vanrolleghem *et al.* en 2003 para satisfacer la necesidad de un procedimiento estándar de calibración de modelos. En la Figura 17 se puede ver las diferentes etapas de este procedimiento. Dependiendo del primer paso del protocolo, el cual se define como el objetivo de la calibración del modelo, no es necesario llevar a cabo todas las etapas descritas. El protocolo BIOMATH está compuesto por más de las cuatro etapas principales, ya que incluye la caracterización de la planta, calibración del estado estacionario, calibración dinámica y evaluación de los resultados de la calibración.

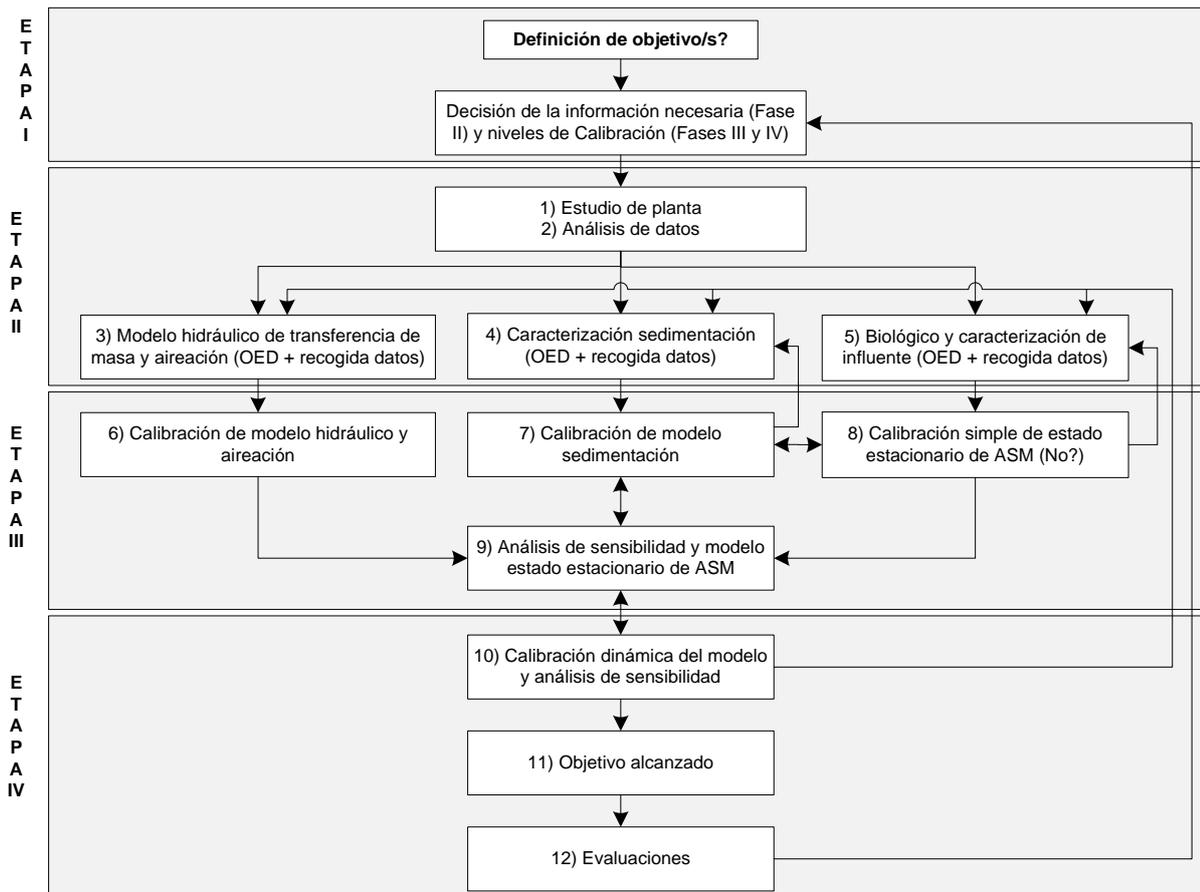


Figura 17. Esquema general del protocolo de calibración BIOMATH (Vanrolleghem et al. 2003).

Una vez establecido el objetivo del procedimiento de calibración se debe llevar a cabo un estudio y caracterización de la planta. Con ello se tiene que determinar la configuración general de la planta, parámetros de operación, concentraciones medias en la entrada y las características de la producción y rendimiento de la planta. Los datos recogidos en esta etapa son analizados y verificados antes de su uso en los distintos niveles de la calibración usando, por ejemplo, balances de masa.

El modelo completo de la EDAR a escala real en estudio, está dividido en tres compartimentos: el modelo de transferencia de masa (hidráulica y la transferencia de oxígeno), el modelo de sedimentación y el modelo biológico. Cada submodelo es calibrado por separado primero con los datos recogidos en la etapa I. Después de la calibración por separado, los tres modelos se incorporan en el modelo a gran escala y se lleva a cabo una calibración de la planta en estado estacionario. El objetivo final de esta calibración del estado estacionario es obtener un buen ajuste a la media de producción de fangos y el consumo de oxígeno de la planta. Los parámetros a calibrar durante esta etapa se determinan mediante un análisis de sensibilidad.

Para una alta precisión en la calibración se requiere una recopilación adicional de datos en cada submodelo, en cuyo caso se recomienda el uso de la metodología de diseño óptima experimental (OED methodology, Optimal Experimental Design) (Dochain y Vanrolleghem, 2001). El objetivo final de utilizar la metodología OED es el diseño de campañas de recogida de datos sobre una base cuantitativa y objetiva para maximizar el contenido de la información de los datos y reducir el costo asociado.

Después de la calibración del estado estacionario se lleva a cabo la calibración dinámica del modelo completo de la planta. En la etapa de calibración dinámica, se utilizan como entradas para el modelo los datos del influente obtenidos de una campaña de medición dinámica (muestreo intensivo). Los parámetros a calibrar se determinan de nuevo por medio de un análisis de sensibilidad. Las variables a considerar en el análisis de sensibilidad se definen generalmente por el objetivo del estudio.

Se pueden realizar experimentos a escala de laboratorio para recoger más información sobre los parámetros más sensibles. Al igual que en el paso anterior, la metodología OED se puede utilizar para el diseño de experimentos que proporcionen información importante (y rentable) para la determinación precisa de los parámetros importantes obtenidos a partir del análisis de sensibilidad. El valor de los parámetros estimados a partir de experimentos a escala de laboratorio puede ser utilizado en la calibración dinámica. Como alternativa, estos parámetros pueden ser estimados utilizando los datos a gran escala. Se puede aplicar el mismo procedimiento para la caracterización de la sedimentación y la calibración de la transferencia de masa.

Después de completar la calibración dinámica, el modelo calibrado se valida, por ejemplo, usando datos recogidos en el muestreo intensivo bajo diferentes condiciones de operación de la planta. Si las predicciones del modelo calibrado para uno o más componentes no son suficientemente buenas, entonces el modelo tiene que ser recalibrado.

#### **1.6.2.2 Protocolo de Calibración STOWA (Hulsbeek et al., 2002)**

Este protocolo de calibración fue desarrollado en los Países Bajos, y fue el resultado de los datos obtenidos en la calibración de alrededor de 100 plantas (Hulsbeek *et al.*, 2002). La Figura 18 ilustra el organigrama general de este protocolo. Al igual que el protocolo BIOMATH, éste comienza con la formulación de los objetivos. Después de esto, se lleva a cabo una definición de los procesos más relevantes. En la etapa de recopilación y verificación de datos se definen la composición y tasas de los flujos de los diferentes elementos del

proceso, así como el volumen de estos. Los balances de masa son muy convenientes para verificar la consistencia de los datos. En el caso de que los datos no sean consistentes o los balances de masa no puedan ser cerrados, entonces los parámetros operacionales (TRC, flujo de recirculación,...) se deben corregir antes de proceder a la calibración del modelo.

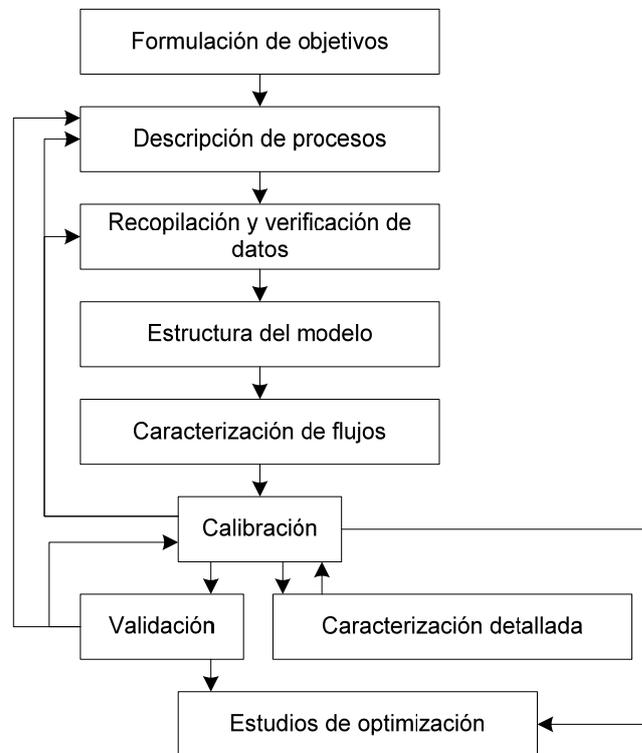


Figura 18. Esquema general del protocolo de calibración STOWA (Hulsbeek et al., 2002).

En la cuarta etapa del protocolo, se define la estructura del modelo de la planta. Esto comprende la selección de los submodelos para la descripción de la hidráulica, aireación, sedimentación y procesos biológicos de la planta. En el siguiente paso, se recopila la información referente a los distintos flujos de la planta.

Finalmente el modelo puede ser calibrado. En esta etapa, el protocolo aconseja realizar una calibración inicial y comparar los resultados de las simulaciones con los datos de la planta. Si hay una considerable discrepancia entre el modelo y las medidas, el protocolo recomienda, para verificar la calidad de los datos, realizar medidas adicionales y comprobar de nuevo los balances de masa. Después de verificar (o corregir si procede) los balances de masa, se puede llevar a cabo una calibración minuciosa. Con este fin, el protocolo STOWA establece un procedimiento de calibración manual en el que los parámetros de los diferentes procesos biológicos son calibrados de uno en uno hasta obtener un buen ajuste con los datos de la planta.

En este protocolo, la caracterización del influente de la planta está basada en métodos físico-químicos combinados con test de DBO. Se establece también en el protocolo una detallada discusión del uso de test de DBO y sus desventajas.

Cuando se ha completado la calibración, el modelo debe ser validado usando los datos de la planta de un periodo diferente al usado en la calibración. Después de que el modelo haya sido satisfactoriamente validado, puede ser empleado para su fin último.

### **1.6.2.3 Protocolo de Calibración HSG (Langergraber et al., 2004).**

Este protocolo de calibración fue presentado por varias instituciones académicas (HSG, Hochschulgruppe) que trabajan en las simulaciones de los modelos ASM en Alemania, Austria y Suiza (Langergraber et al., 2004). La estructura general de este protocolo se muestra en la Figura 19. Al igual que los otros protocolos, el primer paso es la definición de los objetivos del estudio de calibración. Después, se recopila información completa de la configuración de la planta, funcionamiento y rendimiento de esta. Usando esta información general de la planta se selecciona el modelo preliminar para la planta, el cual incluye diferentes submodelos: hidráulico, sedimentación, control y biológico. En la tercera etapa del protocolo, se evalúa y verifica la calidad de los datos de la planta usando balances de masa, similar a los otros protocolos.

Antes de la calibración dinámica del modelo, es decir, la cuarta etapa, se calibra el submodelo hidráulico. Mediante un experimento de trazadores o, alternativamente, dinámica computacional de fluidos, se determina el número de tanques en serie requeridos para una adecuada modelación del comportamiento del tanque aireado de mezcla completa. Una vez que el submodelo hidráulico este calibrado, se lleva a cabo una presimulación. En este paso, se realiza una simulación del estado estacionario del modelo y los resultados se comparan con los datos medios de la planta. También se realiza un estudio de sensibilidad para determinar los parámetros de mayor influencia.

En la quinta etapa, se lleva a cabo una recogida de datos exhaustiva de la planta para su uso en la calibración dinámica del modelo. La frecuencia, localización y tipo de las medidas serán determinadas en base a la evaluación del modelo en las etapas previas. Se recomienda que la duración de la recogida de datos sea de 10 días para incluir el funcionamiento de la planta en al menos un fin de semana. En esta etapa, se aplica también un examen a la calidad y consistencia de los datos.

Durante la sexta etapa, se realiza la calibración dinámica del modelo. Primero, se determina el valor inicial de las variables del modelo por simulación del modelo durante varias semanas dependiendo del TRC de la planta. Después los parámetros del modelo se calibran siguiendo un proceso iterativo similar al protocolo de STOWA. La eficacia de la calibración del modelo se juzga a través de controles visuales teniendo en cuenta los valores máximo y la mediana de los resultados de la simulación. Al igual que los protocolos anteriores, las pautas del protocolo HSG también aconsejan realizar una validación del modelo. El modelo calibrado se compara con datos de la planta obtenidos bajo diferentes condiciones que las empleadas en el proceso de calibración.

En la última etapa, el modelo calibrado y validado se usa para simular diferentes escenarios definidos de acuerdo a los objetivos a estudiar. Finalmente, la calibración se completa con la documentación detallada de los pasos seguidos hasta alcanzar un modelo calibrado y validado.

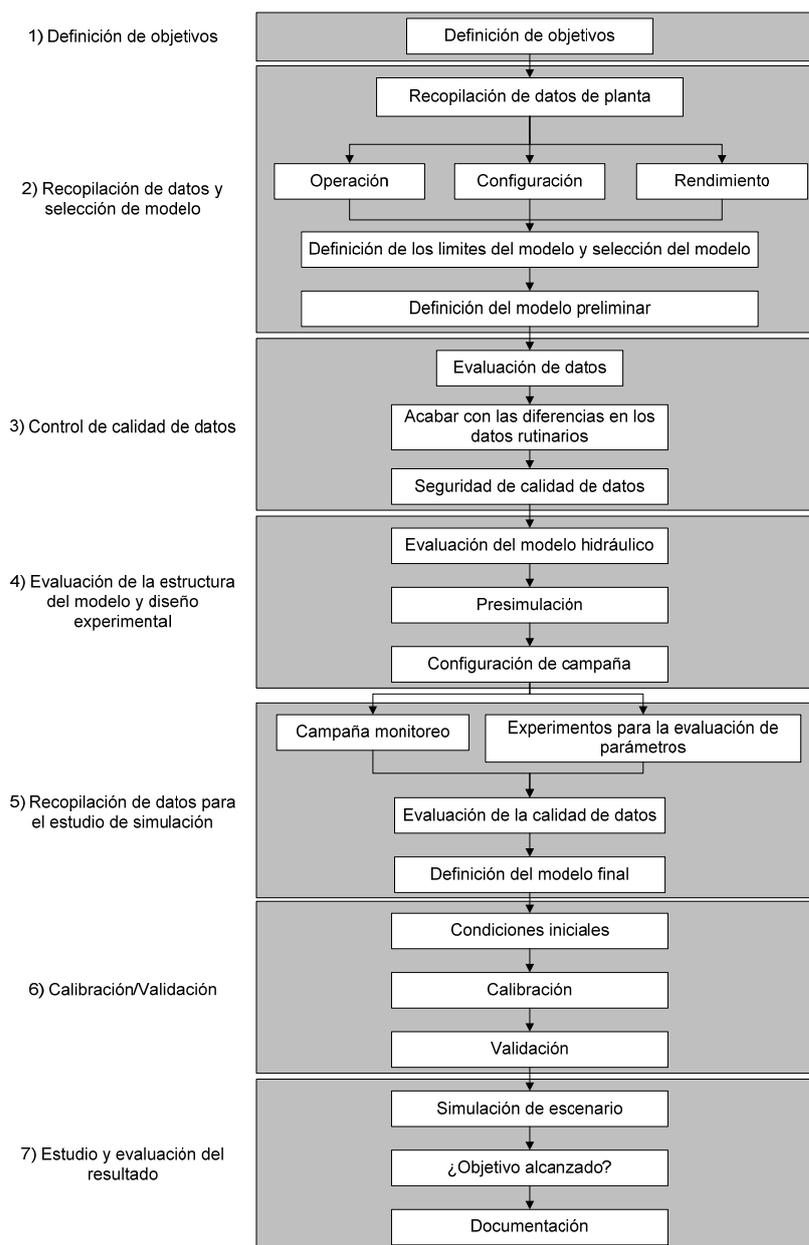


Figura 19. Organigrama de calibración con las pautas del protocolo HSG (Langergraber et al., 2004).

#### 1.6.2.4 Protocolo de Calibración WERF (Melcer et al., 2003).

El protocolo WERF (Melcer y col., 2003) propone diferentes alternativas según la EDAR que se analice y los objetivos que se deban cumplir. Si bien no presenta un esquema general como los anteriores, puede considerarse que este protocolo sigue en cada caso las siguientes etapas: en la primera etapa, se introduce la configuración de la planta en el simulador (datos físicos de la planta, de carga del influente y de rendimiento). En una segunda etapa, se recopilan datos adicionales sobre la planta a estudiar. Esta etapa incluye la recopilación de datos históricos y nuevas medidas. El tercer paso es la etapa de calibración, la cual se realiza de forma diferente según diferentes niveles de calibración

(Tabla 17). El cuarto paso es la validación del modelo. Finalmente, tras una validación positiva, el modelo está listo para su aplicación a escala real.

Como en los otros protocolos, el protocolo WERF depende mucho del objetivo de la calibración y por ello propone un enfoque escalonado en cuatro niveles diferentes de calibración. En este enfoque, la calibración del modelo comienza de un nivel simple y avanza hacia niveles cada vez más complicados. Con cada incremento de nivel, la precisión de la calibración también aumenta.

<b>Nivel 1</b>
Utiliza los valores predeterminados y los supuestos para el modelo específico. Este nivel de calibración se usa para diseñar una nueva planta donde no exista información sobre el proceso y el agua de entrada.
<b>Nivel 2</b>
Solamente usa datos históricos para la calibración de la planta. Un punto importante es el llamado “ <i>condicionamiento de datos</i> ”, el cual incluye procesamiento, limpieza y corrección de los datos históricos brutos. En este paso, se pueden emplear análisis de series temporales de datos y métodos estadísticos para detectar suciedad de sensores, valores extremos,... El conjunto de datos filtrados se somete después a la etapa de “ <i>reconciliación de datos</i> ”, en la cual, se evalúa la calidad de los datos usando balances de masa y conocimientos especializados de ingeniería. Para este nivel de calibración, también se indican varias parámetros que pueden determinarse a partir de los datos históricos ( $f_{Xl}$ , $f_{Sl}$ , TRC, constantes de afinidad,...).
<b>Nivel 3</b>
Este nivel tiene por objetivo mejorar los resultados de la calibración mediante la creación de una campaña dinámica de monitorización para recopilar datos de forma muy frecuente sobre la dinámica de la planta y las características del influente. Se realizan “ <i>test de stress</i> ” para determinar la capacidad máxima de la planta bajo condiciones extremas. Además, también se pueden determinar las características hidráulicas de los tanques de aireación.
<b>Nivel 4</b>
Se incluyen medidas directas de parámetros. En otras palabras, se realiza una caracterización del agua de entrada y estimación de parámetros cinéticos/estequiométricos muy detallada. Este nivel de calibración se aconseja en caso de que el nivel 3 no permita obtener un buen resultado de la calibración debido al pobre contenido de información de las medidas obtenidas en la campaña de recogida de datos o por la complejidad del modelo. El principal interés de los experimentos a escala de laboratorio es la determinación de los parámetros de nitrificación (particularmente las tasas de crecimiento y lisis de las bacterias autótrofas) y la caracterización del influente. Por lo general se emplea un procedimiento experimental basado en un SBR.

Tabla 17. Niveles de calibración propuestos en el protocolo de WERF (Melcer y col., 2003).

### 1.7 Calibración de bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes.

En el proceso de calibración de los modelos se requiere ajustar los valores de los parámetros para obtener una mejor aproximación del modelo a la realidad. Como se ha comentado en apartados anteriores, los modelos del proceso de nitrificación en dos etapas, consultados en la bibliografía, aparte de estructuras matemáticas diferentes, presentan un amplio rango de valores de los parámetros incluidos. En todos los modelos examinados, la determinación de

los valores de los parámetros se lleva a cabo de tres maneras diferentes, aunque lo habitual es una combinación de estas:

- a) Fijar los parámetros con valores obtenidos de la bibliografía. Aquellos parámetros de escasa influencia del modelo suelen ser obtenidos de la bibliografía ya que grandes variaciones en su valor generan pequeños cambios en los resultados. Aunque también hay modelos que asumen de la bibliografía valores de parámetros de elevada influencia, como el rendimiento celular de las bacterias, la tasa de crecimiento,... (Moussa *et al.*, 2005, Kaelin *et al.*, 2009, Hellinga *et al.*, 1999).
- b) Determinación experimental de parámetros directamente mediante experimentos específicos en que se aísla el valor del parámetro o su efecto domina sobre el resto de parámetros. Estos experimentos se basan, en general, en técnicas respirométricas en las que se somete a la biomasa a un amplio intervalo de condiciones de operación según el parámetro que se vaya a determinar. Además, estos ensayos se enfocan en la determinación de los parámetros de elevada influencia. Pocos estudios, como los desarrollados por Van Hulle *et al.* 2007, Pambrun *et al.* 2006 y Carrera 2001, llevan a cabo calibraciones off-line de alguno de los parámetros del modelo de forma independiente.

Van Hulle *et al.* (2007) llevan a cabo la operación de un reactor SHARON a escala de laboratorio con nitrificación parcial en el que determinan las constantes de semisaturación e inhibición por amoníaco, la de inhibición por ácido nitroso, la constante de semisaturación del oxígeno y el efecto del pH y la temperatura mediante ensayos respirométricos en batch. Además, a partir de estas constantes y de la  $\mu$  en el reactor (calculada como la inversa del TRH) determina la  $\mu^{\max}$  de las bacterias amonioxidantes.

En los estudios de Pambrun *et al.* (2006) solo se determinan las constantes de semisaturación e inhibición de los sustratos en bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes mediante ensayos respirométricos. Para la determinación de la velocidad máxima de crecimiento asumen los valores de la tasa de lisis y de rendimiento celular.

En el trabajo de investigación de Carrera (2001) se lleva a cabo la determinación experimental de las constantes de inhibición por  $\text{NH}_3$  y  $\text{HNO}_2$  de las bacterias

amoniooxidantes. El resto de parámetros son determinados mediante un proceso de optimización.

- c) Determinación de los parámetros por ajuste del modelo simulado con los datos experimentales. Se trata de optimizar el valor de los parámetros de forma que se minimice la diferencia entre los valores simulados y los valores experimentales. En este caso, normalmente se lleva a cabo una calibración dinámica para la determinación conjunta de los parámetros del modelo. De forma manual o mediante rutinas de optimización se modifican sistemáticamente los parámetros del modelo con el fin de minimizar una función de error (del error entre modelo y datos). Esta es la función objetivo. En general, la complejidad de estas es elevada, y se suele utilizar algún simulador para facilitar el proceso de calibración. Moussa *et al.* (2005) emplean Aquasim para simular el proceso de nitrificación – desnitrificación en un SBR a escala de laboratorio, Jones *et al.* (2007) calibran los parámetros de bacterias AOB, NOB y Anammox mediante la simulación de varios esquemas de operación con Biowin, Sin y Vanrolleghem (2006) emplean el simulador WEST para una calibración dinámica del modelo ASDM2d en un SBR con cambios en sus condiciones de operación.

Resumiendo, en casi todos los modelos, en primer lugar se asignan algunos (o casi todos) de los valores de los parámetros a partir de la bibliografía y posteriormente se realizan calibraciones off-line y/o calibraciones del estado estacionario o dinámica para la determinación del resto de parámetros. Así que, aunque existen diversos modelos del proceso de nitrificación en los que se proponen un conjunto de valores de los parámetros, en ningún caso se ha descrito un modelo en el cual se determinen todos los parámetros del modelo de forma independiente. En consecuencia, tampoco se ha descrito ningún procedimiento detallado para la calibración de los parámetros de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes responsables del proceso de nitrificación.

C  
A  
P  
I  
T  
U  
L  
O  
2

***Objetivos.***



## 2 Objetivos.

El presente trabajo de investigación se enmarca dentro del proyecto “*Estudio de técnicas avanzadas para la eliminación de nitrógeno amoniacal en el sobrenadante de la deshidratación de fangos. Aplicación al diseño y gestión de una EDAR sostenible*” (CTM2005-06919-C03-01/TECNO), financiado por el MEC, en el que el estudio de la eliminación de nitrógeno amoniacal se plantea desde distintos puntos de vista:

- a. Estudio experimental a escala de laboratorio y escala piloto.
- b. Modelación de los procesos biológicos y físico-químicos implicados.
- c. Incorporación del modelo en un software.
- d. Calibración de los parámetros del modelo.
- e. Estudio microbiológico de las distintas poblaciones de microorganismos.
- f. Desarrollo de un sistema de control que permita optimizar el funcionamiento de la EDAR maximizando los rendimientos y minimizando el consumo energético, detectar y diagnosticar fallos de proceso y/o transmisión de datos.
- g. Realizar modelos predictivos para la estimación de variables y parámetros críticos.
- h. Análisis estadístico de los datos del proceso para su monitorización y desarrollo.

La presente tesis se centra en los apartados de modelación de procesos y calibración de parámetros, además de la inclusión de dicho modelo en un software de simulación. Los primeros modelos del proceso de nitrificación describían una única etapa donde el amonio es oxidado a nitrato, asumiéndose que la etapa limitante era la oxidación de amonio a nitrito. La suposición del proceso como una sola etapa era válida ya que en los sistemas de tratamiento de aguas raramente se producía acumulación de nitrito. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías de tratamiento y los problemas de acumulación de nitrito detectados en algunas EDARs, surge la necesidad de modelar los procesos que tienen lugar en el tratamiento de las aguas residuales incluyendo el nitrito como componente de dichos modelos.

Con este objetivo existen numerosos grupos de investigación que trabajan para tratar de abordar y resolver algunas de las cuestiones sobre la modelación del nitrito en las aguas residuales. Hoy en día existen diferentes modelos en los que se divide el proceso de nitrificación en las dos etapas involucradas (oxidación de amonio a nitrito y oxidación de nitrito a nitrato). Existe cierta diversidad en las estructuras matemáticas y los valores de los parámetros de dichos modelos debido, principalmente, a las condiciones en las que se lleva

a cabo el desarrollo del modelo, a los supuestos realizados en cada uno y a que en la mayoría de los casos algunos de los parámetros no son medidos sino asumidos de la bibliografía.

A pesar de los diferentes modelos existentes, aún no se dispone de un modelo del proceso de nitrificación en dos etapas, que toda la comunidad científica acepte como válido. Tampoco se ha descrito una metodología de calibración detallada de los parámetros incluidos en dicho modelo. Por este motivo los objetivos generales de la presente tesis son:

- 1) Desarrollar un modelo matemático que permita representar el proceso de nitrificación vía nitrito. El modelo desarrollado será incorporado al modelo general BNRM1 para mejorar la capacidad de predicción de este último al incorporarse el nitrito en la simulación general de una EDAR.
- 2) Desarrollar y validar metodologías de calibración de los parámetros del modelo para dos sistemas de operación con características muy diferentes (un reactor SHARON a escala laboratorio y una planta piloto de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de materia orgánica y nutrientes).

El modelo a desarrollar incluirá los procesos biológicos de crecimiento y lisis de las bacterias amonioxidantes y de las bacterias nitritoxidantes, procesos físicos de desabsorción del amoníaco gaseoso y el dióxido de carbono, y los procesos químicos del equilibrio  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2/\text{HNO}_2$  y  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ . Una vez calibrado, el modelo será incorporado al modelo global BNRM1 que se encuentra implementado en el programa DESASS (*Design and Simulation of Activated Sludge Systems*) (Ferrer *et al.*, 2008), para poder simular el proceso de nitrificación observando la evolución de los diferentes componentes del modelo en cada una de las etapas del proceso.

Para la consecución de estos objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- ✓ Establecer la estructura matemática del modelo mediante el estudio bibliográfico de los procesos que tienen lugar durante la nitrificación.
- ✓ Incorporar el modelo desarrollado al modelo global Biological Nutrient Removal Model Nº1 (BNRM1) e implementarlo dentro de la plataforma de simulación DESASS desarrollada por el grupo de investigación CALAGUA para el diseño, simulación y optimización de sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales.

- ✓ Operar y controlar dos sistemas diferentes para la evaluación del proceso de nitrificación vía nitrito:
  - ◇ Un reactor SHARON a escala de laboratorio alimentado con agua residual sintética.
  - ◇ Una planta piloto de eliminación de nutrientes que trata un agua residual urbana.
- ✓ Desarrollar una metodología sistemática de calibración de los parámetros incluidos en el modelo para su aplicación en los sistemas de operación citados, poniendo especial énfasis en la simplicidad y facilidad para poder reproducirla con la frecuencia necesaria y sin la necesidad de un equipo específico ni técnicas de laboratorio especialmente complejas. Al tratarse de dos sistemas de tratamiento con condiciones de operación muy diferentes es necesario el desarrollo de una metodología de calibración diferente para cada uno de estos sistemas.
- ✓ Calibrar los parámetros del modelo aplicando la metodología desarrollada en cada uno de los sistemas operados: reactor SHARON a escala de laboratorio y planta piloto de tratamiento de aguas residuales. Posteriormente, comparación y justificación de los valores de los parámetros del modelo obtenidos en la calibración en ambos sistemas.
- ✓ Identificar las poblaciones de bacterias desarrolladas en cada uno de los sistemas operados. Mediante la técnica FISH determinar las especies de bacterias presentes en cada uno de los sistemas evaluados. Además aplicando el método de cuantificación desarrollado por Borrás L. (2008) se determina también el porcentaje de cada una de estas y su concentración en unidades de g DQO/m<sup>3</sup>.
- ✓ Simular mediante el programa DESASS el funcionamiento de los reactores SHARON a escala de laboratorio. Esta simulación permitirá validar el modelo comparando las predicciones de éste con los resultados experimentales.

Para empezar con el desarrollo de la presente tesis, en el capítulo 3 se describen los dos sistemas de tratamiento utilizados en el proceso de este trabajo de investigación: reactor SHARON a escala laboratorio y planta piloto. En los capítulos 4 y 5 se detallan el modelo de nitrificación vía nitrito desarrollado y las metodologías de calibración establecidas para cada sistema tratado. Finalmente, en el capítulo 6 se exponen los resultados obtenidos en la aplicación de las calibraciones en cada uno de los sistemas y un análisis comparativo de estos resultados.



C  
A  
P  
I  
T  
U  
L  
O  
  
3

***Materiales y métodos.***



### **3 Materiales y métodos.**

Los experimentos para la determinación de parámetros de las bacterias autótrofas nitrificantes fueron llevados a cabo con fango de dos sistemas de tratamiento completamente diferentes:

- ✓ Fango de un reactor SHARON a escala de laboratorio alimentado con agua residual artificial. Se trata de un reactor completamente aireado, es decir, sin desnitrificación, y operado para conseguir la nitrificación del 50 % del amonio en el influente.
- ✓ Fango de una planta piloto con eliminación biológica de nutrientes (N y P). Esta planta está ubicada en la EDAR del Barranco del Carraixet en la localidad de Alboraya (Valencia) y es alimentada con agua procedente del decantador primario de dicha depuradora.

A continuación se detalla, en primer lugar, los métodos analíticos empleados durante la fase experimental en ambos sistemas de tratamiento. Posteriormente, se describen las características de cada uno de los sistemas, así como los resultados obtenidos durante la operación de estos, y los montajes experimentales usados en los ensayos llevados a cabo durante la calibración del reactor SHARON y de la planta piloto.

#### **3.1 Métodos de análisis.**

Aparte de la información proporcionada por las diferentes sondas en cada uno de los sistemas estudiados, durante el proceso de operación se realizó una analítica de seguimiento para comprobar su correcto funcionamiento.

##### **3.1.1 Analíticas de seguimiento en los reactores SHARON.**

Aparte de las medidas on-line que se registraban durante toda la fase de operación de los reactores, se controló su evolución mediante el análisis de los parámetros que se muestran en la Tabla 18. A partir de los resultados de estas analíticas se podía observar la evolución del proceso durante la puesta en marcha y operación de éste, y determinar cuando los reactores alcanzaban una nitrificación del 50 % del amonio influente.

Parámetro	Frecuencia
Sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV)	2 veces por semana
Concentración de nitrógeno total ( $N_T$ )	2 veces por semana
Concentración de amonio ( $S_{NH_4}$ )	2 veces por semana
Concentración de nitratos ( $S_{NO_3}$ )	2 veces por semana
Concentración de nitritos ( $S_{NO_2}$ )	2 veces por semana
Alcalinidad ( $S_{ALK}$ )	2 veces por semana
Población bacteriana nitrificante	Ocasional

**Tabla 18. Análisis de seguimiento de los reactores SHARON.**

Para la determinación de la concentración de *sólidos totales (SST)* y *sólidos totales volátiles (SSV)* se siguió la metodología descrita en los métodos 2540D y E del “Standard Methods for the Examination Water and Wastewater” (2005).

Para la determinación del *nitrógeno total* se utilizó el método fotométrico mediante el test en cubetas desarrollado por 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 termo-reactor. 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 marca Spectroquant VEGA 400.

Las concentraciones de *nitrito*, *nitrato* y *amonio* se obtuvieron por cromatografía iónica. Este es un método empleado para la separación y determinación de iones basado en el uso de resinas de intercambio iónico. La muestra atraviesa unas columnas de adsorción y los iones sufren una separación debido a las diferentes interacciones con la fase fija de las columnas analíticas. Una vez separada, la muestra pasa a través de un detector donde se registra la señal obtenida con respecto al tiempo de retención. El resultado son cromatogramas donde la posición de los máximos indica el ión presente (carácter cualitativo) y su área indica la cantidad existente de dicho ión (carácter cuantitativo). El equipo empleado es un Compact IC 761.

Posteriormente también se empleó el método del fenol (Standard Methods, 2005) para determinar las concentraciones de amonio, y el analizador multiparamétrico para análisis de aguas SmartChem 200, para la determinación de amonio, nitrato y nitrito.

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 concentraciones de especies químicas (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<sub>3</sub>).

La evolución de la *población microbiana* de los reactores fue supervisada usando la técnica de hibridación in situ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). La técnica FISH consiste en la hibridación de una sonda con una parte específica del 16S RNA bacteriano. La sonda se elabora mediante la síntesis química de nucleótidos y se marca con un agente de color fluorescente. Las bacterias de un determinado grupo, al ser hibridadas con una sonda específica, pueden ser identificadas empleando un microscopio de fluorescencia. La Tabla 19 muestra las sondas de hibridación utilizadas para la identificación de bacterias.

SONDA		BACTERIA	REFERENCIAS
EUB mix	EUB338 I	<i>Eubacteria</i>	Amann, R. I (1990)
	EUB338 II	<i>Planctomycetales</i>	Daims, H. (1999)
	EUB338 III	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims, H. (1999)
NSO190/NSO1225		<i>Betaproteobacterial ammonia-oxidizing bacteria</i>	Mobarry, B. (1996)
NEU		Most halophilic and halotolerant Nitrosomonas spp.	Wagner <i>et al.</i> (1995)
Nmv		Nitrosococcus mobilis ("Nitrosomonas") lineage	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
Nsv443		Nitrospira spp.	Mobarry <i>et al.</i> (1996)
Nmo218		Nitrosomonas oligotropha-lineage	Gieseke <i>et al.</i> (2001)
Nse1472		Nitrosomonas europea, halophila, eutropha, Kraftisried-Isolat	Juretschko <i>et al.</i> (1998)
Ntspa712		most members of the phylum Nitrospirae	Daims <i>et al.</i> (2001)
NIT3		Nitrobacter spp.	Wagner <i>et al.</i> (1996)
DEN67		Methanol-utilizing denitrifying cluster	Ginige <i>et al.</i> (2005)

Tabla 19. Sondas de hibridación empleadas en la identificación de organismos amonioxidantes, nitritoxidantes y desnitrificantes.

### 3.1.2 Analíticas de seguimiento en la planta piloto.

Durante toda la fase de operación de la planta piloto se siguió su evolución mediante el análisis rutinario de los parámetros que se muestran en la Tabla 20. A partir de estas analíticas se podía comprobar el correcto funcionamiento del sistema de tratamiento durante toda la fase experimental para poder actuar sobre las distintas variables del sistema en caso necesario. Además estas analíticas permitían determinar cuando el sistema alcanzaba el estado estacionario (momento es que se realizaban las calibraciones de los parámetros de las bacterias); en este momento, se realizaba un seguimiento analítico exhaustivo, más completo que el anterior, para determinar el estado del sistema en las

condiciones de operación establecidas. En estos análisis exhaustivos se realizaban las analíticas tanto de la Tabla 20 como las que aparecen en la Tabla 21.

Parámetro	Frecuencia
Sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV) del influente, reactores y efluente	2 veces por semana
Concentración de fósforo soluble del influente, reactores, efluente y alimento	2 veces por semana
Concentración de amonio ( $S_{NH_4}$ ) del influente, reactores y efluente	2 veces por semana
Concentración de nitratos ( $SON_3$ ) del influente, reactores y efluente	2 veces por semana
Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en influente, r. anaerobio y alimento	2 veces por semana
Índice volumétrico del fango (IVF)	1 vez por semana
Población bacteriana nitrificante	Ocasional

**Tabla 20. Analíticas de seguimiento de la planta piloto.**

Parámetro
Demanda química de oxígeno (DQO) del influente, reactores y efluente
Demanda química de oxígeno soluble ( $DQO_s$ ) del influente y efluente
Demanda biológica de oxígeno límite total y soluble ( $DBO_t$ ) del influente y efluente
Concentración de fósforo total ( $P_T$ ) del influente, reactores y efluente
Concentración de nitrógeno total ( $N_T$ ) del influente y efluente
Concentración de nitrógeno total soluble ( $N_{Tsoluble}$ ) del influente, reactores y efluente
Población bacteriana nitrificante

**Tabla 21. Analíticas exhaustivas de la planta piloto.**

Las analíticas empleadas para la determinación de todas las fracciones del *nitrógeno* y del *fósforo*, así como los *sólidos suspendidos totales y volátiles*, son las detalladas en el Standard Methods (2005). También se empleó el analizador multiparamétrico SmartChem 200.

La determinación de los *ácidos grasos volátiles* se realizaba con el mismo método descrito para la determinación de la alcalinidad, que determina la concentración mediante cálculos de equilibrio químico.

La determinación de la *demanda química de oxígeno (DQO)* se ha llevado a cabo según el método 5220B propuesto en el Standard Methods (2005). Para la determinación de la *demanda biológica de oxígeno (DBO)* se ha utilizado un método experimental basado en el respirómetro de Warburg (Metcalf y Eddy, 1995) mediante el montaje experimental diseñado por la firma comercial WTW.

Para el análisis de la *población bacteriana* de los reactores se empleó la técnica de hibridación in situ FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), descrita en el apartado anterior, y se utilizaron las mismas sondas descritas en la Tabla 19.

### 3.2 Reactor SHARON a escala laboratorio.

El objetivo en esta fase experimental era operar un reactor SHARON para alcanzar un estado de nitrificación parcial (oxidación del 50 % del amonio de entrada) ya que con esta relación se consigue el efluente adecuado para utilizarse posteriormente en un proceso ANAMMOX. Con la operación del reactor SHARON se estudió la estabilidad del proceso y, a la vez, se obtuvo fango para la calibración de las bacterias que se desarrollan en este tipo de reactores (bacterias amonioxidantes).

Se operaron al mismo tiempo dos reactores SHARON con idénticas características. A partir del primero de los reactores se obtuvieron las muestras de fango necesarias para realizar los experimentos para la calibración de los parámetros de las bacterias, mientras que el segundo reactor fue usado para optimizar la operación del sistema (caudal y temperatura) y se operó bajo condiciones estables con el fin de determinar su capacidad máxima de tratamiento.

#### 3.2.1 Montaje de los reactores.

Se trata de reactores cilíndricos de metacrilato de 7 l de volumen útil operados como reactores en continuo de tanque agitado (RCTA) sin retención de fangos, por lo que el tiempo de retención celular (TRC) es igual al tiempo de retención hidráulico (TRH). La Figura 20 muestra el esquema del montaje experimental de uno de los reactores.

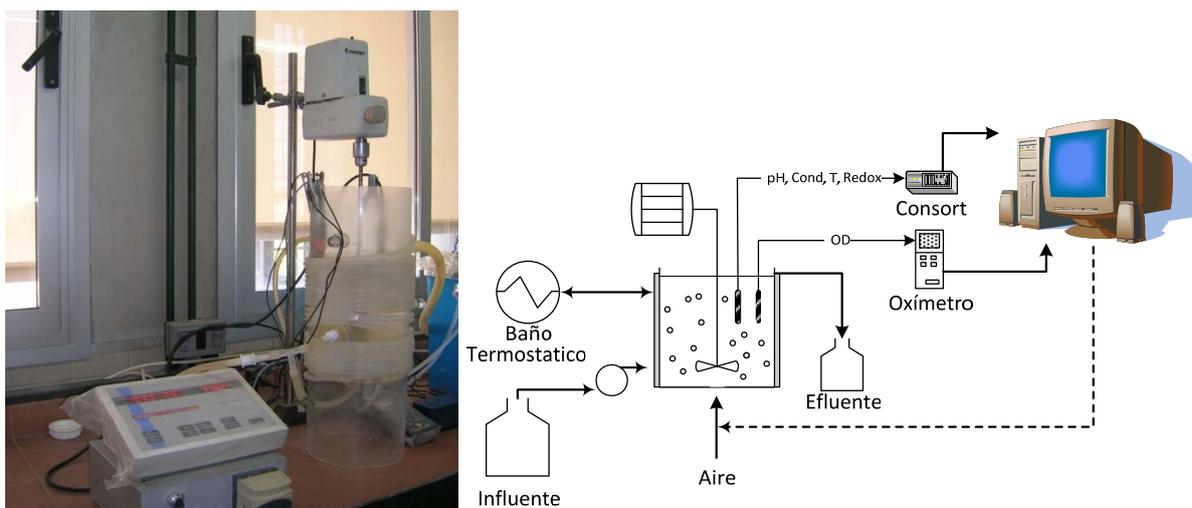


Figura 20. Esquema y fotografía del montaje experimental de los reactores SHARON.

Cada reactor dispone de una válvula en la parte inferior del mismo para la entrada del alimento sintético que es bombeado desde un depósito de 25 l por medio de una bomba peristáltica. La salida del efluente se realiza mediante rebose por un orificio en la parte superior de los reactores. El fango en los reactores es mezclado mediante agitadores mecánicos de marca Heidolph de 50 Hz y 35 – 2800 rpm.

Los reactores están equipados con sondas de medición que a través de su conexión con un ordenador permiten la recopilación on-line de las medidas de pH, conductividad, oxígeno disuelto (OD), potencial redox (ORP) y temperatura, obteniéndose un registro continuo de estos parámetros en el proceso. La medida del oxígeno disuelto se realizó con un oxímetro Oxi 340 marca WTW mientras que el resto de parámetros fueron monitorizados con un analizador multiparamétrico Consort C832.

### 3.2.2 Características del agua residual influente.

El influente usado en ambos reactores era un agua residual sintética que reproducía las características del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos (Tabla 22). Hay que destacar de esta composición la alta concentración de amonio y bicarbonato, mientras que la presencia de los otros componentes es esencial para el correcto desarrollo de la biomasa.

<i>Compuestos principales</i>	<i>Concentración (mg/l)</i>
N-NH <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> Cl)	1000
CaCl <sub>2</sub>	2.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	51
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14
NaHCO <sub>3</sub>	6715
<i>Compuestos Traza</i>	<i>Concentración (mg/l)</i>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.029
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.300
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.060
KI	1.274
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.240
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.120
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.240
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.300

Tabla 22. Composición del agua sintética usada en el influente de los reactores.

### 3.2.3 Operación de los reactores SHARON.

Los reactores SHARON operados en el laboratorio eran aireados mediante difusores de pecera y un compresor que bombeaba el aire por la parte inferior de los reactores. Un sistema de control *on-off* se encargaba de mantener la concentración de oxígeno disuelto en

torno al valor deseado (2 mg/l). El pH del medio no fue controlado para observar la evolución natural en el proceso de nitrificación. La temperatura de los reactores se mantuvo en torno a los 30 °C gracias a un sistema de recirculación de agua procedente de un baño termostático.

El caudal influente determina los valores de TRC y TRH en los reactores. En principio ambos tiempos de retención deben ser iguales, dado que vienen definidos como la relación entre el volumen y el caudal, pero debido a procesos de evaporación en los reactores se observó que el caudal del efluente era menor que el del influente y, por tanto, el TRC era mayor que el TRH, como se puede ver en las siguientes ecuaciones:

$$TRC = \frac{\text{Volumen reactor}}{Q_{\text{efluente}}} \quad \text{Ec.- 47}$$

$$TRH = \frac{\text{Volumen reactor}}{Q_{\text{influyente}}} \quad \text{Ec.- 48}$$

Durante la puesta en marcha del primer reactor se estableció un caudal del influente de 1.5 l/d con el que se consiguió el porcentaje de nitrificación parcial deseado, y por tanto, este caudal se mantuvo durante toda la operación del reactor. Midiendo los caudales de la corriente de entrada y salida del sistema se detectó un caudal de evaporación medio de 0.5 l/d, lo cual representa un 33% del caudal influente. Teniendo en cuenta este caudal de evaporación el reactor R<sub>1</sub> estuvo operando con un TRH de 4.6 d y un TRC de 7 d. En el segundo reactor el caudal influente fue uno de los parámetros que se modificaron durante su operación para estudiar su efecto en el proceso.

Para la puesta en marcha del reactor R<sub>1</sub> se inoculó con fango procedente de la EDAR del Carraixet (Alboraya) que trata aguas residuales urbanas. La población de microorganismos de este inóculo se encontraba adaptada a concentraciones bajas de amonio y temperaturas que oscilaban alrededor de 20°C. Este fango no adaptado a las condiciones de un proceso SHARON fue alimentado directamente con agua residual artificial con una elevada carga de N-amoniaco (ver Tabla 22). Además la temperatura se estableció en 30 °C (temperatura típica de estos reactores) desde el comienzo de la operación.

La Figura 21 (superior) muestra la evolución de la concentración de amonio y el nitrito en el sistema R<sub>1</sub> a lo largo del periodo de experimentación. Como se observa en la Figura 21 la suma de concentraciones de amonio y nitrito del efluente es mayor que la concentración de amonio en la entrada. Esto se debe a la evaporación que tiene lugar (aproximadamente un

33% del caudal de entrada se evapora) que concentra ambos componentes en el reactor, pero al realizar una corrección de estos datos con el caudal de entrada y salida se comprobó que el sistema cumplía el balance de nitrógeno. En esta figura se puede observar cómo tras un periodo de aclimatación del fango se alcanza un rendimiento del proceso de nitrificación próximo al 55% que se mantiene más o menos estable durante los casi 3 años de operación del reactor. El único cambio realizado en el tiempo de operación de este reactor es el valor de la temperatura, que se aumento a 35 °C para evaluar el efecto de este parámetro en fango adaptado a mayor temperatura. Durante todo el periodo que se operó el reactor el pH osciló en un rango de pH (6.0 - 6.5), debido principalmente a que la alcalinidad es consumida por el proceso de oxidación del amonio. La presencia de nitratos no superó en ningún momento los 2 mg N/l, revelando que las bacterias nitritoxidantes no se desarrollaron en el reactor (este resultado fue confirmado mediante FISH).

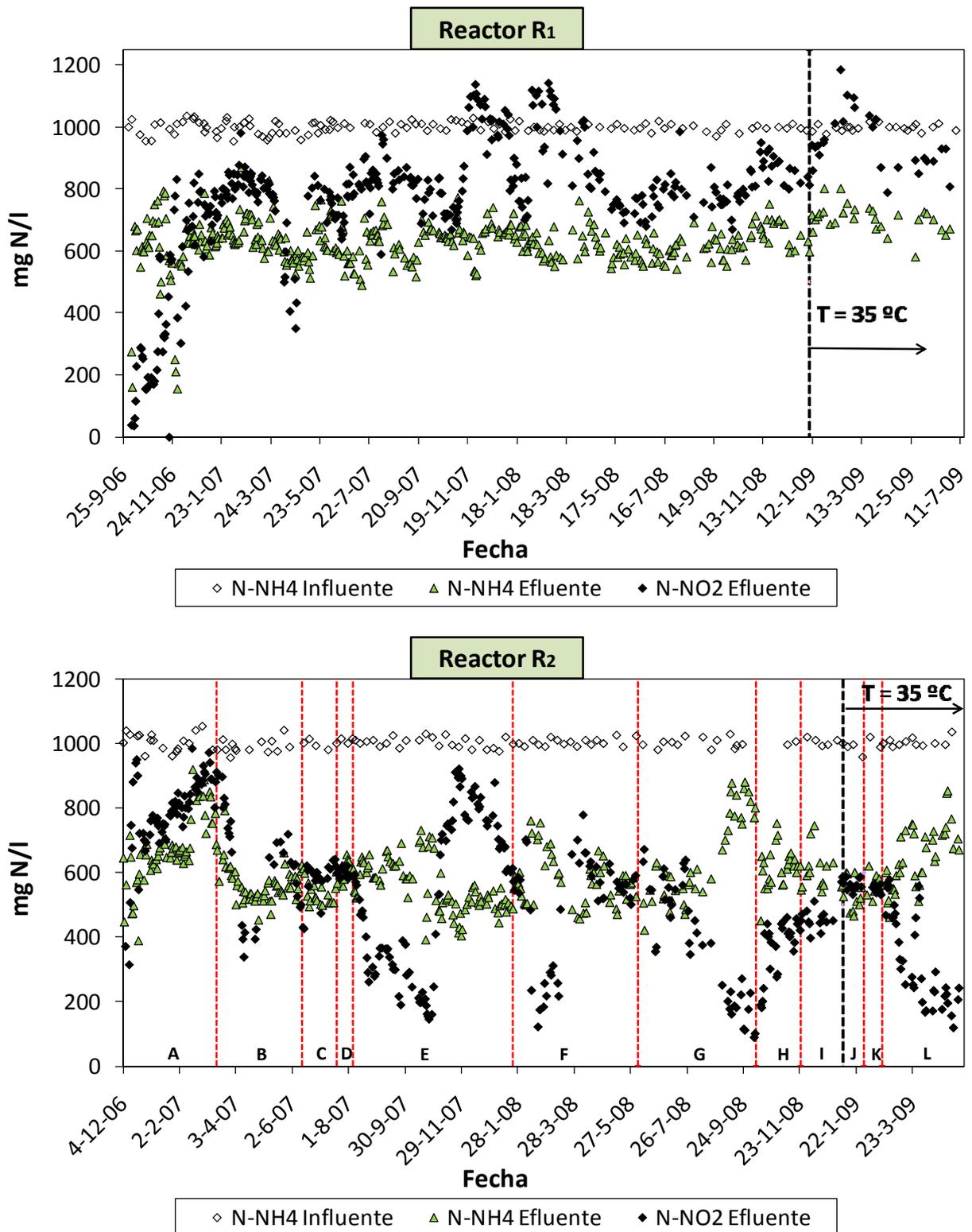


Figura 21. Evolución de la concentración de amonio y nitrito en los dos reactores SHARON operados: Reactor R<sub>1</sub> (superior) y reactor R<sub>2</sub> (inferior). En el R<sub>2</sub> las líneas rojas punteadas separan etapas con diferentes TRC.

Después de alcanzar un grado de nitrificación parcial cercano al 50:50, se sembró un segundo reactor ( $R_2$ ) con la biomasa adaptada de este primer reactor ( $R_1$ ). La temperatura del reactor y la composición del agua residual del influente de este segundo reactor fueron las mismas que en el primer reactor. El tiempo de funcionamiento necesario hasta alcanzar el estado estacionario de nitrificación parcial fue menor en el caso de este segundo reactor. Esta importante diferencia se debe a que en el reactor  $R_1$  se utilizó como inóculo fango procedente de una estación depuradora de aguas residuales que fue sometido de manera directa a las características del sobrenadante de la digestión anaerobia de fangos, mientras que el reactor  $R_2$  se utilizó fango procedente del reactor  $R_1$ . El hecho de utilizar como inóculo fango aclimatado a las condiciones de operación disminuye considerablemente el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario. Una vez alcanzado el estado estacionario (obteniendo un efluente similar al del reactor  $R_1$ ), el caudal de alimentación se fue incrementando de manera escalonada con el objetivo de estudiar el efecto del TRC en el proceso de nitrificación parcial y determinar su máxima capacidad de tratamiento. Tras cada incremento de caudal se mantuvieron las condiciones hasta alcanzar un nuevo estado estacionario evaluando el comportamiento del proceso en detalle.

La Figura 21 (inferior) muestra los resultados obtenidos en este reactor. En la gráfica se indican con una línea roja punteada la separación entre etapas de operación con diferentes caudales de influente, y por tanto, diferentes valores de TRC y TRH. La Tabla 23 muestra los valores de caudal, TRC y TRH con los que se trabajó en cada una de estas fases.

En un principio el caudal se fue aumentando en 0.5 litros/día hasta la fase F. En este momento se intentó un incremento de 1 litro (paso de fase F a G) pero, como se ve en la Figura 21 (inferior), el proceso de nitrificación parcial se desestabilizó y hubo que retornar el caudal a 4.0 l/d (fase H) con lo que la nitrificación se recuperó hasta un 40 %. En la fase I se estableció un caudal intermedio de 4.5 l/d y con éste el sistema se mantuvo en torno a un 40 % de nitrificación parcial. Con estos datos se determinó la máxima capacidad de tratamiento en 4.0 l/d (caudal efluente) o el mínimo TRC en 1.75 d cuando el sistema se opera a 30 °C. Una vez determinada la máxima capacidad de tratamiento se incrementó la temperatura a 35 °C sin variar el caudal de tratamiento. El incremento en la temperatura ocasionó que el rendimiento del proceso aumentara hasta el 50 % habitual. En el siguiente periodo se incrementó el caudal de entrada hasta los 5 l/d y se mantuvo el rendimiento del proceso. Tras el posterior incremento hasta los 5.5 l/d el rendimiento del proceso se redujo hasta el 20 %, con lo que se estableció la máxima capacidad de tratamiento (4.6 l/día de caudal efluente) o el mínimo TRC (1.52 días) con el que puede operarse el sistema a 35 °C.

Fase	Q influente (l/d)	Q efluente (l/d)	T (°C)	TRC (d)	TRH (d)	% oxidación de NH <sub>4</sub>
A	1,5	1,0	30,0	7,00	4,67	±50
B	2,0	1,5	30,0	4,67	3,50	±50
C	2,5	2,1	30,0	3,33	2,80	±50
D	3,0	2,4	30,0	2,92	2,30	±50
E	3,5	2,9	30,0	2,41	2,00	±50
F	4,0	3,4	30,0	2,06	1,75	±50
G	5,0	4,5	30,0	1,56	1,40	±25
H	4,0	3,8	30,0	1,84	1,75	±40
→ I	<b>4,5</b>	<b>4,0</b>	<b>30,0</b>	<b>1,75</b>	<b>1,56</b>	<b>±40</b>
J	4,5	4,0	35,0	1,75	1,56	±50
→ K	<b>5,0</b>	<b>4,6</b>	<b>35,0</b>	<b>1,52</b>	<b>1,40</b>	<b>±50</b>
L	5,5	5,0	35,0	1,40	1,27	±20

Tabla 23. Condiciones de operación en el reactor SHARON R<sub>2</sub> para el estudio de la capacidad máxima de tratamiento del sistema.

A lo largo del tiempo de operación del reactor R<sub>1</sub> se empleó la técnica FISH para poder observar la evolución de las bacterias amonioxidantes en el sistema. Los datos obtenidos demostraron que la población de amonioxidantes pasó de un 7% del total de bacterias en el inóculo a más de un 90% del total cuando se alcanzó el estado estacionario. Este dato confirma que una vez alcanzado el estado estacionario el sistema está formado casi exclusivamente por bacterias amonioxidantes. Durante el seguimiento del reactor R<sub>2</sub> también se empleó la técnica de hibridación *in situ* FISH para identificar y determinar la predominancia de los organismos amonioxidantes en el reactor. El seguimiento microbiológico realizado mediante FISH permitió determinar que los organismos amonioxidantes predominantes en los reactores corresponden a las especies *Nitrosomonas europaea* y *Nitrosomonas eutropha* (sonda de hibridación Nse1472). Esta evaluación se extendió a lo largo de todo el periodo experimental, incluyendo etapas en las que el rendimiento de nitrificación estuvo por debajo del 50%.

La obtención de un cultivo enriquecido en organismos amonioxidantes permitió obtener muestras para experimentar en batch el efecto de diferentes condiciones de temperatura, pH, salinidad, concentraciones de OD, amonio, nitrito, y obtener así los valores de los parámetros del modelo para este grupo de microorganismos sometidos a una corriente con alta concentración de nitrógeno amoniacal y elevada temperatura.

### **3.3 Planta piloto de aguas residuales con eliminación de nutrientes.**

El otro sistema del que se obtuvieron muestras para la calibración de los parámetros de las bacterias involucradas en el proceso de nitrificación fue una planta de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de materia orgánica y nutrientes (fósforo y nitrógeno) a escala piloto.

La planta piloto cuyo fango se ha utilizado en el trabajo experimental de la presente tesis se instaló en la estación depuradora de aguas residuales de la Cuenca del Carraixet (Alboraya, Valencia). Esta depuradora recoge principalmente las aguas residuales domésticas de las poblaciones situadas a lo largo de la Cuenca del Carraixet, incluyendo, así mismo, aguas residuales de tipo industrial.

#### **3.3.1 Descripción de la planta piloto.**

La planta piloto fue diseñada por el grupo de investigación para el estudio del proceso de fangos activados, disponiendo inicialmente de un decantador primario, un reactor biológico de 384 l construido en acero, y un decantador secundario. Con la finalidad de conseguir la eliminación biológica de materia orgánica y nutrientes, se optó por la implantación del esquema UCT (University of Capetown). Según este esquema el reactor biológico de la planta se divide en tres zonas: en la primera se desarrollan condiciones anaerobias, en la segunda anóxicas y en la última condiciones aerobias. Además, el esquema UCT propone tres corrientes de recirculación: una recirculación de fangos del decantador secundario al principio de la zona anóxica (para reducir o eliminar la presencia de nitratos en la zona anaerobia, optimizando la eliminación de fósforo), una recirculación interna desde el final de la zona aerobia al principio de la zona anóxica (que se debe controlar para evitar una acumulación de nitratos en la zona anóxica) y una última recirculación del final de la zona anóxica a la primera parte anaerobia.

Posteriormente, para lograr un comportamiento más estable de la planta piloto, con un diagrama que permitiese un esquema flexible y con posibilidades de variar las condiciones de funcionamiento de cada reactor, se llevaron a cabo unas modificaciones del sistema, sin modificar el esquema UCT, que consistieron básicamente en:

- ✓ Incremento de la capacidad volumétrica de la planta permitiendo aumentar aproximadamente al doble el caudal de alimentación a la misma. El reactor biológico fue ampliado con la incorporación de un tanque de polietileno en línea con, el ya existente, tanque de acero.
- ✓ En este nuevo esquema de operación se suprime el decantador primario y se incorpora un homogeneizador para la entrada de agua a la planta, lo que supuso el cambio de la toma de agua de entrada desde el desarenador al decantador primario de la EDAR del Carraixet.
- ✓ Incorporación de un reactor BABE, para el estudio de la eliminación de nitrógeno amoniacal con y sin dicho reactor. En el estudio experimental de los parámetros de las bacterias llevado a cabo en esta tesis se realizó una calibración con el reactor BABE en funcionamiento y otra posterior calibración en la que el reactor BABE fue suprimido del esquema.

Con estas modificaciones el esquema de operación de la planta piloto era el que se muestra en la Figura 22 junto con alguna fotografía de la misma.

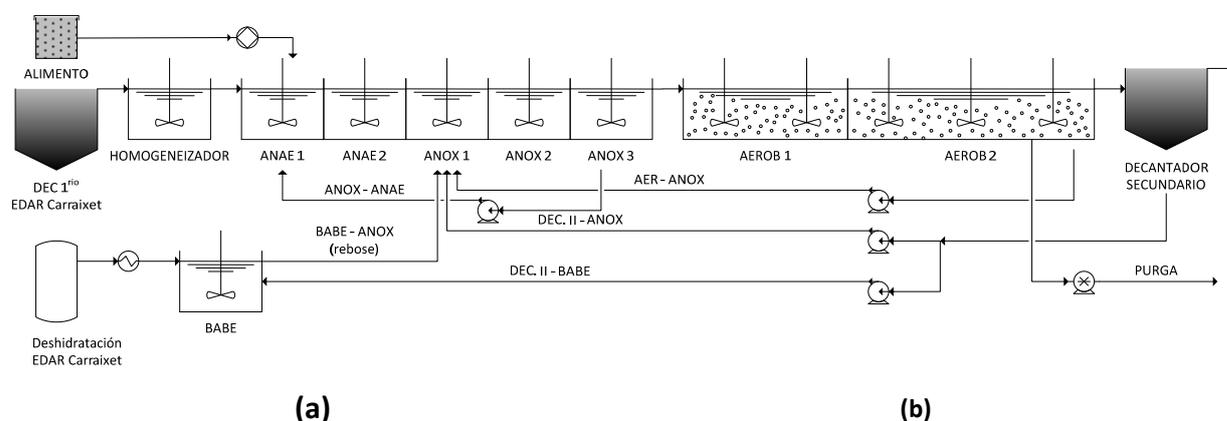


Figura 22. Esquema general y fotografías de la planta piloto con la configuración de operación mantenida durante la fase experimental. (a) Vista frontal, (b) Vista lateral.

El tanque de polietileno estaba dividido en seis secciones por planchas que se ajustaban a los tanques. De estas secciones la primera correspondía al reactor BABE (5 % del volumen total), las dos siguientes funcionaban en condiciones anaerobias (20.1 % del volumen total) y las tres últimas constituían la etapa anóxica (30.0 % del volumen total). Los reactores anaerobios y anóxicos estaban conectados por orificios en las planchas de separación entre estos que permitían la circulación del licor mezcla a lo largo de la planta. Los orificios se situaron en las planchas de manera que no se produjera ningún tipo de cortocircuito hidráulico. El efluente del reactor BABE era recirculado por rebose al primer reactor anóxico.

El tanque de acero fue operado por completo en condiciones aerobias (44.9 % del volumen total). Éste se dividió en dos zonas diferenciadas para evitar la mezcla completa en toda la etapa aerobia: la primera con un volumen del 33 % del total aerobio y una segunda con el 67 % del volumen. El paso del último reactor anóxico al reactor aerobio se realizaba tanto por una conducción en la parte inferior de ambos reactores como por una canaleta de rebose en la parte superior.

Como se ha comentado el influente de la planta piloto se tomaba de la arqueta de salida del decantador primario de la EDAR del Carraixet, con lo cual el agua residual ya había pasado por una etapa de decantación primaria. De esta manera el influente se bombeaba a caudal constante directamente a un homogeneizador desde donde pasaba por rebose al principio de la zona anaerobia de la planta piloto. Además, en el primer reactor anaerobio se adicionaba un caudal constante de una mezcla de ácido acético y fósforo (alimento sintético). Este alimento sintético se añadía para optimizar el rendimiento de eliminación biológica de fósforo y nitrógeno.

Por otro lado, el influente usado para el reactor BABE procedía del proceso de deshidratación de los fangos de la digestión anaerobia de la EDAR. Este agua de deshidratación era almacenada en un depósito de 100 l de capacidad que se reponía cada pocos días y pasaba por un sistema de calefacción, antes de entrar al reactor BABE, para obtener la temperatura aproximada de 35 °C que tiene esta corriente cuando sale del proceso de deshidratación.

El tiempo de retención celular (o edad de fango) se establecía mediante la purga de fangos del sistema. En este esquema de operación la purga se realizaba en el reactor aerobio para conocer de manera más fiable el contenido de sólidos que se extraían del sistema. La purga de fangos se llevaba a cabo mediante una bomba peristáltica.

En la Tabla 24 se detallan las características de operación de la planta piloto durante el periodo experimental en que esta fue operada.

Parámetro	Valor	Unidades
$Q_{\text{entrada}}$	84	l/h
$Q_{\text{BABE}}$ (entrada al reactor BABE)	1.25	l/h
$Q_{\text{Ax-An}}$ (recirculación ultimo anóxico al primer anaerobio)	192	l/h
$Q_{\text{II-Ax}}$ (recirculación dec. Secundario al primer anóxico)	103	l/h
$Q_{\text{II-BABE}}$ (recirculación dec. Secundario al BABE)	5.2	l/h
$Q_{\text{Ae-Ax}}$ (recirculación aerobio al primer anóxico)	111	l/h
$Q_{\text{alimento}}$	0.54	l/h
$V_{\text{total}}$	856	l
$V_{\text{anaerobio}}$	172	l
$V_{\text{anóxico}}$	257	l
$V_{\text{aerobio}}$	384	l
$V_{\text{decantador}}$	80	l
$V_{\text{BABE}}$	43	l
TRH (total con BABE)	10.2	h
TRH (total sin BABE)	9.6	h
TRC (total con BABE)	7	d
TRC (total sin BABE)	6.2	d
$T^{\text{a}}_{\text{general}}$	20	°C
$T^{\text{a}}_{\text{BABE}}$	30	°C

Tabla 24. Caudales empleados y datos de diseño del esquema de operación de la planta piloto.

La agitación de los distintos reactores se llevaba a cabo mediante una serie de agitadores mecánicos de velocidad regulable. La velocidad y el sentido de giro de los agitadores colocados en las zonas anaerobia y anóxica fue fijado de manera que se minimizase la transferencia de oxígeno desde la atmósfera al licor mezcla.

La aireación se realizaba mediante unos difusores situados en el fondo de la zona aerobia del reactor biológico y utilizando una soplante que suministraba el aire a una conducción central. Esta conducción central se dividía en 6 conducciones que repartían el aire a cada una de las parrillas de difusores de la zona aerobia.

### 3.3.2 Equipos de medición de la planta piloto.

La planta piloto disponía de un sistema de muestreo tanto para el agua influente como para el efluente de la misma. Dos bombas de diafragma succionaban agua residual del depósito de homogeneización y del sobrenadante del decantador secundario, respectivamente. El caudal de las bombas era constante para poder obtener una muestra integrada. Las muestras se almacenaban a una temperatura aproximada de 5 °C para asegurar que conservaban sus características.

La planta piloto disponía, además, de una serie de equipamientos auxiliares como sondas de temperatura, pH, potencial redox y conductividad; y equipos de transmisión de datos hacia el ordenador.

En el reactor aerobio se contaba con un sistema de control del oxígeno disuelto (OD). Se disponía de una sonda de OD (EVITA®OXY 4150, DANFOSS) cuya señal era registrada por un programa de adquisición de datos a través del PLC (controlador lógico programable). El valor consigna de concentración de OD en la zona aerobia se había fijado en 2 mg O<sub>2</sub>/l de manera que el sistema de control actuaba sobre un variador de frecuencia (TVERTER, Serie E2) que regulaba el caudal de aire suministrado por una soplante (Siemens Gardner Denver Elmo Tech, Serie G\_200, Tipo 2BH1300).

Por otro lado, la planta disponía de un sistema de control de la temperatura del reactor biológico. El registro se realizaba a través de la sonda de OD, la cual medía también la temperatura del reactor aerobio. A partir de un valor consigna fijado en T=20°C se actuaba sobre una resistencia (220V, 1500W) o un serpentín de refrigeración (EUROKLIMAT, Serie IP, Modelo M10), ambos ubicados en el homogeneizador. Este sistema de control permitía mantener la temperatura de todo el reactor biológico en el valor establecido. Cabe destacar que la planta piloto estaba cubierta externamente con una capa de aislante térmico para minimizar el intercambio de calor con el ambiente.

La concentración de nitratos del reactor aerobio se registraba continuamente a través de una sonda (EVITA®INSITU 5100, DANFOSS). La señal se recogía a través del PLC en el ordenador de la planta piloto. El pH, potencial redox y conductividad se registraba en diferentes reactores de la planta para lograr un mejor seguimiento del proceso. La información suministrada por estas sondas se obtenía mediante un dispositivo de la marca CONSORT. La información se digitalizaba en formato RS-485, que era adquirida por el ordenador mediante la correspondiente tarjeta electrónica.

### **3.3.3 Operación de la planta piloto.**

La planta piloto descrita fue operada durante un periodo de casi 11 meses (del 22/09/08 al 15/08/09) desde que se puso en marcha el reactor BABE (el sistema llevaba operando casi 2 años antes de ser incorporado este nuevo reactor). El reactor BABE se mantuvo funcionando durante los primeros 10 meses (FASE I y FASE II), hasta realizar la calibración de la planta, y posteriormente el sistema estuvo operando durante un mes más sin reactor BABE (FASE III).

Al final de este último periodo se llevó a cabo una nueva calibración de la planta piloto para poder comparar los parámetros obtenidos con y sin reactor BABE.

Durante toda la fase de operación, con y sin reactor BABE, la planta piloto recibía un caudal del sobrenadante de la deshidratación del fangos procedente de la EDAR del Carraixet que suponía una carga extra de amonio que los microorganismos tenían que consumir. Durante las Fases I y II este caudal era recirculado al reactor BABE, mientras que en la Fase III se introducía directamente en el homogeneizador de la planta. El caudal de este sobrenadante se controlaba en un principio para conseguir una carga de amonio equivalente al 5 % del Nitrógeno total ( $N_T$ ) que entraba directamente en la planta piloto desde el decantador primario de la EDAR (la concentración de amonio en el caudal de entrada era de  $\sim 35 \text{ mg N-NH}_4/\text{l}$ ) (Fase I). Posteriormente, como la planta conseguía eliminar todo el amonio que entraba, se aumentó esta carga hasta un 20-25 % del  $N_T$  de la entrada a planta (FASE II y III) para trabajar con un valor de carga de amonio similar al que se obtiene en las EDARs con la recirculación del sobrenadante de la línea de fangos a cabeza de planta.

En la Figura 23 se muestra el seguimiento analítico del amonio y fósforo en el planta piloto a lo largo de todo el periodo experimental que abarcaron las tres fases de operación. Como se puede observar durante los primeros meses de puesta en marcha del reactor BABE se detectaron las mayores fluctuaciones en los porcentajes de eliminación de nutrientes debido a diferentes incidencias en el proceso de operación de la planta. Pero durante los meses que abarcan las fases II y III (fases en las que se llevaron a cabo las calibraciones) la eliminación tanto de amonio como de fósforo, se estabilizó y era prácticamente total.

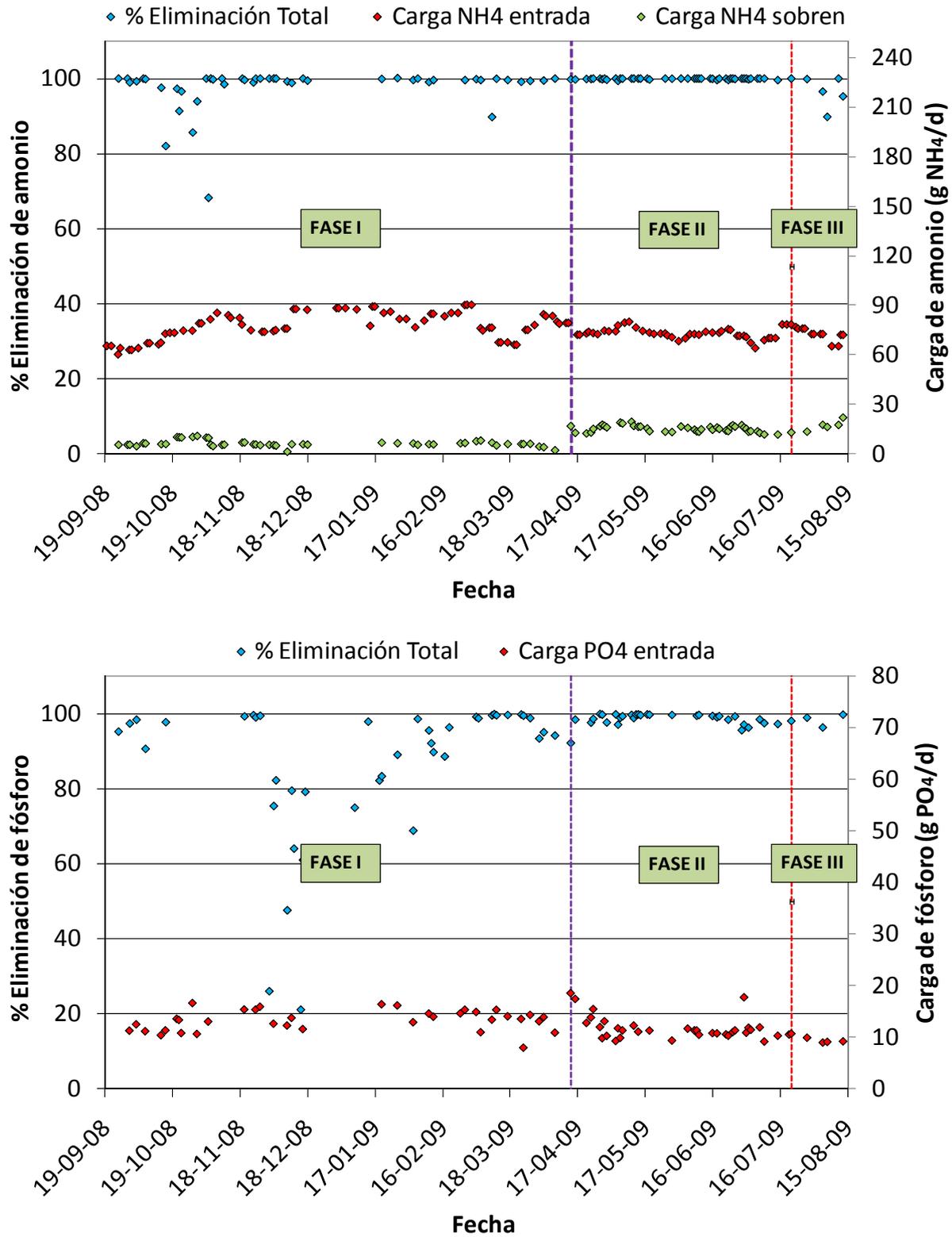


Figura 23. Evolución de la eliminación y las concentraciones de amonio y fósforo en la planta piloto durante el periodo experimental.

La población microbiana del fango de la planta piloto también fue examinada mediante FISH. En este caso, las muestras contenían los dos grupos de bacterias involucradas en el proceso de nitrificación pero, como es evidente, en porcentajes mucho menores que los encontrados en los reactores SHARON operados en el laboratorio (Tabla 25). Hay que destacar que la población de ambos grupos de bacterias se vio favorecida con la instalación del reactor BABE, y cuando éste fue eliminado del esquema de tratamiento los porcentajes de amonioxidantes y nitritoxidantes descendieron considerablemente. Los porcentajes de las bacterias PAO y GAO no presentaron variación al eliminar el reactor BABE de la planta piloto. La población de bacterias amonioxidantes estaba formada casi en su totalidad por *Nitrosomonas oligotropha* (Nmo 218). *Nitrospira spp.* (Nsv443) y *Nitrosococcus mobilis* (Nmv) también se detectaron pero en porcentajes en torno al 1 %. Las especies de nitritoxidantes predominantes eran *Nitrospira* (Ntspa 712) y *Nitrobacter spp* (NIT3).

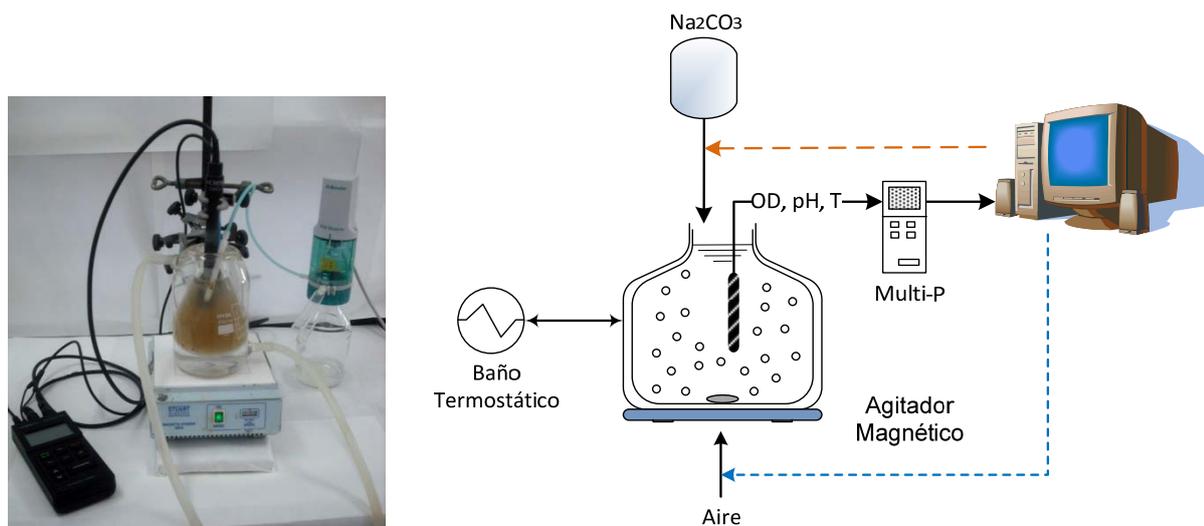
	Planta piloto	
	Con BABE	Sin BABE
<b>% Amonioxidantes</b>	8 ± 2 %	6 ± 1 %
% <i>Nitrosomonas europaea, eutropha, halophila</i>	1 ± 1 %	0 %
% <i>Nitrosomonas oligotropha</i>	6 ± 1 %	4 ± 1 %
% <i>Nitrosococcus mobilis</i>	1 ± 1 %	1 ± 1 %
% <i>Nitrospira spp.</i>	1 ± 1 %	0 %
<b>% Nitritoxidantes</b>	-	-
% <i>Nitrobacter</i>	2 ± 1 %	0 %
% <i>Nitrospirae</i>	6 ± 1 %	2 ± 1 %
<b>% PAOs</b>	23 ± 4 %	24 ± 3 %
<b>% GAOs</b>	10 ± 2 %	10 ± 2 %

Tabla 25. Resultados de análisis de FISH llevado a cabo en la planta piloto.

### 3.4 Descripción del montaje experimental para la calibración de parámetros.

#### 3.4.1 Montaje para experimentos con fango del reactor SHARON.

Para la determinación de los parámetros de las bacterias amonioxidantes del reactor SHARON se diseñaron una serie de ensayos respirométricos que, a excepción de la constante de semisaturación del oxígeno, fueron desarrollados en un montaje experimental independiente del reactor SHARON. Este montaje consistía en un reactor encamisado, aireado y agitado, de 0.3 l de capacidad, equipado con sondas de oxígeno, pH y temperatura (Figura 24).



**Figura 24. Esquema y fotografía del montaje experimental para la determinar los parámetros bacterianos del reactor SHARON.**

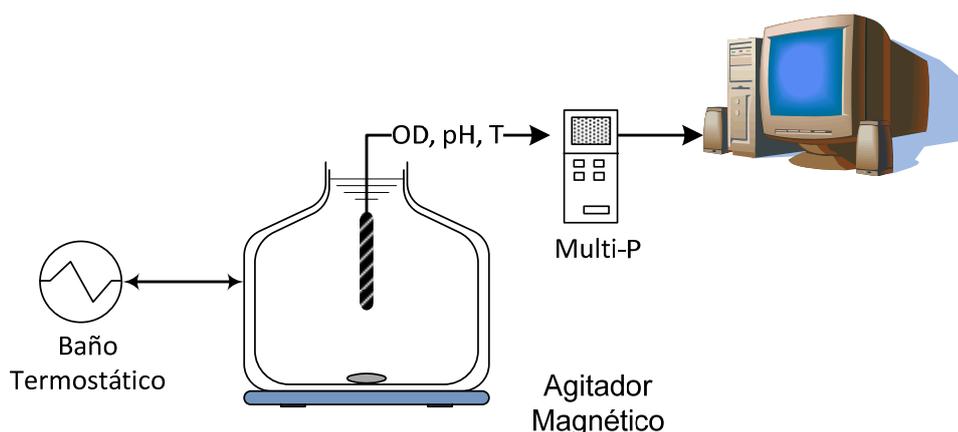
Un programa de ordenador, específicamente diseñado para esta tarea, registra de forma continua los datos de oxígeno disuelto (OD), pH y temperatura. En función de la concentración de oxígeno en el fango se actúa sobre el aireador mediante el apagado o encendido del mismo por medio de un módulo de control a través del puerto paralelo. Este programa de ordenador permite operar el sistema de forma cíclica. Cuando la concentración de OD está por debajo de 2 mg/l, se inicia la aireación hasta que la concentración de OD alcanza el valor máximo de OD establecido (4 mg/l). En este momento se desconecta el aireador provocando una disminución del OD que es consumido por las bacterias. Cuando el valor de OD se encuentra nuevamente por debajo de 2 mg/l se inicia la aireación y comienza un nuevo ciclo. Los datos de OD obtenidos en la etapa en la cual no se airea el reactor se emplean para el cálculo de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR, Oxygen Uptake Rate). De esta forma, a lo largo de cada experimento es posible un registro de la evolución en el tiempo de la OUR.

La mayor parte de los experimentos se realizaron a pH constante. El control del pH se realizó mediante la adición de una base ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), utilizando un dosificador de alta precisión marca Liquino 711, de la firma comercial Metrohm (si se necesitaba descender el pH por debajo del valor de pH al que se encontraba en el reactor  $R_1$  se realizaba adicción manual de ácido (HCl) al comienzo del experimento, pero normalmente el fango procedente de este reactor se encontraba a un pH lo suficientemente bajo). El control de temperatura se realizaba mediante un baño termostático cuyo sistema de control PID aseguraba una gran estabilidad en la temperatura durante todo el ensayo.

### 3.4.2 Montaje para experimentos con fango de la planta piloto.

Los experimentos realizados con fango de la planta piloto para la calibración de los parámetros de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes están basados también en técnicas respirométricas. Para la calibración de parámetros con este fango se utilizó un montaje similar al utilizado en el caso anterior.

Se dispuso un reactor de 0.3 l, termostatzado, con agitación continua y equipado con medición y registro de datos (OD, pH y T). Una de las diferencias con el montaje anterior es que, ya que, durante estos experimentos no se realizó un control de pH no fue necesario el sistema de dosificación de ácido-base. En los experimentos en que se deseaba medir la OUR a un pH determinado, este era fijado mediante adición manual de ácido/base al principio del ensayo. Además al utilizarse una muestra diferente de fango en cada experimento tampoco fue necesario mantener la aireación en el montaje. Con estos cambios el montaje experimental de estos ensayos se simplificó considerablemente.

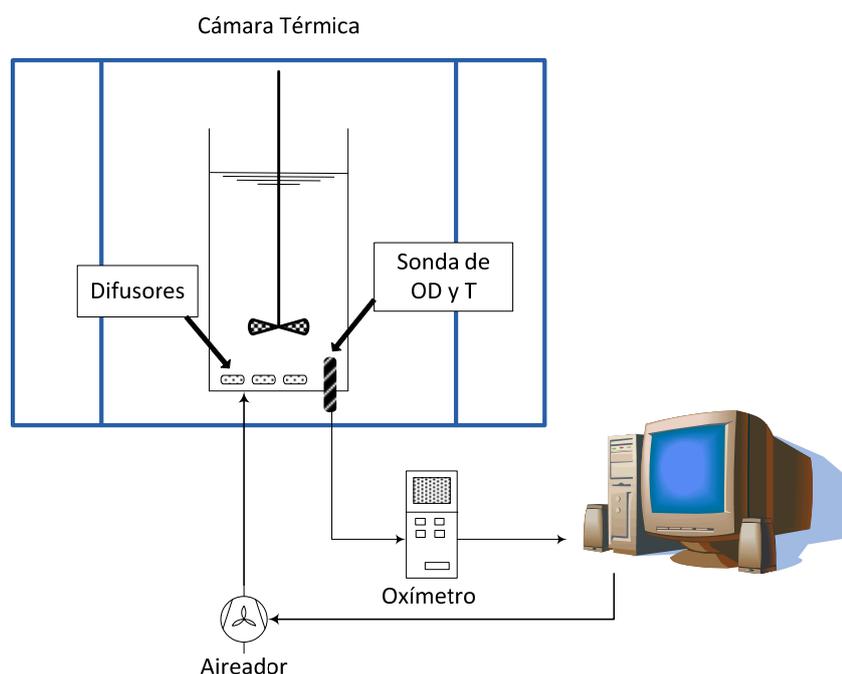


**Figura 25. Esquema del montaje experimental para determinar los parámetros bacterianos del fango de la planta piloto.**

El fango empleado en estos ensayos respirométricos debe encontrarse en condiciones endógenas. En estas condiciones el consumo de oxígeno registrado se debe a la metabolización del sustrato generado por la propia muerte de los microorganismos y no de ningún otro sustrato externo. Al partir de una biomasa en la que una de las poblaciones desarrolladas son las bacterias PAO, además de eliminar todo el sustrato externo que pueda existir, habrá que eliminar las reservas de materia orgánica almacenada intracelularmente como PHA.

Como conclusión a varios ensayos realizados por Peña-roja (1999), si se desea que la biomasa se encuentre en condiciones endógenas, se someterá al fango de la planta piloto a condiciones aerobias durante un periodo de entre 18 a 22 horas si contiene bacterias PAO.

En este mismo periodo, se le añadirá a la biomasa entre 15 y 20 mg P/l. La finalidad de esta adición de fósforo es provocar que las bacterias tomen dicho componente y consuman por completo todas las reservas intracelulares de PHA. Se añade fósforo en cantidad suficiente para que no sea limitante. Se considera que el fango se encuentra en condiciones endógenas cuando la concentración de fósforo permanece constante. Se recomienda no prolongar la fase endógena más de 24 horas, ya que se produce una rotura de las reservas intracelulares de polifosfatos que afectaría a las características de la biomasa. Para alcanzar las condiciones endógenas se utilizó el montaje experimental de la Figura 26.



**Figura 26. Esquema experimental del montaje para fango en condiciones endógenas.**

Este montaje consta de un recipiente de metacrilato cilíndrico de 20 cm de diámetro y 36 cm de alto. El volumen de líquido es de 7 l, el cual se mantiene continuamente agitado y aireado. El agitador empleado es de la marca comercial Heidolph el cual permite trabajar en el intervalo de 45 a 2000 rpm y el suministro de aire se realizó con un aireador de pecera marca Elite. El reactor se encuentra en una cámara térmica que permite mantener la temperatura constante a 20°C, que es la temperatura media de la planta piloto y la temperatura usada en todos los experimentos realizados con este fango. El dispositivo experimental de la Figura 26 permite determinar la OUR del licor mezcla en estudio. El oxígeno disuelto (OD) y la temperatura se registran por medio de la sonda del oxímetro WTW Oxi340. Un programa de ordenador, específicamente diseñado para esta tarea, registra el dato de OD y temperatura cada 5 segundos. Al igual que en el caso del reactor SHARON, la evolución de la OUR se determinó controlando la concentración de oxígeno

disuelto entre 2 y 4 mg/l, gracias a un modulo de control que actúa sobre el encendido-apagado del aireador. Usando las concentraciones de OD en las fases en las que el aireador está desconectado se realizan los cálculos de OUR.

De este montaje se extraían las muestras necesarias para los ensayos respirométricos, pero, aparte de ser utilizado para disponer de fango en condiciones endógenas para los ensayos, también se empleó para la determinación del rendimiento de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes ( $Y_{NH}$  y  $Y_{NO}$ ).



C  
A  
P  
I  
T  
U  
L  
O  
  
4

---

***Modelo matemático del proceso  
de nitrificación en dos etapas.***



## **4 Modelo matemático del proceso de nitrificación en dos etapas.**

### **4.1 Introducción.**

En este capítulo se desarrolla un modelo matemático del proceso de nitrificación considerando las dos etapas que forman dicho proceso. Posteriormente se describe la incorporación del modelo desarrollado al modelo BNRM1 (Biological nutrient removal model No.1). Con esta modificación se obtendrá una representación más ajustada a la realidad de los procesos que tienen lugar en un sistema de fangos activados, permitiendo un mayor conocimiento del proceso de nitrificación ya que se podrá observar de manera independiente el efecto de las condiciones de operación en los dos grupos de bacterias involucradas en el proceso. La incorporación del modelo desarrollado al BNRM1 provocará la división del proceso global de nitrificación en dos procesos: oxidación de amonio a nitrito y oxidación de nitrito a nitrato. Esto conllevará también la separación de las bacterias autótrofas en dos grupos, bacterias amonioxidantes que realizan la primera etapa, y bacterias nitritoxidantes, que oxidan el nitrito generado en la etapa anterior. Con la inclusión del nitrito en el modelo será necesario considerar también el proceso de desnitrificación utilizando el nitrito como aceptor de electrones.

El modelo BNRM1, como otros modelos anteriores, no considera el nitrito como componente principalmente por razones de simplificación y porque no se conoce suficientemente bien el proceso que sufre el nitrito durante la desnitrificación (Kaelin *et al.*, 2009). Por otra parte, a las temperaturas habituales de operación de las EDARs, la velocidad de oxidación del nitrito es mayor que la de oxidación del amonio, y por tanto, es difícil su acumulación en el medio; sin embargo, también hay que tener en cuenta que esta tendencia se invierte a medida que se incrementa la temperatura del medio como se describió en el capítulo de introducción (ver Figura 14 de la página 45).

Existen ocasiones en que, bajo ciertas condiciones ambientales (baja temperatura, pH inferior a 7,...), en las estaciones depuradoras de aguas residuales el nitrito puede llegar a acumularse hasta niveles perjudiciales para el medio receptor del vertido (Fischenetz, 2004). Concentraciones elevadas de nitrito también pueden llegar a causar la inhibición de las bacterias involucradas en el proceso de nitrificación. Esta inhibición se debe a la forma no ionizada de este compuesto ( $\text{HNO}_2$ ) (Anthonisen, 1976; Hellinga, 1999; Pambrun *et al.*, 2006; Magrí, 2007; Van Hulle, 2007). Un modelo que considere las dos etapas del proceso de nitrificación puede ser útil para anticiparse al incremento excesivo de nitrito en el sistema y

corregirlo con cambios en las condiciones de operación del sistema, siendo capaz de predecir los resultados ante modificaciones en las estrategias de control.

#### **4.2 Consideraciones establecidas.**

El primer paso en el desarrollo de un modelo es la definición de los componentes, que son todas aquellas especies que definen el sistema, y los procesos del modelo, es decir, todas aquellas reacciones (físicas, químicas y biológicas) que tienen lugar entre los componentes. Los procesos y componentes considerados en el modelo se determinaron a partir del estudio bibliográfico de las reacciones que componen el proceso de nitrificación, revisión de la que se extrajeron las siguientes consideraciones:

- Ambos grupos de bacterias necesitan condiciones aerobias durante su desarrollo, por lo que se les debe proporcionar un cierto nivel de oxígeno en el medio para poder llevar a cabo los procesos de oxidación.
- Las bacterias amonioxidantes utilizan el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) como sustrato real del proceso de oxidación (Suzuki *et al.*, 1974; Anthonisen *et al.*, 1976; Gapes *et al.*, 2003; Hellinga *et al.*, 1999; Volcke *et al.*, 2006; Van Hulle *et al.*, 2007). Además estas bacterias sufren un proceso de inhibición a elevadas concentraciones de su propio sustrato (Anthonisen *et al.*, 1976; Van Hulle *et al.*, 2004; Wett y Rauch, 2003; Pambrun, 2006).
- Las bacterias nitritoxidantes utilizan el ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) como sustrato en el proceso de oxidación que llevan a cabo (Suzuki *et al.*, 1974; Anthonisen *et al.*, 1976; Gapes *et al.*, 2003; Hellinga *et al.*, 1999; Pambrun *et al.*, 2006; Volcke *et al.*, 2006). Nuevamente se puede detectar cierto grado de inhibición en el crecimiento de las bacterias a elevadas concentraciones de sustrato (Anthonisen *et al.*, 1976; Hellinga *et al.*, 1999; Pambrun *et al.*, 2006; Wett y Rauch, 2003). Además el amonio es un nutriente esencial para cualquier grupo de bacterias en la formación de nueva biomasa.
- Las bacterias amonioxidantes son inhibidas por la forma no ionizada del producto oxidación del amoníaco, el ácido nitroso (Hellinga *et al.*, 1999; Pambrun *et al.*, 2006; Volcke *et al.*, 2006; Van Hulle *et al.*, 2007).
- Las bacterias nitritoxidantes se ven inhibidas por elevadas concentraciones de amoníaco (Anthonisen *et al.*, 1976; Pambrun *et al.*, 2006; Wett y Rauch, 2003).
- Tanto la temperatura como el pH del medio tienen una influencia importante en el desarrollo de ambos grupos de bacterias (Anthonisen *et al.*, 1976; Van Hulle *et al.*, 2007; Magrí *et al.*, 2007).

- El dióxido de carbono es la fuente de carbono de las bacterias en el proceso de anabolismo. Hay estudios que muestran que si la concentración de CO<sub>2</sub> no es suficiente las tasas de crecimiento de ambos grupos de bacterias se pueden ver afectadas (Denecke *et al.*, 2003; Wett y Rauch, 2003) e incluso que se puede estimular el proceso con un incremento del CO<sub>2</sub> en el sistema de aireación (Posso-Blandon, 2005). Sin embargo, por lo general, este componente no es considerado como un factor limitante en los modelos del proceso de nitrificación.

El modelo desarrollado deberá considerar los procesos de crecimiento y lisis de los grupos de bacterias involucrados en el proceso de nitrificación del nitrógeno amoniacal en las aguas residuales (bacterias amonioxidantes y bacterias nitritoxidantes). También deberá incluir el proceso de desabsorción del amoníaco y el dióxido de carbono (no se podrá asumir el equilibrio en estos procesos (Merkel y Krauth, 1999), ya que están controlados por la resistencia al transporte de materia de la fase líquida) y los procesos de disociación ácido-base que afectan a las especies del modelo desarrollado (en estos procesos se asumirá condiciones de equilibrio químico instantáneo (Serralta *et al.*, 2004)).

#### **4.2.1 Componentes del modelo.**

Tras toda la revisión bibliográfica previa al desarrollo del modelo se concluyó que para representar el proceso de nitrificación en dos etapas el modelo contará con un total de 11 componentes, incluyendo dos grupos de bacterias (Tabla 26).

COMPONENTE	UNIDADES
<b>Bacterias Amonioxidantes (<math>X_{NH}</math>).</b> Grupo de bacterias autótrofas responsables de la transformación del amonio en nitrito.	$\rightarrow M_{DQO}/L^3$
<b>Bacterias Nitritoxidantes (<math>X_{NO}</math>).</b> Grupo de bacterias autótrofas responsables de la transformación del nitrito en nitrato.	$\rightarrow M_{DQO}/L^3$
<b>Materia orgánica suspendida inerte (<math>X_I</math>).</b> Este material no se puede degradar. Puede ser una fracción del influente o puede producirse dentro del proceso de lisis (muerte celular).	$\rightarrow M_{DQO}/L^3$
<b>Materia orgánica suspendida lentamente biodegradable (<math>X_S</math>).</b> Es un sustrato orgánico particulado y coloidal de alto peso molecular que necesita ser hidrolizado antes de estar disponible para la degradación. Se genera tras la muerte de las bacterias.	$\rightarrow M_{DQO}/L^3$
<b>Amonio (<math>S_{TAN}</math>).</b> TAN (Total Ammonium Nitrogen). Amonio más amoníaco. Este componente se consume en el proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes, pero también es utilizado como nutriente por el resto de bacterias.	$\rightarrow M_N/L^3$
<b>Nitrito (<math>S_{TNO2}</math>).</b> TNO2 (Total Nitrite Nitrogen). Nitrito más el ácido nitroso. Este componente se genera por oxidación del amonio en el crecimiento de las bacterias amonioxidantes y se consume en los procesos de desnitrificación (no incluidos en el modelo) y en el crecimiento de las bacterias nitritoxidantes.	$\rightarrow M_N/L^3$
<b>Nitrato (<math>S_{TNO3}</math>).</b> Este componente se genera por oxidación del nitrito en el crecimiento de las bacterias nitritoxidantes y se consume en los procesos de desnitrificación (no incluidos en el modelo).	$\rightarrow M_N/L^3$
<b>Oxígeno (<math>S_{O2}</math>).</b> Oxígeno disuelto.	$\rightarrow M_{O2}/L^3$
<b>Fosfatos (<math>S_{PO4}</math>).</b> Fósforo soluble inorgánico necesario para el crecimiento bacteriano.	$\rightarrow M_P/L^3$
<b>Carbono inorgánico (<math>S_{IC}</math>).</b> Representa la concentración de todas las especies que forman el sistema ácido-base del carbonato (carbonato, bicarbonato y ácido carbónico). El $H_2CO_3$ en agua se encuentra fundamentalmente en forma de $CO_2$ , por lo que su concentración también está incluida en este componente.	$\rightarrow mol_C/L^3$
<b>Total de protones (<math>S_H</math>).</b> Es la suma de los protones libres más los contenidos en el resto de especies.	$\rightarrow mol_H/L^3$

Tabla 26. Componentes del modelo de nitrificación en dos etapas.

#### 4.2.2 Procesos del modelo.

Los procesos considerados en el modelo desarrollado se pueden dividir en:

$\rightarrow$  *Procesos gobernados por la cinética.* Tienen una velocidad determinada, y se calculan a partir de las ecuaciones de balance de materia. Las ecuaciones diferenciales obtenidas se integran con respecto al tiempo para obtener la variación de las concentraciones de los componentes en función del tiempo. Los procesos considerados son:

1. Crecimiento de bacterias amonioxidantes
2. Lisis de bacterias amonioxidantes
3. Crecimiento de bacterias nitritoxidantes
4. Lisis de bacterias nitritoxidantes
5. Desabsorción de  $\text{NH}_3$
6. Desabsorción de  $\text{CO}_2$

→ *Procesos gobernados por el equilibrio.* Los procesos de disociación ácido-base, al contrario que los anteriores, se asume que ocurren instantáneamente, y se calculan mediante algoritmos basados en el equilibrio químico. El grado de disociación de cada componente depende del pH, de la temperatura y de la fuerza iónica, y se puede considerar un estado más que un proceso.

7. Equilibrio ácido-base  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$
8. Equilibrio ácido-base  $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$
9. Equilibrios ácido-base  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$

La Figura 27 muestra un diagrama que describe las relaciones existentes entre los componentes y los procesos involucrados en el modelo.

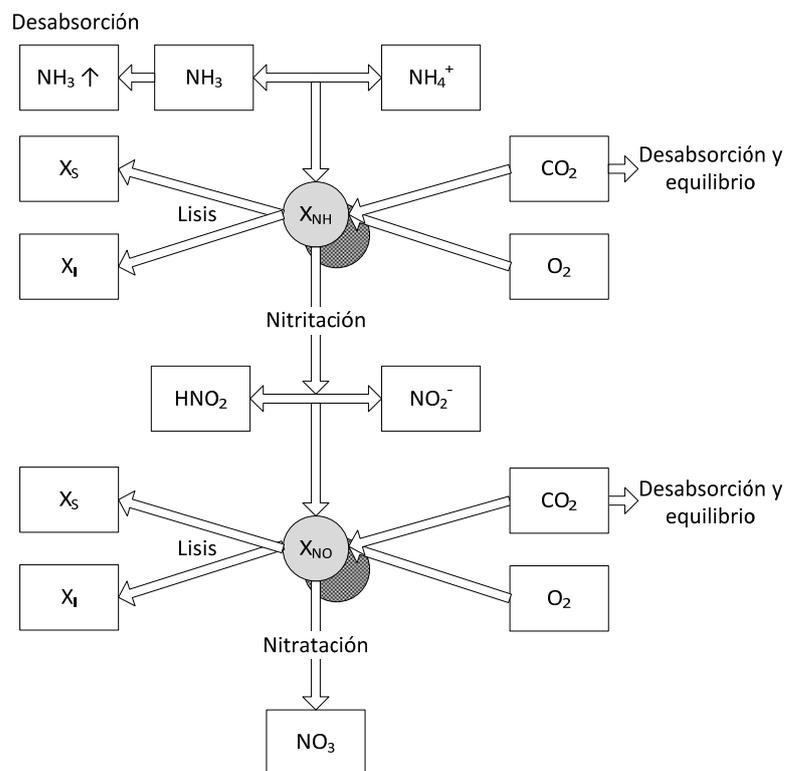


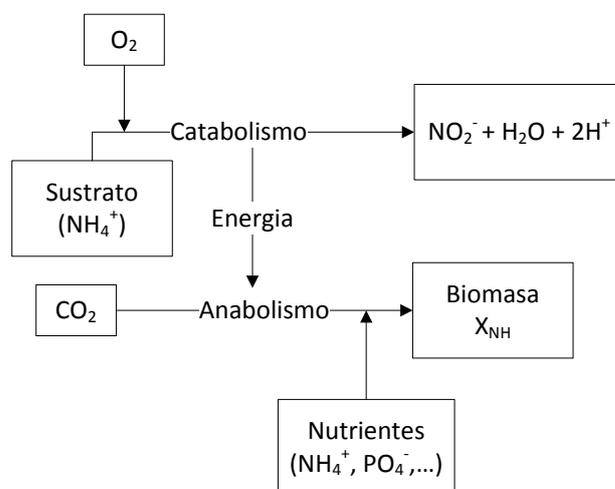
Figura 27. Diagrama de los procesos y componentes involucrados en el modelo del proceso de nitrificación en dos etapas.

A continuación, se deducen los coeficientes estequiométricos de cada uno de estos procesos aplicando las ecuaciones de continuidad para los diferentes componentes existentes en el modelo, y se examinan las expresiones cinéticas de cada uno de ellos.

**Crecimiento de bacterias amonioxidantes.**

Tal y como se ha comentado la nitrificación es el primer paso del proceso de nitrificación y describe la oxidación biológica del amonio a nitrito. La biomasa encargada de este proceso (bacterias amonioxidantes,  $X_{NH}$ ) prefiere la forma no ionizada, amoníaco ( $NH_3$ ), como sustrato ya que las especies ionizadas no son fácilmente transportadas a través de la membrana (Suzuki *et al*, 1974; Anthonisen *et al.*, 1976; Gapes *et al.*, 2003). Sin embargo, desde el punto de vista de la modelación, algunos autores incluyen el componente TAN ( $NH_4^+ + NH_3$ ) como sustrato del proceso por simplificación, ya que dicho componente es mucho más fácil de medir y de calcular que el amoníaco. Así pues la elección entre la forma ionizada ( $NH_4^+$ ) y no ionizada ( $NH_3$ ) como sustrato a incluir en las ecuaciones del modelo dependerá de la posibilidad de determinar las concentraciones de estos componentes. En el caso del modelo desarrollado en la presente tesis se ha incluido el  $NH_3$  como sustrato en la ecuación cinética del proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes, ya que al incluir los equilibrios ácido-base el modelo permite el cálculo del pH y con este la concentración de amoníaco en el medio.

En el proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes, como para cualquier grupo de bacterias, hay que considerar tanto el proceso de catabolismo como de anabolismo (Figura 28), a partir de los cuales se podrá definir la estequiometría del proceso.



**Figura 28. Diagrama de los procesos de catabolismo y anabolismo en el crecimiento de las bacterias amonioxidantes.**

Para determinar los coeficientes estequiométricos se define la constante estequiométrica *Rendimiento celular (Y)*, que es una relación entre la biomasa formada y la cantidad de sustrato consumido en el crecimiento de ésta. Para el caso de las bacterias amonioxidantes este rendimiento viene dado por:

$$Y_{NH} = \frac{\text{Biomasa formada (g DQO)}}{\text{Amonio nitrificado (g N - NH}_4^+)}$$
Ec.- 49

A partir de este coeficiente se puede concluir que por cada gramo de biomasa formada (medida como DQO) se oxida  $\frac{1}{Y_{NH}}$  gramos de amonio (medidos como N) y por tanto se produce  $\frac{1}{Y_{NH}}$  gramos de nitrito (medidos como N).

Aplicando las correspondientes ecuaciones de continuidad para el nitrógeno, DQO y carbono se obtiene el resto de coeficientes estequiométricos de los distintos componentes. En el balance de nitrógeno hay que tener en cuenta que el amonio es asimilado como nutriente además de oxidado como sustrato para la obtención de energía. La Tabla 28 de la página 138 muestra la matriz estequiométrica del modelo completo donde se pueden ver los parámetros del proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes obtenidos tras la aplicación de las ecuaciones de continuidad.

La cinética del proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes fue establecida teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- El amoníaco es el sustrato del proceso pero también puede llegar a inhibir la actividad de las bacterias con lo que se ha decidido utilizar la combinación de la cinética de Monod con la de inhibición no competitiva.
- El producto de la oxidación del amoníaco, el ácido nitroso, puede inhibir al propio proceso. La inhibición del proceso por elevadas concentraciones de este compuesto se ha representado mediante la cinética de inhibición no competitiva.
- La necesidad de utilizar fósforo como nutriente para el desarrollo de las bacterias se ha considerado mediante la cinética de Monod.
- La inhibición de la actividad de las bacterias a valores altos y bajos de pH en principio venía representado por la combinación de la cinética de Monod y la de inhibición no competitiva tal y como muestra la siguiente ecuación:

$$I_{pH} = \frac{S_H}{K_H + S_H} \cdot \frac{K_{IH}}{K_{IH} + S_H} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad \text{Ec.- 50}$$

$K_H, K_{IH}$  = constantes de inhibición por pH bajo y alto, respectivamente (mol  $H^+$ /l).

$f(pH_{opt})$  = valor de la función  $\left(\frac{S_H}{K_H+S_H} \cdot \frac{K_{IH}}{K_{IH}+S_H}\right)$  cuando el pH es óptimo. Se emplea este valor para normalizar la función de inhibición por pH de forma que la velocidad en condiciones óptimas sea la que se mide.

La inhibición por pH descrita por esta expresión es una inhibición simétrica a ambos lados del pH óptimo de crecimiento. Sin embargo, tal y como se explicará posteriormente en los resultados, durante las experiencias realizadas para la calibración de los parámetros del modelo de las bacterias amonioxidantes se observó que la inhibición por pH en estas bacterias es diferente a pH altos y a pH bajos (ver Figura 53, página 196). Esto llevó a plantear una nueva expresión de inhibición para dichas bacterias, de manera que permitiese mejorar el ajuste entre las simulaciones realizadas y los datos experimentales obtenidos. La expresión establecida para su incorporación al proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes ha sido la siguiente:

$$I_{pH} = \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad \text{Ec.- 51}$$

En esta nueva 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. Con esta nueva expresión se ha conseguido una función asimétrica que permite representar grados de inhibición a diferentes pH superiores e inferiores al óptimo.

La Ec.- 52 muestra la cinética establecida para proceso de crecimiento de las bacterias.

$$r_1 = \mu_{NH} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_{I,NH_3}}{S_{NH_3} + K_{I,NH_3}} \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{S_{PO_4} + K_{PO_4}} \cdot I_{pH} \cdot X_{NH} \quad \text{Ec.- 52}$$

$K_{O_2}$  = constante de semisaturación de oxígeno (mg  $O_2$ /l)

$K_{NH_3}$  = constante de semisaturación de amoníaco (mg N- $NH_3$ /l)

$K_{I,NH_3}$  = constante de inhibición de amoníaco (mg N- $NH_3$ /l)

$K_{I,HNO_2}$  = constante de inhibición de ácido nitroso (mg N- $HNO_2$ /l)

$K_{PO4}$  = constante de afinidad de fosfato como nutriente (mg P- $PO_4$ /l)

$X_{NH}$  = biomasa bacterias amonioxidantes (mg DQO/l)

$\mu_{NH}$  = tasa máxima de crecimiento de las bacterias amonioxidantes ( $d^{-1}$ )

$f(S_{NH_3}^{opt})$  = valor de la función  $\left( \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_{I,NH_3}}{S_{NH_3} + K_{I,NH_3}} \right)$  cuando la biomasa se encuentra sometida a una concentración de sustrato óptima. Se emplea este valor para normalizar la función del sustrato de forma que la velocidad en condiciones óptimas de concentración de  $NH_3$  sea la que se mide.

### **Lisis de bacterias amonioxidantes.**

Durante el proceso de lisis de las bacterias se genera materia orgánica suspendida inerte ( $X_I$ ) y lentamente biodegradable ( $X_S$ ). Para definir la estequiometría de este proceso de lisis se define una nueva constante,  $f_{X_I}$ , que representa la fracción de  $X_I$  generada por unidad de biomasa. La estequiometría del proceso se puede observar en la Tabla 28 (página 138).

La cinética del proceso de lisis tiene la forma característica de cualquier proceso de lisis bacteriana:

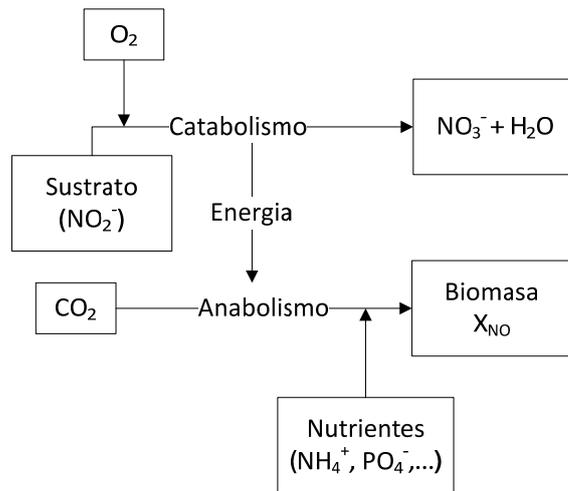
$$r_2 = b_{NH} \cdot X_{NH} \quad \text{Ec.- 53}$$

Donde  $b_{NH}$  = tasa de lisis de  $X_{NH}$  ( $d^{-1}$ ).

### **Crecimiento de bacterias nitritoxidantes.**

En el segundo paso de la nitrificación biológica, nitratación, se lleva a cabo la oxidación del nitrito a nitrato, proceso realizado por las bacterias nitritoxidantes ( $X_{NO}$ ). En este proceso las bacterias utilizan como sustrato la forma no ionizada (ácido nitroso en lugar de nitrito) porque es más fácil de transportar a través de la membrana (Suzuki *et al.*, 1974; Anthonisen *et al.*, 1976; Gapes *et al.*, 2003). Pero al igual que en el proceso de nitrificación, existen modelos donde se incluye el TNO2 ( $NO_2 + HNO_2$ ) como sustrato de las bacterias ya que este es el componente que se puede medir y calcular más fácilmente.

El proceso de crecimiento de las bacterias nitritoxidantes puede representarse como:



**Figura 29. Diagrama de los procesos de catabolismo y anabolismo en el crecimiento de las bacterias nitritoxidantes.**

Al igual que en el caso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes se define un rendimiento celular como:

$$Y_{NO} = \frac{\text{Biomasa formada (g DQO)}}{\text{Nitrito oxidado (g N - NO}_2^-)} \quad \text{Ec.- 54}$$

Este coeficiente indica que por cada gramo de biomasa formada (medida como DQO) se oxidan  $\frac{1}{Y_{NO}}$  gramos de nitrito (medidos como N) y se producen  $\frac{1}{Y_{NO}}$  gramos de nitrato (medidos como N).

El nitrito no es incorporado a la biomasa como nutriente, sólo es utilizado como sustrato en el proceso de oxidación. El amonio es la fuente de nitrógeno que las bacterias utilizan en el proceso de anabolismo. Teniendo en cuenta lo anterior y aplicando las ecuaciones de continuidad de carbono y DQO se obtienen todos los coeficientes estequiométricos del proceso que se puede ver en la Tabla 28, página 138.

La cinética del proceso de crecimiento de las bacterias nitritoxidantes fue definida teniendo en cuenta los aspectos que se detallan a continuación:

- El ácido nitroso es el sustrato del proceso y a la vez puede llegar a inhibir a las bacterias nitritoxidantes, por ello se ha combinado la cinética de Monod con la de inhibición no competitiva.

- La inhibición del proceso por elevadas concentraciones de amoníaco se ha representado mediante la cinética de inhibición no competitiva.
- El amonio y el fósforo como nutrientes para el desarrollo de las bacterias se ha considerado mediante la cinética de Monod en ambos casos.
- La inhibición de la actividad de las bacterias a valores altos y bajos de pH se ha representado con la misma función descrita en el crecimiento de amonioxidantes (Ec.- 51, página 130).

La ecuación cinética del proceso establecida ha sido la siguiente:

$$r_3 = \mu_{NO} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot \frac{S_{HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{HNO_2}} \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \cdot \frac{K_{I,NH_3}}{S_{NH_3} + K_{I,NH_3}} \cdot \frac{S_{NH_4}}{S_{NH_4} + K_{NH_4}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{S_{PO_4} + K_{PO_4}} \cdot I_{pH} \cdot X_{NO} \quad \text{Ec.- 55}$$

$K_{O_2}$  = constante de semisaturación de oxígeno (mg  $O_2$ /l)

$K_{HNO_2}$  = constante de semisaturación de ácido nitroso (mg N- $HNO_2$ /l)

$K_{I,HNO_2}$  = constante de inhibición de ácido nitroso (mg N- $HNO_2$ /l)

$K_{I,NH_3}$  = constante de inhibición de amoníaco (mg N- $NH_3$ /l)

$K_{NH_4}$  = constante de afinidad de amonio como nutriente (mg N- $NH_4$ /l)

$K_{PO_4}$  = constante de afinidad de fosfato como nutriente (mg P- $PO_4$ /l)

$X_{NO}$  = biomasa bacterias nitritoxidantes (mg DQO/l)

$\mu_{NO}$  = tasa máxima de crecimiento de las bacterias nitritoxidantes ( $d^{-1}$ )

$f(S_{HNO_2}^{opt})$  = valor de la velocidad de consumo de oxígeno medida cuando la biomasa se encuentra sometida a una concentración de sustrato óptima. Se emplea este valor para normalizar la función del sustrato de forma que la velocidad en condiciones óptimas de concentración de  $HNO_2$  sea la que se mide.

#### **Lisis de bacterias nitritoxidantes.**

En el proceso de lisis la estequiometría y cinética es similar al proceso de lisis del primer grupo de bacterias (ver Tabla 28, página 138).

$$r_4 = b_{NO} \cdot X_{NO} \quad \text{Ec.- 56}$$

Donde:

$f_{X_i}$  = fracción de  $X_i$  generada por unidad de biomasa.

$b_{NO}$  = tasa de lisis de  $X_{NO}$  ( $d^{-1}$ ).

### **Desabsorción de amoníaco y ácido carbónico.**

El amoníaco se caracteriza por su alta solubilidad en agua, reaccionando con ella, por lo que se forman dos iones, uno de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y otro de hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ). Las proporciones de amoníaco libre y de ión amonio en un medio acuoso dependen del pH y de la temperatura del agua. El proceso de desabsorción de amoníaco es importante solamente cuando se trabaja con valores de pH particularmente altos, ya que las proporciones de amoníaco son mínimas cuando el pH del medio es bajo. Para valores de pH en torno a la neutralidad, la desabsorción de amoníaco no tiene ningún efecto importante, debido a que a este pH el equilibrio se encuentra casi totalmente desplazado hacia la forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) y la cantidad de amoníaco es muy baja.

En el caso de la desabsorción del dióxido de carbono siempre hay que considerarla porque afecta al pH del medio. El  $\text{CO}_2$  es muy soluble en el agua, dando lugar a la formación de ácido carbónico que aumenta el pH. El ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) a su vez se disocia proporcionando dos tipos de sales: bicarbonatos ( $\text{HCO}_3^-$ ) y carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), además de los protones. La concentración de cada una de estas especies en el medio acuoso dependerá del pH al que se encuentre.

La expresión cinética de estos procesos de desabsorción viene dada por las siguientes ecuaciones:

$$r_5 = KLa_{\text{NH}_3} \cdot (S_{\text{NH}_3} - S_{\text{NH}_3}^*) \quad \text{Ec.- 57}$$

$$r_6 = KLa_{\text{CO}_2} \cdot (S_{\text{CO}_2} - S_{\text{CO}_2}^*) \quad \text{Ec.- 58}$$

Donde:

$KLa_x$  = coeficiente de transferencia ( $\text{min}^{-1}$ )

$S_x$  = concentración (mg/l)

$S_x^*$  = concentración de saturación (mg/l). La concentración de saturación de depende de la fracción másica del gas en la fase gaseosa, y ya que la concentración de amoníaco en el aire es prácticamente nula se puede asumir que  $S_{\text{NH}_3}^* = 0$ .

Los valores de los coeficientes de transferencia se obtienen utilizando la ecuación propuesta por Merkel y Krauth (1999) para el cálculo del coeficiente de transferencia de un gas conocido el de otro:

$$\frac{KLa_x}{KLa_{xbase}} = \sqrt{\frac{D_x}{D_{xbase}}}$$

Siendo  $D_x$  la difusividad del gas ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) del cual se desconoce el coeficiente de transferencia ( $KLa_x$ ) y  $D_{xbase}$  la difusividad del gas ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) usado como referencia. La difusividad de un gas depende de la temperatura y viscosidad del agua, además del volumen molar del gas en cuestión.

El modelo biológico proporciona las necesidades de oxígeno para mantener la concentración deseada. Conocidas estas necesidades se puede calcular el  $KLa$  del oxígeno mediante la siguiente ecuación:

$$M_{O_2} = KLa \cdot V \cdot (S_{O_2} - S_{O_2}^*)$$

Donde:

$KLa$  = coeficiente de transferencia del oxígeno ( $\text{min}^{-1}$ )

$M_{O_2}$  = necesidades de oxígeno ( $\text{mg}/\text{min}$ )

$V$  = volumen del reactor (l)

$S_{O_2}$  = concentración de oxígeno en el reactor ( $\text{mg}/\text{l}$ )

$S_{O_2}^*$  = concentración de saturación de oxígeno ( $\text{mg}/\text{l}$ )

#### **Procesos de disociación ácido-base.**

Como se ha comentado, dado que el sustrato de las bacterias son las formas no ionizadas ( $\text{NH}_3$  y  $\text{HNO}_2$ ) y que estas especies son también las que inhiben a estas bacterias es necesario considerar en el modelo los equilibrios de estos componentes para poder tenerlos en cuenta en las expresiones cinéticas y calcular sus concentraciones. Además, como el pH del medio es determinante tanto en el desarrollo de las bacterias como en la concentración del sustrato utilizado por éstas, se debe considerar en el modelo las reacciones ácido-base que influyen en el valor del pH del medio. A continuación se detallan dichas reacciones:



En la Tabla 27 se muestran las ecuaciones a incluir en el modelo para tener en cuenta las reacciones ácido-base descritas.

$$\begin{aligned}
 \{H^+\} \cdot \{OH^-\} &= 10^{-13.998} \\
 \frac{\{H^+\} \cdot \{NH_3\}}{\{NH_4^+\}} &= 10^{-9.252} \\
 \frac{\{H^+\} \cdot \{NO_2^-\}}{\{HNO_2\}} &= 10^{3.15} \\
 \frac{\{HCO_3^-\}}{\{H^+\} \cdot \{CO_3^{2-}\}} &= 10^{10.33} \\
 \frac{\{H_2CO_3\}}{\{H^+\} \cdot \{CO_3^{2-}\}^2} &= 10^{16.681} \\
 [H^+] + [HCO_3^-] + 2 \cdot [H_2CO_3^-] - [OH^-] - [NH_3] - [NO_2^-] &= H_T \\
 [NH_4^+] + [NH_3] &= NH_T \\
 [NO_2^-] + [HNO_2] &= NO_T \\
 [CO_3^{2-}] + [HCO_3^-] + [H_2CO_3^-] &= C_T
 \end{aligned}$$

Tabla 27. Ecuaciones del modelo desarrollado para los procesos de disociación (valores a 20°C).

#### 4.2.3 Dependencia con la temperatura.

Como se ha comentado, la temperatura del medio donde se desarrollan las bacterias tiene una gran influencia sobre la actividad de éstas, por lo que hay que considerar en el modelo alguna función para tener en cuenta dicho efecto.

La influencia de la temperatura en la actividad biológica generalmente es incluida en el modelo matemático mediante una ecuación empírica que deriva de la relación de Van't Hoff-Arrhenius:

$$\mu(T) = \mu(T_r) \cdot \theta^{(T-T_r)} \quad \text{Ec.- 63}$$

Donde  $\mu(T)$  es la tasa máxima de crecimiento a la temperatura  $T$ ,  $T_r$  es la temperatura de referencia (generalmente se considera una temperatura de 20 °C) y  $\theta$  es la constante de Arrhenius. Aunque el uso de la ecuación de Arrhenius está muy extendido no puede describir el descenso de la actividad bacteriana a temperaturas elevadas. Por ello, se han propuesto otras funciones para describir el efecto de la temperatura que, aunque no tienen una base biológica, se ajustan mejor al proceso de inhibición de las bacterias por temperaturas extremas. Una de estas funciones es el modelo modificado de Ratkowsky (Zwietering M.H., *et al.*, 1991), definido como:

$$\mu(T) = [b \cdot (T - T_{min})]^2 \cdot [1 - e^{c \cdot (T - T_{max})}] \quad \text{Ec.- 64}$$

Donde los parámetros  $T_{min}$  y  $T_{max}$  son las temperaturas mínima y máxima a las cuales se observa crecimiento de las bacterias. Las constantes  $b$  y  $c$  son dos parámetros sin fundamento biológico.

#### **4.3      *Resumen del modelo de nitrificación en dos etapas desarrollado.***

La Tabla 28 muestra la matriz estequiométrica de los procesos considerados en el modelo. Las expresiones cinéticas utilizadas para representar la velocidad de los distintos procesos se muestran en la Tabla 29.

Componente → Proceso ↓	$S_{O_2}$	$S_{TAN}$	$S_{TN_2O}$	$S_{NO_3}$	$S_{PO_4}$	$S_{IC}$	$S_H$	$X_{NH}$	$X_{NO}$	$X_I$	$X_S$
<b>Crecimiento de <math>X_{NH}</math></b>	$-\left(\frac{3.43 - Y_{NH}}{Y_{NH}}\right)$	$-\left(\frac{1}{Y_{NH}} + i_{NBM}\right)$	$\frac{1}{Y_{NH}}$		**	$-i_{CBM}$	**	1			
<b>Lisis de <math>X_{NH}</math></b>		**			**	**	**	-1		$f_{XI}$	$(1 - f_{XI})$
<b>Crecimiento de <math>X_{NO}</math></b>	$-\left(\frac{1.14 - Y_{NH}}{Y_{NH}}\right)$	$-i_{NBM}$	$-\left(\frac{1}{Y_{NO}}\right)$	$\frac{1}{Y_{NO}}$	**	$-i_{CBM}$	**		1		
<b>Lisis de <math>X_{NO}</math></b>		**			**	**	**		-1	$f_{XI}$	$(1 - f_{XI})$
<b>Desabsorción de <math>NH_3</math></b>		-1					$\frac{1}{1000}$				
<b>Desabsorción de <math>CO_2</math></b>							$\frac{-2}{1000}$				

\*\* El coeficiente estequiométrico se calcula aplicando la ecuación de continuidad correspondiente. Las ecuaciones de continuidad son el equivalente matemático del principio de conservación de la masa en las reacciones químicas.

Tabla 28. Matriz estequiométrica de los procesos del modelo desarrollado.

Proceso	Cinética
<b>Crecimiento de <math>X_{NH}</math></b>	$r_1 = \mu_{NH} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_{I,NH_3}}{S_{NH_3} + K_{I,NH_3}} \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{S_{PO_4} + K_{PO_4}} \cdot I_{pH} \cdot X_{NH}$
<b>Lisis de <math>X_{NH}</math></b>	$r_2 = b_{NH} \cdot X_{NH}$
<b>Crecimiento de <math>X_{NO}</math></b>	$r_3 = \mu_{NO} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot \frac{S_{HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{HNO_2}} \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \cdot \frac{K_{I,NH_3}}{S_{NH_3} + K_{I,NH_3}} \cdot \frac{S_{NH_4}}{S_{NH_4} + K_{NH_4}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{S_{PO_4} + K_{PO_4}} \cdot I_{pH} \cdot X_{NO}$
<b>Lisis de <math>X_{NO}</math></b>	$r_4 = b_{NO} \cdot X_{NO}$
<b>Desabsorción de <math>NH_3</math></b>	$r_5 = KLa_{NH_3} \cdot (S_{NH_3} - S_{NH_3}^*)$
<b>Desabsorción de <math>CO_2</math></b>	$r_6 = KLa_{CO_2} \cdot (S_{CO_2} - S_{CO_2}^*)$

Tabla 29. Expresiones cinéticas de los procesos del modelo.

#### 4.4 Incorporación del modelo desarrollado al modelo BNRM1.

Una de las finalidades del desarrollo del modelo de la presente tesis era su posterior incorporación al modelo BNRM1 que se encuentra implementado en el programa DESASS. De esta forma se podrá realizar una simulación más completa de todos los procesos que forman parte de una estación de depuración de aguas residuales.

En este apartado se describen los cambios que se han realizado al modelo BNRM1 para incorporar el modelo de nitrificación en dos etapas que se ha desarrollado en los apartados anteriores. Fueron necesarias las siguientes modificaciones:

- ✓ **Nuevos componentes.** Por un lado se separó las bacterias autótrofas en dos grupos de bacterias: Amoniooxidantes y Nitritoxidantes. El modelo BNRM1 consideraba el proceso de nitrificación como un único proceso de oxidación del amonio a nitrato, llevado a cabo por un grupo de bacterias autótrofas. Con la incorporación del proceso de nitrificación en dos etapas, se distinguen las dos fases de la nitrificación y por tanto se diferencia entre dos grupos de bacterias autótrofas. Además, se incluye el nitrito como nuevo componente del modelo. En el modelo BNRM1 el componente  $S_{NO_3}$  suponía la suma del nitrito y nitrato, al dividir la nitrificación en dos etapas el nitrito aparece como sustrato de un grupo de bacterias y por ello hay que considerarlo separadamente del nitrato.
- ✓ **Nuevos procesos cinéticos.** Aparte del crecimiento y lisis de las bacterias amoniooxidantes y nitritoxidantes, es necesario incorporar los procesos de crecimiento de las bacterias heterótrofas en condiciones anóxicas utilizando nitrito como aceptor de electrones. Dado que en el modelo BNRM1 no se consideraba el nitrito como un componente, solo se modelaba el crecimiento anóxico usando el nitrato como aceptor de electrones. Con la inclusión del nitrito como componente del modelo hay que tener en cuenta también su utilización por parte de las bacterias heterótrofas. Otro proceso cinético a incluir es la desabsorción de amoníaco.
- ✓ **Procesos gobernados por el equilibrio.** En este caso solamente fue necesario añadir el proceso de disociación  $NO_2^-/HNO_2$ , ya que el resto de equilibrios ácido-base ya se encontraban implementados en el modelo BNRM1.

En la Tabla 30 se muestran todos los componentes y procesos del modelo BNRM1 modificado y se destacan en negrita los nuevos componentes y procesos considerados.

	i	COMPONENTES	j	PROCESOS
<b>Suspendidos</b>	1	$X_I$	1	Hidrólisis aerobia
	2	$X_S$	2	Hidrólisis anóxica
	3	$X_H$	3	Hidrólisis anaerobia
	4	$X_{PAO}$	4	Crecimiento Aerobio de $X_H$ a partir de $S_F$
	5	$X_{PP}$	5	Crecimiento Aerobio de $X_H$ a partir de $S_A$
	6	$X_{PHA}$	6	Crecimiento Aerobio de $X_H$ a partir de $S_{PRO}$
	7	$X_{NH}$	7	Crecimiento Anóxico de $X_H$ a partir de $S_F$ y $NO_3$
	8	$X_{NO}$	8	Crecimiento Anóxico de $X_H$ a partir de $S_A$ y $NO_3$
	9	$X_{MEOH}$	9	Crecimiento Anóxico de $X_H$ a partir de $S_{PRO}$ y $NO_3$
	10	$X_{MEP}$	<b>10</b>	<b>Crecimiento Anóxico de <math>X_H</math> a partir de <math>S_F</math> y <math>NO_2</math></b>
	11	$X_{NV}$	<b>11</b>	<b>Crecimiento Anóxico de <math>X_H</math> a partir de <math>S_A</math> y <math>NO_2</math></b>
	12	$X_{ACID}$	<b>12</b>	<b>Crecimiento Anóxico de <math>X_H</math> a partir de <math>S_{PRO}</math> y <math>NO_2</math></b>
	13	$X_{PRO}$	13	Lisis de $X_H$
	14	$X_{MAC}$	<b>14</b>	<b>Crecimiento de <math>X_{NH}</math></b>
	15	$X_{MH2}$	<b>15</b>	<b>Lisis de <math>X_{NH}</math></b>
	16	$S_{TAN}$	<b>16</b>	<b>Crecimiento de <math>X_{NO}</math></b>
	<b>Solubles</b>	<b>17</b>	<b><math>S_{TNO2}</math></b>	<b>17</b>
18		$S_{NO3}$	18	Almacenamiento PHA a partir de $S_A$
19		$S_{N2}$	19	Almacenamiento PHA a partir de $S_{PRO}$
20		$S_{O2}$	20	Almacenamiento de polifosfatos aerobio
21		$S_{PO4}$	21	Almacenamiento de polifosfatos anóxico
22		$S_F$	22	Crecimiento $X_{PAO}$ Aerobio a partir de $X_{PHA}$
23		$S_A$	23	Crecimiento $X_{PAO}$ Anóxico a partir de $X_{PHA}$
24		$S_{PRO}$	24	Lisis de $X_{PAO}$
25		$S_I$	25	Lisis de $X_{PP}$
26		$S_{IC}$	26	Lisis de $X_{PHA}$
27		$S_H$	27	Fermentación de $S_F$
28		$S_{ALK}$	28	Oxidación anaerobia de $S_{PRO}$
29		$S_{N2}$	29	Conversión del ácido acético en metano
30		$S_{H2}$	30	Conversión del hidrógeno en metano
31		$S_{CH4}$	31	Lisis de $X_{ACID}$
			32	Lisis de $X_{PRO}$
			33	Lisis de $X_{MAC}$
		34	Lisis de $X_{MH2}$	
		35	Precipitación	
		36	Redisolución	
		37	Desabsorción $CO_2$	
		38	Desabsorción $N_2$	
		<b>39</b>	<b>Desabsorción <math>NH_3</math></b>	
		40	Desabsorción $H_2$	
		41	Desabsorción $CH_4$	
		42	Desabsorción $O_2$	

Tabla 30. Procesos y componentes del modelo desarrollado a incorporar al modelo BNRM1.



C  
A  
P  
I  
T  
U  
L  
O  
5

---

*Diseño de la metodología de  
calibración del modelo.*



## 5 Desarrollo de la metodología de calibración del modelo.

Una vez desarrollado el modelo matemático de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito, el siguiente paso es el análisis de todos los parámetros implicados en dicho modelo. En la Tabla 31 se presentan todos estos parámetros clasificados según el grupo de bacterias. En la evaluación previa de parámetros, es importante delimitar los intervalos de variación de los diferentes parámetros del modelo, los cuales pueden estar determinados por el conjunto de valores dentro de los cuales estos conservan sentido físico o por el intervalo de valores deducido de la experiencia de que se dispone sobre el sistema. A partir de la bibliografía estudiada se han establecido los rangos de variación de cada parámetro del modelo.

Parámetro	Valor	Unidades	Referencias
<b>Coefficientes estequiométricos</b>			
<b>Bacterias Amonioxidantes</b>			
$f_{XI}$	Fracción de materia inerte particulada	<b>0.10</b>	adimensional Henze et al. 1999
$Y_{NH}$	Rendimiento de $X_{NH}$	<b>0.11-0.27</b>	g DQO / g N Volcke et al. 2006 – Carrera 2000
<b>Bacterias Nitritoxidantes</b>			
$f_{XI}$	Fracción de materia inerte particulada	<b>0.1</b>	adimensional Henze et al. 1999
$Y_{NO}$	Rendimiento de $X_{NO}$	<b>0.03-0.09</b>	g DQO / g N Volcke et al. 2006 – Jones et al 2007
<b>Parámetros cinéticos</b>			
<b>Bacterias Amonioxidantes</b>			
$\mu_{NH}$	Tasa máxima de crecimiento de $X_{NH}$	<b>1.0-4.04 (35°C)</b>	$d^{-1}$ Van Hulle et al. 2004 – Wett et al. 2003
$K_{O_2}$	Constante semisaturación de $O_2$	<b>0.10-1.66</b>	mg $O_2$ /l Sin et al. 2008 – Sanchez et al. 2001
$K_{NH_3}$	Constante semisaturación de sustrato	<b>0.44-0.75</b>	mg N- $NH_3$ /l Magrí 2007 – Van Hulle et al 2007
$K_{INH_3}$	Constante inhibición por sustrato	<b>10-3000</b>	mg N- $NH_3$ /l Anthonisen et al. 1976 – Wett et al. 2003
$K_{PO_4}$	Constante semisaturación de $PO_4$	<b>0.01</b>	mg P- $PO_4$ /l Henze et al. 1999
$K_{IHNO_2}$	Constante inhibición por $HNO_2$	<b>0.07-2.8</b>	mg N- $HNO_2$ /l Jones et al. 2007 – Wett et al. 2003
$K_{IPH}$	Constante inhibición por pH	<b>5.5-7.1</b>	mol $H^+$ /l Jones et al. 2007 – Grunditz et al., 2001
$K_{pH}$	Constante semisaturación de pH	<b>9.0-9.5</b>	mol $H^+$ /l Grunditz et al., 2001 – Jones et al. 2007
$b_{NH}$	Tasa de lisis	<b>0.08-0.21 (20°C)</b>	$d^{-1}$ Magrí 2007 – Salem et al. 2006
<b>Bacterias Nitritoxidantes</b>			
$\mu_{NO}$	Tasa máxima de crecimiento de $X_{NO}$	<b>0.02-3.21 (35°C)</b>	$d^{-1}$ Hellings et al. 1998 – Wett et al. 2003
$K_{O_2}$	Constante semisaturación de $O_2$	<b>0.13-1.10</b>	mg $O_2$ /l Manser 2005 – Volcke et al. 2006
$K_{HNO_2}$	Constante semisaturación de sustrato	<b>0.001-0.27</b>	mg N- $HNO_2$ /l Hellings et al. 1999 – Volcke et al. 2006
$K_{IHNO_2}$	Constante inhibición por sustrato	<b>0.02-2.8</b>	mg N- $HNO_2$ /l Guisasola et al. 2005 – Wett et al. 2003
$K_{PO_4}$	Constante semisaturación de $PO_4$	<b>0.01</b>	mg P- $PO_4$ /l Henze et al. 1999
$K_{INH_3}$	Constante inhibición por $NH_3$	<b>0.1-20</b>	mg N- $NH_3$ /l Anthonisen et al. 1976 – Wett et al. 2003
$K_{IPH}$	Constante inhibición por pH	<b>5.5-6.9</b>	mol $H^+$ /l Jones et al. 2007 – Grunditz et al., 2001
$K_{pH}$	Constante semisaturación de pH	<b>8.7-9.5</b>	mol $H^+$ /l Grunditz et al., 2001 – Jones et al. 2007
$b_{NO}$	Tasa de lisis	<b>0.08-0.20 (20°C)</b>	$d^{-1}$ Kampschreur et al. 2008 – Wett et al. 2003

Tabla 31. Parámetros a determinar en el modelo desarrollado.

Mediante el proceso de calibración se obtienen los valores de los parámetros que permiten que los resultados aportados por el modelo se ajusten a los resultados experimentales obtenidos en un sistema concreto.

El desarrollo de una metodología de calibración del modelo tiene como objetivo disponer de una estrategia lo más estructurada y científica posible que minimice tiempo, determinaciones analíticas, instrumental,... En el presente capítulo se describen las metodologías desarrolladas para la calibración de los dos grupos de bacterias que llevan a cabo el proceso de nitrificación (bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes) y su aplicación en cada uno de los sistemas evaluados.

Se han desarrollado dos metodologías de calibración distintas para el reactor SHARON y la planta piloto porque estos sistemas presentan características muy diferentes en cuanto a la población bacteriana desarrollada, temperaturas de operación, concentraciones de amonio,... El reactor SHARON fue operado de forma que se permitiese únicamente el crecimiento de las bacterias amonioxidantes mientras que las bacterias nitritoxidantes eran lavadas del sistema. Por lo tanto, ya que, en el caso de un reactor SHARON, todo el consumo de oxígeno se debe a las bacterias amonioxidantes la metodología de calibración establecida irá enfocada sólo a la determinación de los parámetros de estas bacterias. En cambio en la planta piloto tanto bacterias amonioxidantes como nitritoxidantes crecen simultáneamente, junto con otras poblaciones bacterianas. De este modo, la calibración de muestras extraídas de esta planta piloto debe tener en cuenta por un lado la determinación por separado de los parámetros de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes, y por otro, considerar que existe un consumo de oxígeno adicional debido al resto de bacterias que se desarrollan en la planta piloto. También hay que tener en cuenta que en el reactor SHARON, al emplearse concentraciones tan altas de amonio en el influente, llevar este fango a condiciones endógenas implica cierta dificultad y realmente no es necesario pues solo se desarrollan bacterias amonioxidantes, mientras que en las muestras de fango de la planta piloto este punto es imprescindible para poder determinar cuál es el consumo de oxígeno adicional de las muestras.

### **5.1 Desarrollo de una metodología de calibración para fango del reactor SHARON.**

A continuación se van a describir los experimentos necesarios para la calibración de los parámetros de las bacterias amonioxidantes del modelo de eliminación de nitrógeno amoniacal vía nitrito, en un reactor SHARON a escala laboratorio. Como se ha descrito en párrafos anteriores, este sistema de operación ha sido diseñado para obtener una nitrificación parcial del 50 % del amonio influente con el crecimiento únicamente de bacterias amonioxidantes (gracias a las condiciones de operación del reactor, como TRC, T, pH). Por ello, todo el consumo de oxígeno registrado es debido al proceso de oxidación del amonio llevado a cabo bacterias amonioxidantes.

La calibración se divide en los procedimientos que se muestran en diagrama de la Figura 30.

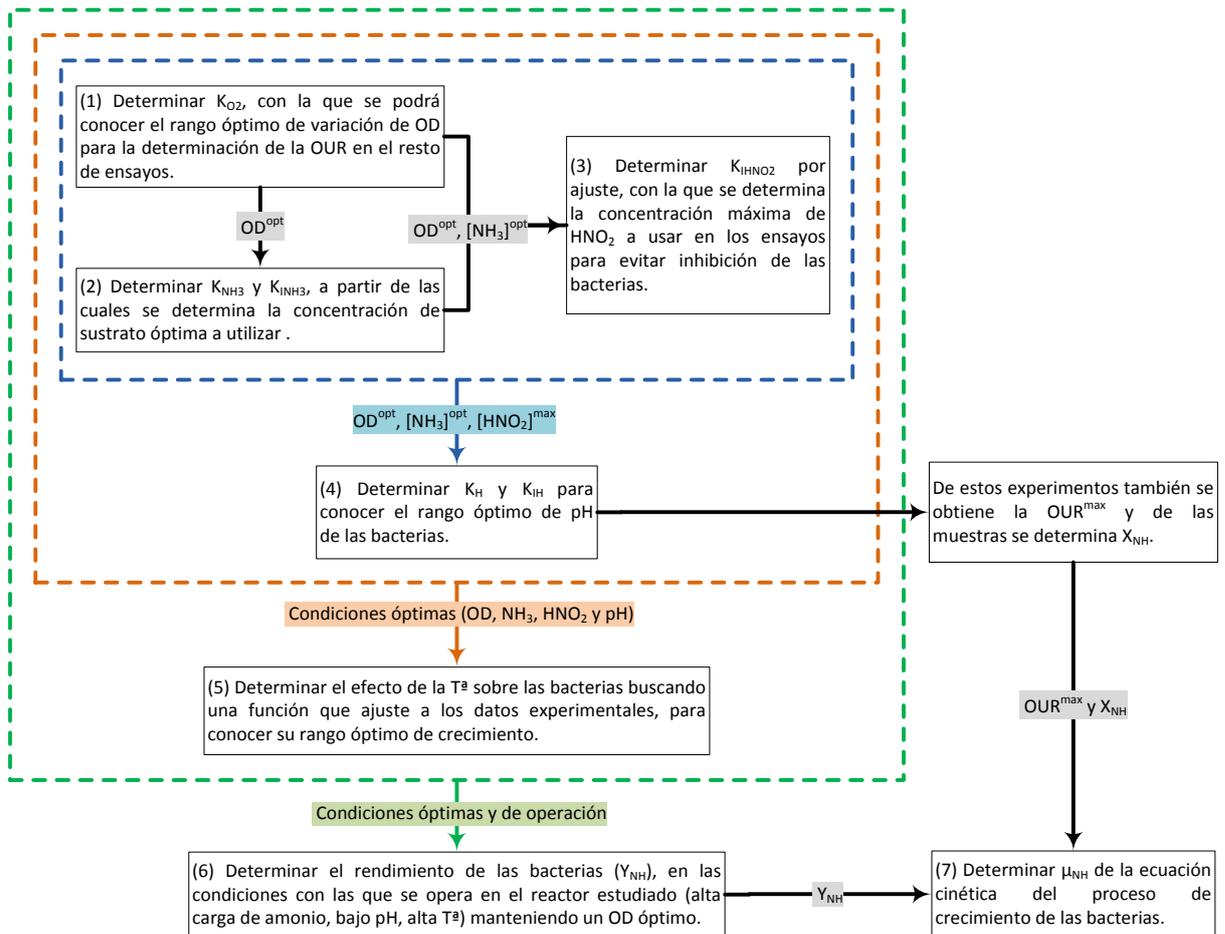


Figura 30. Secuencia seguida en el calibrado de los parámetros de las bacterias amonioxidantes en un reactor SHARON a escala laboratorio.

### 5.1.1 Determinación de la constante de semisaturación del oxígeno.

La determinación del coeficiente de semisaturación del oxígeno ( $K_{O_2}$ ) para los organismos amonioxidantes se realiza a partir del registro de la concentración de oxígeno en el propio reactor SHARON. Los experimentos para la determinación de esta constante se realizan en el mismo reactor  $R_1$ , ya que, al no estar consumiendo todo el amonio que entra en el reactor, las bacterias disponen de sustrato suficiente. Son experimentos de corta duración, que consisten básicamente en la inyección de aire hasta obtener concentraciones de aproximadamente  $5 \text{ mg O}_2/\text{l}$  en el reactor. Se interrumpe la aireación y a partir de este instante el oxígeno disuelto comienza a descender, y se deja evolucionar hasta alcanzar unas concentraciones de oxígeno próximas a  $0 \text{ mg O}_2/\text{l}$ . Al mismo tiempo se realiza un registro de la evolución del pH para observar posibles cambios.

Con los resultados de estos experimentos se determina el consumo de oxígeno en el proceso de oxidación del amonio. Estos datos experimentales se ajustan con la ecuación Ec.- 66 obtenida de la siguiente forma:

$$-\frac{dS_{O_2}}{dt} = \mu_{NH} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_{I,NH_3}}{S_{NH_3} + K_{I,NH_3}} \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{S_{PO_4} + K_{PO_4}} \cdot I_{pH} \cdot X_{NH} \quad \text{Ec.- 65}$$

$$-\frac{dS_{O_2}}{dt} = K \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \xrightarrow{\text{Integración por diferencias finitas}} -\frac{\Delta S_{O_2}}{\Delta t} = K \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}}$$

$$-\frac{(S_{O_2}^{t+\Delta t} - S_{O_2}^t)}{\Delta t} = K \cdot \frac{S_{O_2}^t}{K_{O_2} + S_{O_2}^t} \quad \text{despejando}$$

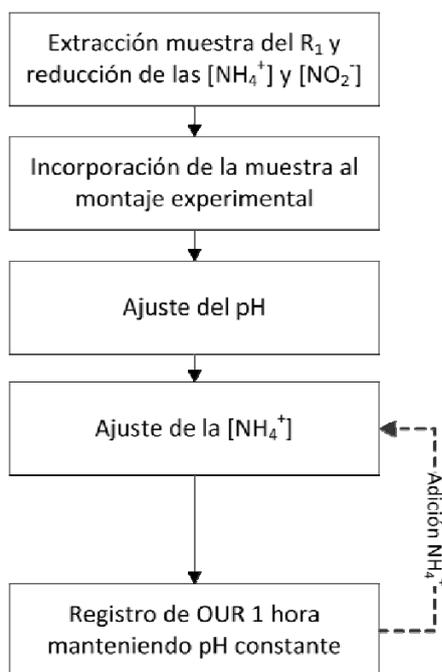
$$S_{O_2}^{t+\Delta t} = S_{O_2}^t - K \cdot \frac{S_{O_2}^t}{K_{O_2} + S_{O_2}^t} \cdot \Delta t \quad \text{Ec.- 66}$$

Donde K engloba el recto de funciones del modelo, asumiendo que las concentraciones de sustrato, ácido nitroso, fósforo y biomasa permanecen constantes.

Los valores de K y  $K_{O_2}$  de la expresión anterior se determinan ajustando las predicciones del modelo al OD medido experimentalmente. Para obtener un valor de la constante de afinidad adecuado se debe realizar más de un ensayo en días diferentes, no necesariamente consecutivos.

### 5.1.2 Determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del $NH_3$ .

La determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del sustrato ( $K_{NH_3}$  y  $K_{INH_3}$ ) puede ser realizada de forma conjunta en el mismo tipo de ensayos respirométricos llevados a cabo en el montaje que se ha descrito en la Figura 24 (página 116). Los ensayos se basan en mantener la biomasa en unas condiciones de  $T^a$  y pH constantes mientras se somete la muestra a incrementos escalonados en la concentración de sustrato desde valores mínimos hasta concentraciones lo suficientemente altas como para considerar que puedan inhibir. En este caso los pasos a seguir son los que se muestran en la Figura 31.



**Figura 31. Esquema básico de los experimentos para la determinación de las constantes de inhibición y semisaturación de NH<sub>3</sub> en el reactor SHARON.**

Para empezar los experimentos, la muestra extraída del reactor SHARON es sometida a un lavado para reducir las concentraciones de amonio y nitrito, evitando la posible inhibición por el HNO<sub>2</sub>. Para ello la muestra se sedimenta, se retira el sobrenadante y se sustituye por agua residual sintética con las mismas características a las usadas en el influente del reactor SHARON, a excepción de la sal de amonio que ha sido sustituida por NaCl, ajustando la conductividad, para evitar el choque osmótico.

La temperatura de estos ensayos es la misma con la que se está trabajando en el reactor R<sub>1</sub> (30 °C) y el pH se modifica de un ensayo a otro para poder comparar la actividad de las bacterias en un rango de valores de pH (de 6.5 a 8.0).

Antes de iniciar los experimentos hay que concretar el intervalo de concentraciones de amonio a estudiar y número de pruebas a realizar a diferentes pH para poder determinar el valor de las constantes pudiendo desprestigiar el efecto de inhibición por pH. Según la revisión bibliográfica y condiciones de operación en el reactor SHARON, se recomienda llegar a analizar concentraciones de aproximadamente 5000 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l y realizar experimentos a, al menos, 3 valores de pH diferentes comprendidos entre 6 y 8 (rango de pH óptimo de crecimiento de las bacterias amonioxidantes según la bibliográfica consultada).

Un aspecto importante a considerar en estos experimentos, como se ha comentado en la introducción de la tesis, es que la salinidad del medio puede inhibir al crecimiento de las

bacterias. Dado que estos experimentos se realizan con altas concentraciones de amonio, esto puede llevar a que el efecto de inhibición por el amoníaco se vea solapado con el efecto que tiene la salinidad sobre el proceso de crecimiento de las bacterias. Por este motivo, es conveniente llevar a cabo una serie de experimentos como los que se describen en este apartado pero usando diferentes sales de amonio e incluso otras sales sin ión amonio. De esta forma si existe proceso de inhibición se podrá determinar si es debido al amoníaco o, por el contrario, al aumento de salinidad en el medio independientemente de la fuente que provoca este incremento. Si se concluye que el proceso de inhibición por salinidad empieza a afectar a las bacterias antes que la inhibición por el propio sustrato será necesario incluir en el modelo un nuevo término para tener en cuenta este nuevo factor de inhibición a la vez que se suprimirá la función que considera la inhibición por sustrato. De esta forma, el modelo de crecimiento de bacterias amonioxidantes quedaría como se muestra a continuación:

$$r = \mu_{NH} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_{I,NH_3}}{S_{NH_3} + K_{I,NH_3}} \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{S_{PO_4} + K_{PO_4}} \cdot I_{pH} \cdot X_{NH} \quad \text{Ec.- 67}$$



$$r = \mu_{NH} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_M}{S_M + K_M} \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \cdot \frac{S_{PO_4}}{S_{PO_4} + K_{PO_4}} \cdot I_{pH} \cdot X_{NH} \quad \text{Ec.- 68}$$

Donde  $S_M$  indica la salinidad del medio en mol/l. Además el nuevo término de inhibición, al igual que cualquier otra función de inhibición, deberá incluir una constante de inhibición ( $K_M$ ) para indicar la salinidad (en mol/l) a la cual la velocidad de crecimiento de las bacterias se ve reducida en un 50 %.

Para la determinación de las constantes de semisaturación e inhibición se usarían los siguientes ajustes:

➔ Si existe inhibición por altas concentraciones de  $NH_3$ :

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_{I,NH_3}}{S_{NH_3} + K_{I,NH_3}} \quad \text{Ec.- 69}$$

➔ Si la inhibición a altas concentraciones es debida a la salinidad:

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_M}{S_M + K_M} \quad \text{Ec.- 70}$$

Donde la constante K incluye el resto de funciones del modelo que se pueden considerar constantes.

### 5.1.3 Determinación de la constante de inhibición del $\text{HNO}_2$ .

Una vez obtenidos los resultados de los experimentos del apartado anterior, se dispone de los rangos de concentración de amonio donde las bacterias amonioxidantes se encuentran al máximo de su actividad, y es posible pasar a la determinación de la constante de inhibición del ácido nitroso. El proceso es similar al descrito en el apartado anterior, con la diferencia de que en este caso se ajusta la concentración inicial de amonio a un valor adecuado para el desarrollo de las bacterias, y a partir de aquí la biomasa es sometida a sucesivos incrementos de nitrito manteniendo la temperatura y el pH del reactor constantes (Figura 32).

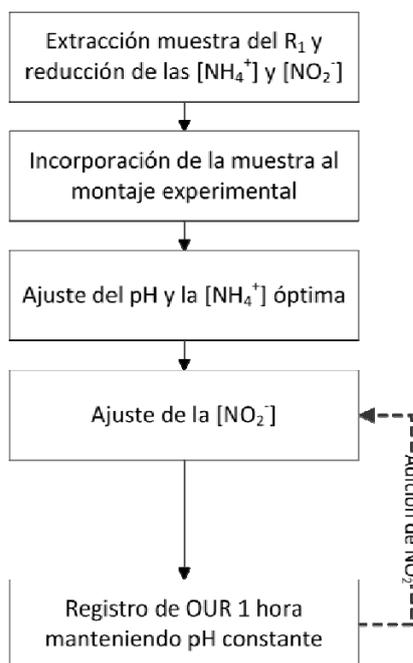


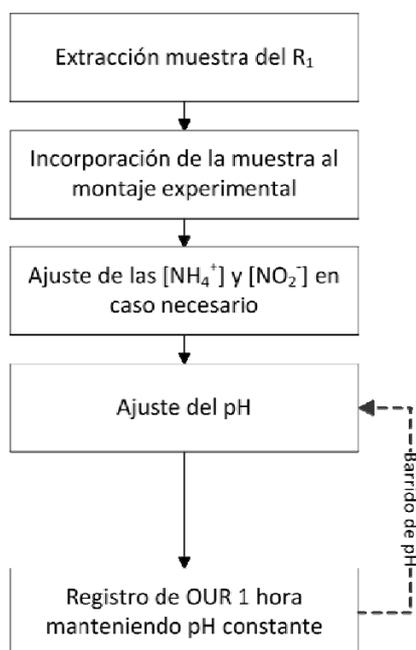
Figura 32. Esquema básico de los experimentos para la determinación de la constante de inhibición por  $\text{HNO}_2$  en el reactor SHARON.

Para la determinación de este parámetro de inhibición también se considera aconsejable realizar experimentos a 3 valores de pH diferentes para poder determinar una constante de inhibición sin el efecto del pH, y para confirmar que es el  $\text{HNO}_2$  y no el  $\text{NO}_2^-$  el compuesto que realmente inhibe (Van Hulle *et al.*, 2007; Vadivelu *et al.*, 2007).

En este caso la función a ajustar para determinar la constante de inhibición por ácido nitroso sería:

#### 5.1.4 Determinación de las constantes de inhibición del pH.

Para determinar el efecto que tiene el pH sobre el desarrollo de las bacterias amonioxidantes se propone un tipo de experimentos que consiste en analizar la OUR para distintos valores de pH y distintas concentraciones de amonio y nitrito. El montaje experimental usado en estos ensayos es el mismo que el usado en los casos anteriores (Figura 24, página 116) y los pasos a seguir para la realización de estos experimentos son los que se muestran en la Figura 33.



**Figura 33. Esquema básico de los experimentos para la determinación de las constantes de inhibición por pH en el reactor SHARON.**

Los aspectos más importantes a concretar en estos experimentos son:

- ◇ Intervalo de concentraciones de amonio y nitrito a estudiar (se debe estudiar un rango amplio de concentraciones para poder comparar resultados de experimentos en condiciones diferentes).
- ◇ Intervalo de pH a estudiar (teniendo en cuenta los valores de pH típicos de operación en la depuración de aguas residuales, se considera adecuado que en cada ensayo se realice un barrido de pH desde un valor mínimo de 6 hasta aproximadamente 9).
- ◇ Incremento de pH (se han fijado de incrementos de 0.5 unidades en cada aumento de pH).

Con estos experimentos, y conociendo las constantes determinadas en los ensayos anteriores ( $K_{O_2}$ ,  $K_{NH_3}$ ,  $K_{INH_3}/K_M$ ,  $K_{IHNO_2}$ ), se pueden determinar las constantes de inhibición por pH mediante el ajuste del modelo desarrollado a los resultados experimentales obtenidos en estos ensayos usando una de las siguientes expresiones:

$$OUR_{cal} = K \cdot M_{O_2} \cdot \frac{M_{NH_3} \cdot I_{NH_3}}{f(S_{NH_3}^{opt})} \cdot I_{HNO_2} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad \text{Ec.- 72}$$

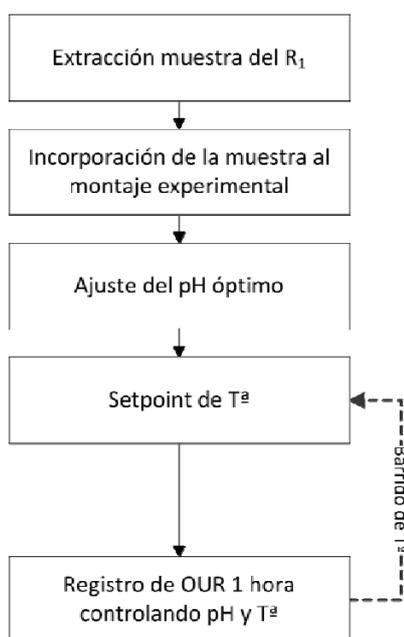
$$OUR_{cal} = K \cdot M_{O_2} \cdot M_{NH_3} \cdot I_M \cdot I_{HNO_2} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad \text{Ec.- 73}$$

Donde las expresiones "M" e "I" son las funciones Monod y de inhibición calculadas en los apartados anteriores (excepto la inhibición por pH, que es la que se trata en este apartado), y K incluye la tasa máxima de crecimiento de las bacterias y su concentración, como se muestra a continuación:

$$K = \mu_{NH}^{max} \cdot X_{NH} \cdot \frac{3.43 - Y_{NH}}{Y_{NH}} \quad \text{Ec.- 74}$$

### 5.1.5 Determinación del efecto de la temperatura en la actividad de las bacterias.

Para determinar la influencia de la temperatura sobre la actividad de las bacterias amonioxidantes se emplea el mismo montaje en batch descrito en el apartado 3.4.1 (página 115). En estos ensayos se trabaja con las concentraciones que tienen las muestras del reactor SHARON en el momento de la extracción, controlando únicamente el pH del fango en un valor óptimo para las bacterias. En cada ensayo la muestra se somete consecutivamente a diferentes temperaturas registrando la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) para cada nivel de temperatura.



**Figura 34. Esquema básico de los experimentos para el estudio del efecto de la temperatura sobre la biomasa del reactor SHARON.**

El rango de temperatura evaluado en el presente trabajo va desde 15 °C hasta 45 °C, con incrementos de 5°C. En estos experimentos el pH se mantuvo en un valor de 7 mediante el sistema de control descrito. Los experimentos realizados permiten determinar la función que mejor describe la dependencia de la actividad bacteriana con la temperatura.

#### **5.1.6 Determinación del rendimiento celular de las bacterias.**

La metodología para la determinación del rendimiento del crecimiento de la biomasa amonioxidante ( $Y_{NH}$ ) consiste en medir el oxígeno consumido para la oxidación de una determinada cantidad de amonio. Para la realización de este tipo de ensayos se incorpora una muestra de fango del reactor  $R_1$  al reactor empleado en el ensayo (montaje de la Figura 24, página 116). De este fango se determina la concentración inicial de amonio al tiempo que se inicia el registro del consumo de oxígeno disuelto. Las condiciones de temperatura y pH en el ensayo respirométrico son las mismas que las que tiene el reactor SHARON en el momento del ensayo. Se debe mantener el registro en el ensayo el tiempo necesario para llegar a un consumo de amonio apreciable (aproximadamente entre 4-5 horas, aunque este tiempo se puede ampliar o reducir según los resultados obtenidos en las analíticas al final del experimento).

Al final del experimento se extraen muestras de nuevo para analizar el cambio en las concentraciones de amonio y nitrito. El registro de OURs permite calcular el OD consumido durante la oxidación del amonio mediante el cálculo del área bajo la curva registrada de OUR

frente al tiempo. Una vez se disponga de toda la información, se aplica la siguiente ecuación para la determinación de  $Y_{NH}$ :

$$\frac{NH_4^+ \text{ consumido}}{O_2 \text{ consumido}} = \frac{1 + i_{NBM} \cdot Y_{NH}}{3.43 - Y_{NH}} \rightarrow Y_{NH} = \frac{3.43 \cdot NH_4^+ \text{ cons} - O_2 \text{ cons}}{NH_4^+ \text{ cons} + i_{NBM} \cdot O_2 \text{ cons}} \quad \text{Ec.- 75}$$

### 5.1.7 Determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias.

Para la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias amonioxidantes se pueden utilizar los ajustes de los experimentos para la determinación de las constantes de inhibición del pH, descritos en el apartado 5.1.4. En dichos ajustes se ha obtenido un valor de K para cada experimento, que viene representado por la expresión de la ecuación Ec.- 74 (página 153).

Para poder determinar el valor de la tasa máxima de crecimiento a partir de esta ecuación es necesario determinar previamente la concentración de bacterias en las muestras usadas en los experimentos. Una vez conocido este dato se puede despejar el valor de la constante  $\mu_{NH}$  de la expresión.

Para la cuantificación de las bacterias amonioxidantes en las muestras se ha seguido el método desarrollado por Borrás L. (2008). El método de cuantificación puede dividirse en las siguientes etapas básicas:

- (1) Toma de una muestra representativa del fango o cultivo de bacterias.
- (2) Aplicación de la técnica de hibridación *in situ*, FISH combinada con la tinción con DAPI (Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) para determinar el porcentaje de bacterias específicas. Normalmente el contenido de bacterias en una muestra se expresa como el porcentaje de biomasa hibridada con la sonda específica, respecto al total hibridada con la sonda EUBmix (dominio *Eubacteria*). La mayoría de microorganismos presentes en sistemas biológicos de fangos activados pertenecen al dominio *Eubacteria*. Sin embargo, existen algunos microorganismos que no pertenecen a este grupo con lo que la sonda EUBmix no garantiza que se esté cubriendo la población completa *Eubacteria* presentes en sistemas fangos activados. Por ello, si se desea conocer el porcentaje de bacterias de un grupo específico, respecto al total de bacterias presentes en la muestra, se hace necesaria la utilización de una técnica que revele el contenido total de bacterias en dicha muestra. El compuesto DAPI crea complejos fluorescentes con el ADN, de forma que al tratar una

muestra de fango con DAPI se observará la totalidad del ADN presente en esta, o lo que es lo mismo la totalidad de las bacterias presentes en la muestra.

- (3) Además de la cuantificación del porcentaje de biomasa es necesario conocer los porcentajes de biomasa viable y no viable en el total. Este dato se obtiene mediante la técnica de Viabilidad Celular. Este método consiste en examinar la integridad de la membrana celular. Para ello se utilizan dos fluorocromos: Yoduro de propidio PI, rojo, y SYTO 9, verde. El método se basa en que la molécula de SYTO 9, más pequeña que la de PI, entra en la célula a través de la membrana celular. Después, el PI, molécula más grande, intenta entrar en la célula. Si la membrana celular no está dañada (célula viva), el PI no podrá entrar en la célula, prevaleciendo en esta la molécula de SYTO 9, y obteniéndose un color verde. Si por el contrario la membrana celular está dañada (célula muerta o dañada), la molécula de PI entrará en la célula y desplazará a la molécula de SYTO 9, resultando un color rojo.
- (4) Observación en el microscopio y toma de imágenes de las muestras hibridadas.
- (5) Cuantificación de los datos. Las imágenes son analizadas mediante el software de cuantificación desarrollado por Borrás L., que devuelve un informe detallado de los porcentajes de áreas ocupadas por las bacterias presentes en la muestra hibridada. La cuantificación de imágenes tomadas en la técnica de Viabilidad Celular proporciona el porcentaje de biomasa no viable ( $X_i$ ), con el que se obtiene la DQO correspondiente a la biomasa viable de la muestra. El producto de este último dato con los porcentajes máxicos de bacterias específicas permite obtener la concentración de cada grupo concreto de bacterias ( $M_{DQO}/L^3$ ).

## **5.2 Desarrollo de una metodología de calibración para fango de la planta piloto.**

El siguiente proceso de calibración será aplicado en las muestras extraídas de la planta piloto descrita en el apartado 3.3 (página 108). En este caso las muestras tienen una población bacteriana muy diversa y, por ello, tanto el tratamiento previo de las muestras como la metodología de calibración van a ser diferentes al proceso de calibración de las bacterias desarrolladas en el reactor SHARON. Para empezar, el fango extraído de la planta debe pasar a condiciones endógenas, según se ha descrito en el apartado 3.4.1, para asegurar que durante los experimentos el consumo de oxígeno del resto de bacterias se mantiene constante y el incremento de OUR puede ser atribuido a la actividad de las bacterias estudiadas (amonioxidantes o nitritoxidantes).

A partir de este fango en condiciones endógenas se extraen las muestras necesarias para la calibración de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes. Durante el tiempo que duran

los ensayos respirométricos, el fango en condiciones endógenas se mantiene aireado de forma continua para tener concentraciones de OD suficientemente altas para poder llevar a cabo cada ensayo individual sin necesidad de aireación.

El aspecto más importante de esta metodología de calibración es el diseño de experimentos que permitan calibrar de manera independiente los parámetros de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes, ya que, al contrario de lo que sucede en el reactor SHARON, en este fango se desarrollan los dos grupos de bacterias que llevan a cabo el proceso de nitrificación. Así pues, el primer paso en la metodología de calibración es la elección de un método que permita medir la actividad de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes de forma independiente. Una vez se disponga de un método apropiado es posible diseñar los experimentos para la calibración de parámetros de las bacterias.

### **5.2.1 Determinación del método para medir de forma independiente la actividad de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en cultivos mixtos.**

Cuando se procede a la calibración de muestras donde se están desarrollando los dos grupos de bacterias responsables del proceso de nitrificación hay que poder determinar de forma separada la actividad de cada grupo. La solución inmediata a este problema es el empleo específico de un inhibidor selectivo para cada grupo de bacterias.

En el caso de la actividad de las bacterias nitritoxidantes, la dificultad es menor ya que al usar fango en condiciones endógenas, donde ya no existe sustrato, y añadir únicamente nitrito, como sustrato de las bacterias nitritoxidantes, las bacterias amonioxidantes no disponen de sustrato para su desarrollo. Sin embargo, en el caso de ser necesario el uso de un inhibidor de amonioxidantes (experimentos para la calibración de la constante  $K_{\text{INH}_3}$  de nitritoxidantes) se hace necesario determinar su validez como se describe más adelante (apartado 5.2.1.1).

El mayor problema se encuentra a la hora de medir la actividad de las bacterias amonioxidantes, ya que es necesario poder separarla de la actividad del otro grupo de bacterias que puede utilizar el nitrito que se produciría en la oxidación del amonio añadido.

Aunque el uso de un inhibidor de nitritoxidantes parece ser la forma más directa para medir la actividad de las bacterias amonioxidantes, para poder emplearlo en el proceso de calibración este debe verificar tres condiciones:

- ◇ Debe bloquear por completo la actividad de las bacterias nitritoxidantes.
- ◇ No debe inhibir a las bacterias amonioxidantes.
- ◇ La inhibición debe ser instantánea.

Por ello, si no se dispone de un inhibidor adecuado se han de analizar otros métodos para poder separar la actividad de ambos grupos de bacterias. En el presente trabajo de investigación se ha estudiado el método desarrollado por Moussa *et al.* (2003) basado en adiciones sucesivas de nitrito y amonio.

#### **5.2.1.1 Inhibidor específico de la actividad de las bacterias.**

##### **→ Inhibición nitritoxidantes.**

Una vez elegido un inhibidor (a partir de revisión bibliográfica), primero se comprobará su acción sobre las bacterias nitritoxidantes. Para ello, se realiza un conjunto de experimentos en los que se medirá la actividad de las bacterias ante una concentración determinada de sustrato en ausencia de inhibidor y en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor (los rangos establecidos deben ser extraídos de la revisión bibliográfica). Con estos experimentos se podrá concluir si el compuesto estudiado inhibe a las bacterias nitritoxidantes, y qué concentración se debe utilizar para inhibirlas por completo.

Una vez comprobado que el compuesto estudiado inhibe por completo y de forma instantánea a las bacterias nitritoxidantes y, determinada la concentración de inhibidor necesaria, hay que verificar que este compuesto no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de las bacterias amonioxidantes. Para ello se realizan los mismos ensayos descritos en este apartado pero usando amonio como sustrato para las bacterias amonioxidantes y la concentración de inhibidor necesaria para la inhibición de las bacterias nitritoxidantes. De esta forma se observará si hay alguna diferencia apreciable en la actividad de las bacterias amonioxidantes con y sin el inhibidor.

Algunos de los compuestos usados en diferentes estudios para la inhibición del proceso de oxidación del nitrito son: *clorato* [ $\text{ClO}_3^-$ ] (Belser y Mays, 1980; Hynes y Knowles, 1983; Surmacz-Gorska *et al.*, 1996), *hidroxilamina* [ $\text{NH}_2\text{OH}$ ] (Bruijn *et al.*, 1995; Noophan *et al.*, 2005), *azida* [ $\text{N}_3^-$ ] (Ginestet *et al.*, 1998; Temizer Oguz, 2005) y *cianida* [ $\text{CN}^-$ ] (Belser y Schmidt, 1981).

En la Figura 35 se puede observar cómo se determina la actividad de las bacterias amonioxidantes usando un inhibidor del proceso de oxidación de nitrito. Al principio del experimento se registra el consumo de oxígeno por parte de la actividad endógena ( $OUR_1$ ). Tras añadir el inhibidor se registra un descenso en la velocidad de consumo de oxígeno (menor pendiente) debido a la inhibición de las bacterias nitritoxidentes ( $OUR_2$ ). Y finalmente se adiciona el amonio para poder registrar el consumo debido a las bacterias amonioxidantes. Esta actividad de las bacterias amonioxidantes se obtiene por la diferencia de velocidad de consumo de OD antes y después de la adición del amonio.

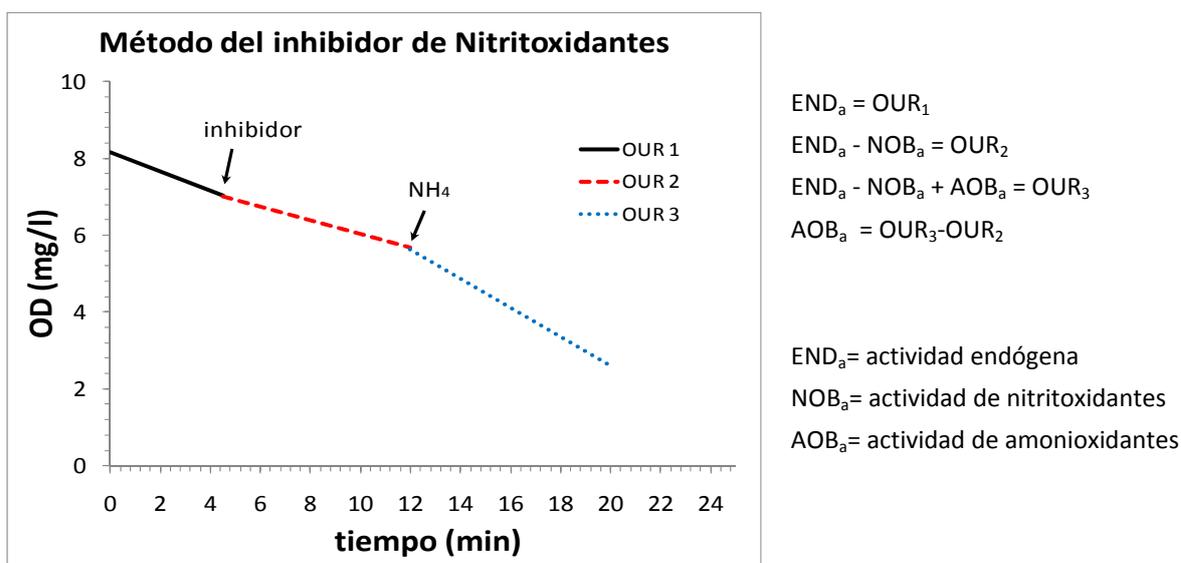


Figura 35. Esquema básico del método de inhibición de nitritoxidentes.

→ **Inhibición amonioxidantes.**

El procedimiento a seguir para determinar un inhibidor de las bacterias amonioxidantes es similar al descrito para las bacterias nitritoxidentes. Se debe realizar un conjunto de experimentos en los que se mide la actividad de las bacterias amonioxidantes en ausencia de inhibidor y en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor que se está estudiando. Con estos se determina si el compuesto usado inhibe a las bacterias y la concentración necesaria para la inhibición completa e instantánea de la actividad. Después se debe verificar si dicho inhibidor tiene algún efecto sobre las bacterias nitritoxidentes. Para ello se realizan dos experimentos, uno en el que se mide la actividad de las nitritoxidentes al añadir una determinada cantidad de nitrito y otro en el que se mide la actividad de estas bacterias añadiendo primero el inhibidor (en la concentración determinada para inhibir a amonioxidantes) y después la misma cantidad de nitrito que en el primer ensayo. De esta

forma se compara si existe algún cambio en la actividad de las bacterias nitritoxidantes en presencia del inhibidor.

Algunos de los compuestos usados para la inhibición del proceso de oxidación del amonio son: *acetileno* [ $HC_2H$ ] (Juliette *et al.*, 1993), *aliltiourea* [ $C_4H_8N_2S$ ] (Juliette *et al.*, 1993, Temizer Oguz, 2005), *Nitrapirina* [ $C_6H_3Cl_4N$ ] (Belser y Mays, 1980; Belser y Schmidt, 1981) y *tiourea* [ $(NH_2)_2CS$ ] (Hays y Forbes, 1974; Pollard, 2006).

### **5.2.1.2 Método de adiciones sucesivas.**

Una alternativa para medir la actividad de las bacterias amonioxidantes fue descrita por Moussa *et al.*, 2003. El método desarrollado permite distinguir en un ensayo el consumo de oxígeno debido a la actividad de las bacterias nitritoxidantes y amonioxidantes, mediante adiciones consecutivas de nitrito y amonio. La principal ventaja de este método es que evita el uso de inhibidores metabólicos para amonioxidantes y nitritoxidantes, como se usan en otros métodos. Los resultados del método han demostrado su utilidad para determinar correctamente la actividad individual de las bacterias amonioxidantes.

El principio del método es determinar la actividad independiente de las bacterias amonioxidantes mediante una adición inicial de nitrito con la que se consiga la máxima actividad de las bacterias nitritoxidantes, y una adición consecutiva de amonio, que provoca el desarrollo de las bacterias amonioxidantes. Como se ha dicho, el objetivo de la primera adición de nitrito es alcanzar la actividad máxima de las bacterias nitritoxidantes presentes en la muestra, de forma que el cambio de OUR registrado tras la adición de amonio sea debido únicamente al crecimiento de las bacterias amonioxidantes. Por lo tanto, para el desarrollo de este método es esencial conocer previamente la concentración idónea de nitrito necesaria para alcanzar la velocidad máxima de crecimiento en las bacterias nitritoxidantes (este dato se determina mediante el proceso de calibrado de las constantes de semisaturación e inhibición del  $HNO_2$  que se describe más adelante). Además hay que asegurarse que la concentración de nitrito a emplear no va a inhibir a las bacterias amonioxidantes.

La Figura 36 muestra como se determina la actividad de las bacterias amonioxidantes a partir de los resultados de estos experimentos. La diferencia de velocidades de consumo de oxígeno medidas tras las dos adiciones se corresponde con la oxidación del amonio añadido.

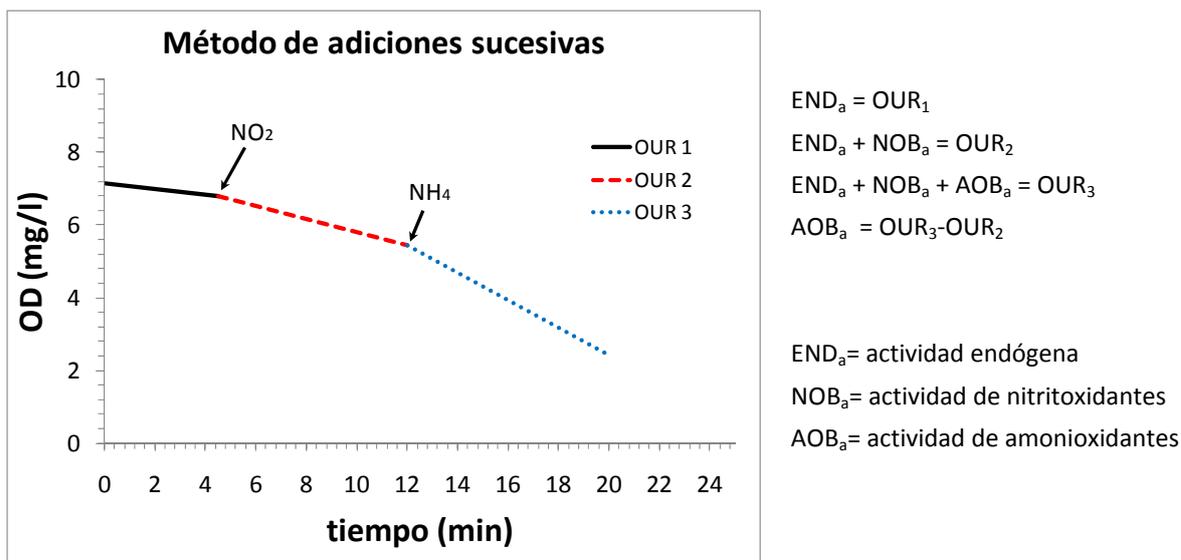


Figura 36. Esquema básico del método de adiciones sucesivas de NO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub> de Moussa *et al.*

### 5.2.2 Experimentos para la calibración de los parámetros de bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en cultivos mixtos.

Una vez decidido el método a utilizar para poder medir la actividad de las bacterias amonioxidantes independientemente de la actividad de las bacterias nitritoxidantes, es posible desarrollar la metodología de calibración para la determinación de los parámetros del modelo de ambos grupos de bacterias en cultivos mixtos.

Para el caso de las bacterias nitritoxidantes los experimentos se basan en medir la respuesta de estas bacterias tras la adición de nitrito. En cambio, para las bacterias amonioxidantes, independientemente del método seleccionado, el proceso a seguir en los experimentos es el siguiente:

- ✓ *Primer paso:* adición de inhibidor de nitritoxidantes (para impedir el desarrollo de estas) o nitrito (para alcanzar la máxima actividad de las bacterias nitritoxidantes).
- ✓ *Segundo paso:* adición de amonio para poder determinar la respuesta de las bacterias amonioxidantes.

Dado que el proceso a seguir en la calibración de amonioxidantes es similar usando los dos métodos descritos, la metodología que se describe a continuación es válida para cualquiera de los dos casos. Como se verá en los resultados experimentales, en el proceso de calibración de los parámetros de la planta piloto se empleó el método de adiciones sucesivas, y por ello, en la siguiente descripción de experimentos se utiliza el nitrito en la

primera adición. En caso de que se decidiese usar un inhibidor de las bacterias nitritoxidantes los pasos a seguir en cada ensayo son los mismos pero se añade el inhibidor en lugar del nitrito, obteniéndose en este caso la inhibición de las bacterias nitritoxidantes en lugar alcanzar su actividad máxima.

La Figura 37 muestra la secuencia a seguir en la metodología de calibración diseñada para la determinación de los parámetros de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en la planta piloto. Las calibraciones de ambos grupos de bacterias están relacionadas por que se necesita conocer la concentración de ácido nitroso adecuada para la aplicación del método de adiciones sucesivas. Además se necesita conocer el valor del rendimiento de las bacterias nitritoxidantes para determinar el rendimiento celular ( $Y$ ) de las bacterias amonioxidantes.

En cada uno de los ensayos que se describen en la siguiente calibración se utiliza una muestra nueva de fango en condiciones endógenas donde las concentraciones de sustrato (amonio y nitrito) son nulas y la concentración de OD es muy alta (no hay limitación por este componente). Dadas estas condiciones, los experimentos en cada una de las calibraciones no necesitan seguir una secuencia tan explícita como la descrita para la calibración del reactor SHARON, ya que en todos los casos únicamente es necesario conocer la concentración óptima de sustrato a la que las bacterias mantienen una actividad máxima (esta determinación es el primer paso de la calibración).

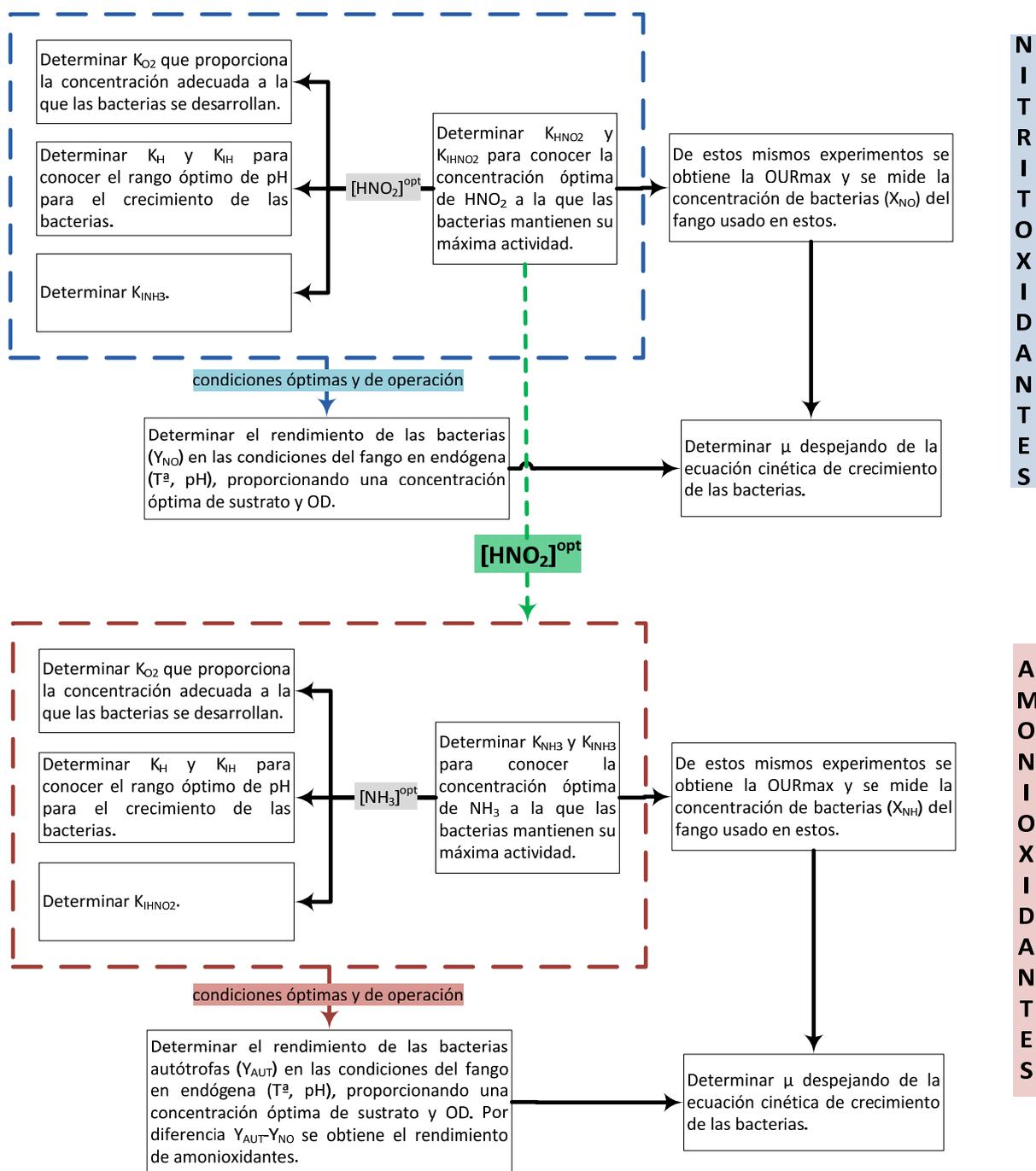


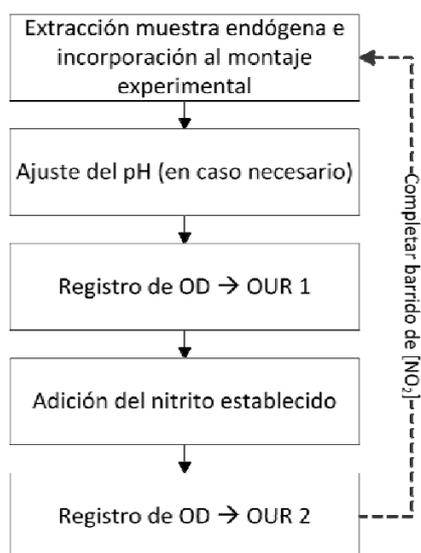
Figura 37. Secuencia seguida en el calibrado de los parámetros de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en una planta de tratamiento de aguas residuales a escala piloto.

Todos los experimentos descritos a continuación son desarrollados en el montaje experimental descrito en el apartado 3.4.2 (página 117) y la Figura 25, a excepción de los experimentos para la determinación de los rendimientos de las bacterias en los cuales se utiliza el montaje experimental de la Figura 26 (página 118).

### 5.2.2.1 Calibración de parámetros de bacterias nitritoxidantes presentes en la planta piloto.

#### 5.2.2.1.1 Determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del $\text{HNO}_2$ .

Para la determinación de las constantes  $K_{\text{HNO}_2}$  y  $K_{\text{IHNO}_2}$  de las bacterias nitritoxidantes se debe determinar cómo varía la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) en función de la concentración de ácido nitroso en el medio. Para ello el procedimiento a seguir es el que se muestra en la Figura 38.



**Figura 38. Esquema básico del procedimiento a seguir para la determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del  $\text{HNO}_2$  de las bacterias nitritoxidantes.**

Los registros de OD antes y después de la adición de nitrito proporcionan el consumo de oxígeno del fango en condiciones endógenas (OUR 1) y la velocidad de consumo de oxígeno debida al crecimiento de las bacterias nitritoxidantes (OUR 2 – OUR 1)

Como se puede observar se utiliza una muestra diferente para cada una de las concentraciones de nitrito a estudiar. El rango de concentraciones de nitrito a examinar en estos ensayos depende de las concentraciones de sustrato disponible en el medio de desarrollo de las bacterias, teniendo en consideración que se deben alcanzar concentraciones elevadas para poder observar la inhibición por el nitrito/ácido nitroso.

Para la determinación adecuada de las constantes  $K_{\text{HNO}_2}$  y  $K_{\text{IHNO}_2}$  es necesario realizar experimentos a al menos 3 valores de pH diferentes, para poder separar los efectos del sustrato y del pH en el crecimiento de las bacterias. Además, el disponer de datos experimentales a diferentes pH, permite también discernir si el modelo desarrollado reproduce mejor los resultados experimentales incluyendo en las funciones el sustrato en

forma ionizada ( $\text{NO}_2^-$ ) o no ( $\text{HNO}_2$ ). Los valores de pH en cada caso son fijados también en función de los rangos habituales de operación en el sistema estudiado.

Para la determinación de las constantes de semisaturación e inhibición por ácido nitroso se usaría el siguiente ajuste:

Ec.- 76

Como resultado de estos ajustes, aparte de las constantes de semisaturación e inhibición, se determina la concentración de nitrito a la cual las bacterias nitritoxidantes se encuentran a su máxima velocidad. Este dato es necesario en el método de adiciones sucesivas, descrito en el apartado 5.2.1.2, para la obtención de los parámetros de las bacterias amonioxidantes.

### 5.2.2.1.2 Determinación de la constante de inhibición por $\text{NH}_3$ .

Una vez conocida la concentración de nitrito óptima para el crecimiento de las bacterias nitritoxidantes es posible llevar a cabo los experimentos necesarios para la determinación de la constante de inhibición por amoníaco. El procedimiento en este tipo de ensayos se basa en someter a la biomasa nitritoxidante a diferentes concentraciones de amonio en presencia de una concentración adecuada de sustrato (Figura 39).

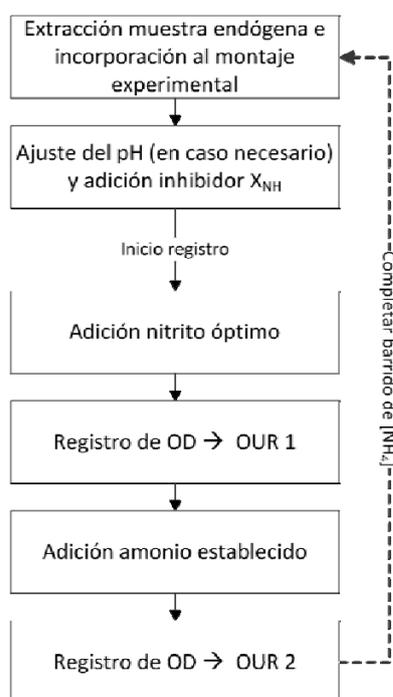


Figura 39. Esquema básico a seguir para la determinación de la constante de inhibición del  $\text{NH}_3$  de las bacterias nitritoxidantes.

En estos ensayos no es tan importante controlar el pH al que se trabaja como conocer el valor concreto de este, ya que es imprescindible para poder determinar la concentración exacta de amoníaco a la que está sometida la biomasa, y poder determinar si existe o no inhibición.

En este caso la función a ajustar para determinar la constante de inhibición por amoníaco consistiría en:

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{K_{I,NH3}}{S_{NH3} + K_{I,NH3}} \quad \text{Ec.- 77}$$

### **5.2.2.1.3 Determinación de la constante de semisaturación del oxígeno.**

Para la determinación de la constante de semisaturación  $K_{O_2}$  es necesario realizar los dos ensayos siguientes, en los que se observa el consumo de oxígeno en función del sustrato añadido:

- ✓ *Experimento 1*, sin adición de sustrato para observar el consumo de oxígeno por la biomasa en condiciones endógenas.
- ✓ *Experimento 2*, con adición de nitrito para observar el consumo de oxígeno por parte de las bacterias nitritoxidantes.

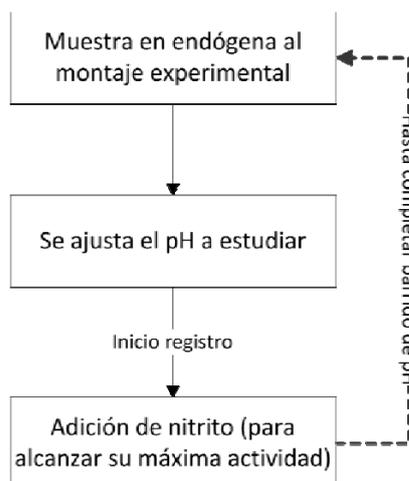
Estos 2 experimentos respirométricos son ensayos sencillos que consisten básicamente en la extracción de una muestra de fango en endógena y una vez colocada en el montaje experimental se inicia el registro de OD en el reactor. Se añade el nitrito (en el caso necesario) en la concentración suficiente para alcanzar la actividad máxima de las bacterias nitritoxidantes y evitar una falta de sustrato durante el experimento y se mantiene el registro del OD hasta que el sistema alcanza concentraciones próximas a 0 mg  $O_2/l$ .

Para obtener la constante de semisaturación del oxígeno para las bacterias nitritoxidantes, a partir de estos experimentos, se ajustaría el resultado obtenido en el experimento 2 mediante la siguiente función:

El término  $f^{end}$  ( $O_2$ ) de la ecuación representa la actividad de la biomasa en condiciones endógenas, el cual se corresponde con el resultado obtenido en el primer experimento sin adición de sustrato.

#### 5.2.2.1.4 Determinación de las constantes de inhibición del pH.

Para la determinación de las constantes de inhibición por pH que aparecen en el modelo desarrollado se deben realizar ensayos similares a los descritos en el apartado 5.2.2.1.1. En estos ensayos se añade siempre la misma concentración de nitrito (cantidad de sustrato óptima para que las bacterias tengan una actividad máxima) mientras que el pH se ajusta a un valor diferente en cada nueva muestra hasta completar un rango de valores adecuado (Figura 40).



**Figura 40.** Esquema básico de los ensayos para determinación de las constantes de pH de las bacterias nitritoxidantes.

En este caso se trata de analizar la velocidad máxima de consumo de sustrato para las bacterias a diferentes pH (se recomienda un rango de pH de 6 a 9 aproximadamente). De

esta forma se puede observar cómo se modifica la actividad de las bacterias conforme se cambia el pH del medio.

Los resultados experimentales de estos ensayos deben ser ajustados con la siguiente expresión para determinar las constantes de inhibición por pH:

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad \text{Ec.- 79}$$

#### 5.2.2.1.5 Determinación del rendimiento celular de las bacterias.

El rendimiento del crecimiento de la biomasa se determina mediante técnicas respirométricas usando el montaje de la Figura 26 (página 118) empleado para pasar el fango a condiciones endógenas. La metodología consiste en adicionar una cantidad de nitrito determinada al reactor, donde se halla el fango a estudiar en condiciones endógenas, y registrar el consumo de oxígeno disuelto hasta que el valor de la OUR se mantenga prácticamente constante, es decir, hasta que la biomasa ha consumido completamente el sustrato añadido. A lo largo del experimento se extraen muestras para analizar la evolución de la concentración del nitrito. El registro de OURs permite calcular el OD consumido durante la oxidación del nitrito mediante el cálculo del área bajo la curva registrada de OUR frente al tiempo. Con los datos de oxígeno y nitrito consumido se determina el rendimiento celular de las bacterias nitritoxidantes ( $Y_{NO}$ ) aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{NO_2^- \text{ consumido}}{O_2 \text{ consumido}} = \frac{1}{1.14 - Y_{NO}} \rightarrow Y_{NO} = \frac{1.14 \cdot NO_2^- \text{ cons} - O_2 \text{ cons}}{NO_2^- \text{ cons}} \quad \text{Ec.- 80}$$

En el experimento para la determinación del rendimiento celular de nitritoxidantes es necesario añadir al fango un inhibidor de la actividad de las bacterias amonioxidantes, previo a la adición del sustrato, para evitar un posible consumo de oxígeno por parte de estas bacterias.

#### 5.2.2.1.6 Determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias.

La determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias se realiza de la misma forma que para la calibración de fango del reactor SHARON (descrito en el apartado 5.1.7, página 155), mediante la cuantificación de las bacterias nitritoxidantes aplicando el método de Borrás L. (2008). En este caso, el dato de  $OUR_{max}$  es determinado de los ensayos previos para la determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del sustrato, usando

aquellos en los que el pH del ensayo no tiene efecto inhibitorio sobre el desarrollo de las bacterias. Conociendo ambos datos se despeja la constante  $\mu$  de la siguiente expresión:

Ec.- 81

### 5.2.2.2 Calibración de parámetros de bacterias amonioxidantes presentes en la planta piloto.

#### 5.2.2.2.1 Determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del $\text{NH}_3$ .

En el proceso de calibrado de las constantes  $K_{\text{NH}_3}$  y  $K_{\text{INH}_3}$  de las bacterias amonioxidantes hay que tener en cuenta la actividad del otro grupo de bacterias del proceso de nitrificación (bacterias nitritoxidantes), así que el procedimiento experimental en cada uno de los ensayos se compone de los puntos de la Figura 41.

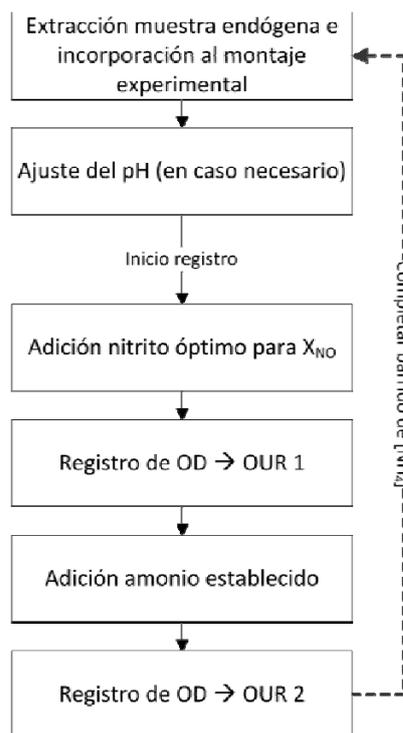


Figura 41. Esquema básico a seguir para la determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del  $\text{NH}_3$  de las bacterias amonioxidantes.

En cada ensayo realizado se obtiene la OUR de las bacterias amonioxidantes frente a la concentración de amonio añadida mediante la diferencia de las OURs medidas en el experimento ( $\text{OUR 2} - \text{OUR 1}$ ). Con estos ensayos se obtiene la evolución de la OUR a medida que se incrementa la concentración del sustrato. Para la determinación de las

constantes de semisaturación en inhibición se ajustan estos datos experimentales con la siguiente ecuación:

Ec.- 82

Se deben realizar experimentos a diferentes pH, ya que este determina la proporción relativa de  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$  mediante el equilibrio químico, y con el cálculo de las concentraciones de ambos componentes en cada ensayo se podrá determinar qué función ajusta mejor a los resultados, OUR vs  $\text{NH}_3$  o OUR vs  $\text{NH}_4^+$ . Los rangos de concentración de sustrato y pH a estudiar en estos ensayos, dependen nuevamente de los valores a los que están aclimatadas las bacterias estudiadas.

#### 5.2.2.2 Determinación de la constante de inhibición por $\text{HNO}_2$ .

Determinada la concentración de amonio óptima para el desarrollo de las bacterias amonioxidantes se puede proceder a la determinación de la inhibición de estas bacterias por el ácido nitroso producido en la oxidación del amonio. Los ensayos en este caso consisten en una primera adición de nitrito para activar al máximo la actividad de las bacterias nitritoxidantes y una posterior adición de nitrito (variable en cada ensayo) junto con la concentración de sustrato (amonio) óptima determinada en los ensayos previos (Figura 42).

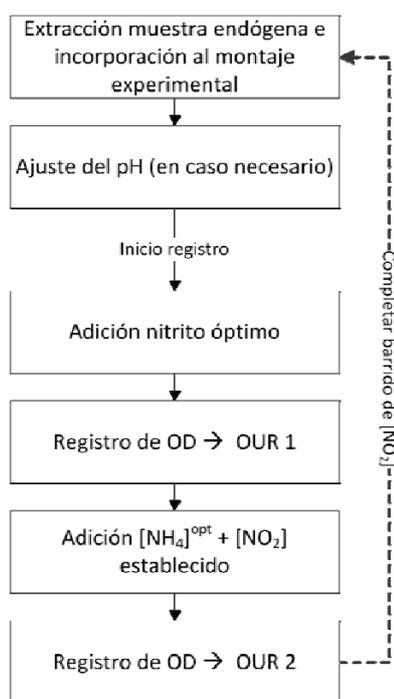


Figura 42. Esquema básico a seguir para la determinación de la constante de inhibición del  $\text{HNO}_2$  de las bacterias amonioxidantes.

Como se ha comentado en el apartado anterior es importante conocer el pH al que se realiza cada ensayo para poder determinar mediante el equilibrio la concentración de ácido nitroso en cada uno de los casos.

Para determinar la constante de inhibición por ácido nitroso la función con la que se ajusta los datos experimentales obtenidos es:

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{K_{I,HNO2}}{S_{HNO2} + K_{I,HNO2}} \quad \text{Ec.- 83}$$

### 5.2.2.2.3 Determinación de la constante de semisaturación de oxígeno.

En esta determinación es necesario llevar a cabo dos ensayos consecutivos que consisten en:

- ✓ *Experimento 1*, con adición de nitrito para observar el consumo de oxígeno por parte de las bacterias nitróxidas.
- ✓ *Experimento 2*, con adición de amonio y nitrito para observar el consumo de oxígeno por el conjunto de bacterias, amonioxidas y nitróxidas.

El proceso en estos 2 experimentos respirométricos es el mismo que el descrito en el apartado 5.2.2.1.3 para las bacterias nitróxidas. Para obtener la constante  $K_{O_2}$  se ajustaría el resultado obtenido en el experimento 2 mediante la siguiente función:

$$-\frac{dS_{O_2}}{dt} = K \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} + f^{end+nit}(O_2) \quad \text{donde} \left\{ \begin{array}{l} K \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \text{ consumo AOB} \\ f^{end+nit}(O_2) \text{ consumo act. endógena} \\ \text{y NOB} \end{array} \right\}$$

Integración por diferencias finitas:  $-\frac{\Delta S_{O_2}}{\Delta t} = K \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} + f^{end+nit}(O_2)$

$$-\frac{(S_{O_2}^{t+\Delta t} - S_{O_2}^t)}{\Delta t} = K \cdot \frac{S_{O_2}^t}{K_{O_2} + S_{O_2}^t} + f^{end+nit}(O_2) \quad \text{despejando}$$

$$S_{O_2}^{t+\Delta t} = S_{O_2}^t - K \cdot \frac{S_{O_2}^t}{K_{O_2} + S_{O_2}^t} \cdot \Delta t - f^{end+nit}(O_2) \cdot \Delta t \quad \text{Ec.- 84}$$

El término  $f^{end+nit}(O_2)$  de la ecuación representa la actividad de la biomasa en condiciones endógenas y el consumo de oxígeno por parte de las bacterias nitróxidas, el cual se corresponde con el resultado obtenido en el primer experimento con adición de nitrito.

#### 5.2.2.2.4 Determinación de las constantes de inhibición del pH.

Para la determinación de las constantes de inhibición por pH se deben realizar ensayos similares a los descritos en el apartado 5.2.2.2.1. En estos ensayos se añade siempre la misma concentración de amonio mientras que el pH se ajusta a un valor diferente en cada nueva muestra hasta completar un rango de valores adecuado (Figura 43).

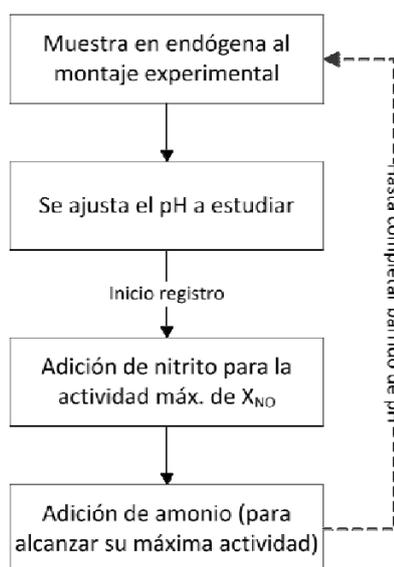


Figura 43. Esquema básico de los ensayos para determinación de las constantes de pH de las bacterias amonioxidantes.

Con estos experimentos se analiza la velocidad máxima de consumo de amonio por parte de las bacterias amonioxidantes a diferentes pH (se recomienda un rango de pH de 6 a 9 aproximadamente), observándose cómo se modifica la velocidad de oxidación del amonio conforme se cambia el pH del medio. Las constantes de inhibición por pH se obtendrán mediante el ajuste de los resultados experimentales con la siguiente función:

Ec.- 85

#### 5.2.2.2.5 Determinación del rendimiento celular de las bacterias.

La metodología a seguir en la determinación de este parámetro es similar a la descrita para las bacterias nitritoxidantes. Consiste en adicionar una cantidad de amonio determinada al reactor y registrar el consumo de oxígeno disuelto hasta que el valor de la OUR se mantenga prácticamente constante. A lo largo del experimento se extraen muestras para analizar la

evolución de la concentración del amonio y se calcula el OD consumido durante la oxidación del amonio mediante el cálculo del área bajo la curva registrada de OUR frente al tiempo.

A partir del ensayo con adición de amonio se determina el rendimiento del conjunto de las bacterias autótrofas nitrificantes ( $Y_{AUT}$ ) aplicando la siguiente expresión:

$$\frac{NH_4^+ \text{ consumido}}{O_2 \text{ consumido}} = \frac{1 + i_{NBM} \cdot Y_{AUT}}{4.57 - Y_{AUT}} \rightarrow Y_{AUT} = \frac{4.57 \cdot NH_4^+ \text{ cons} - O_2 \text{ cons}}{NH_4^+ \text{ cons} + i_{NBM} \cdot O_2 \text{ cons}} \quad \text{Ec.- 86}$$

Mediante la diferencia entre este parámetro y el rendimiento determinado para las bacterias nitritoxidantes se obtiene el rendimiento celular de otro grupo de bacterias autótrofas nitrificantes, las bacterias amonioxidantes ( $Y_{NH}$ ).

#### 5.2.2.2.6 Determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias.

Para la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias se sigue el mismo procedimiento que para las bacterias nitritoxidantes despejando la constante  $\mu$  de la ecuación Ec.- 87. El dato de  $OUR_{max}$  es determinado de los ensayos para la determinación de las constantes de semisaturación e inhibición del amonio, mientras que la concentración de bacterias debe ser obtenida aplicando el método de Borrás L. (2008) en muestras del mismo fango usado en los ensayos de calibración.

$$OUR_{max} = \mu_{NH}^{max} \cdot X_{NH} \cdot \frac{3.43 - Y_{NH}}{Y_{NH}} \quad \text{Ec.- 87}$$



C  
A  
P  
I  
T  
U  
L  
O  
  
6

---

***Resultados y discusión de la  
calibración de parámetros.***



## **6 Resultados y discusión de la calibración de parámetros.**

En este apartado se recogen, en primer lugar, los resultados experimentales obtenidos durante la aplicación de las metodologías de calibración desarrolladas en este trabajo de tesis. A partir de estos resultados se han determinado mediante los ajustes correspondientes los parámetros cinéticos y estequiométricos de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes, incluidas en el modelo desarrollado. Además, los resultados obtenidos durante el proceso de calibración han llevado a la modificación del modelo inicial para que éste reprodujese adecuadamente los datos experimentales. Este capítulo se divide en tres partes:

- a) Resultados y discusión del proceso de calibración de los parámetros de las bacterias amonioxidantes desarrolladas en el reactor SHARON a escala laboratorio con nitrificación parcial. La metodología seguida en la calibración en este reactor implica ensayos para la determinación de los parámetros de las únicas bacterias presentes en el mismo.
- b) Resultados y discusión del proceso de calibración de los parámetros de las bacterias que llevan a cabo el proceso de nitrificación en la planta piloto para tratamiento de aguas residuales. En este caso la metodología de calibración incluye ensayos para la determinación de los parámetros de los dos grupos de bacterias involucradas en el proceso de nitrificación (amonioxidantes y nitritoxidantes). Los ensayos de calibración se realizaron para los dos esquemas de operación estudiados en la planta (con y sin reactor BABE). Como se podrá comprobar en los resultados, los valores de los parámetros no se modificaron cuando se eliminó el reactor BABE del sistema de tratamiento, a excepción de la velocidad máxima de crecimiento que sufrió un incremento considerable en ambos grupos de bacterias cuando el reactor BABE dejó de operar.
- c) Comparación de los parámetros de las bacterias amonioxidantes obtenidos en la calibración en los dos sistemas estudiados. Únicamente es posible analizar las diferencias en estas bacterias, ya que, como se ha comentado, las bacterias nitritoxidantes sólo se desarrollaban en la planta piloto.

## **6.1 Calibración de bacterias amonioxidantes presentes en un Reactor SHARON a escala laboratorio.**

En este apartado se recogen los resultados obtenidos en los ensayos realizados siguiendo la metodología experimental desarrollada en el apartado 5.1 (página 146) de este trabajo de tesis, para la calibración de los parámetros de las bacterias amonioxidantes desarrolladas en el reactor SHARON operado en el laboratorio.

### **6.1.1 Constante de semisaturación del oxígeno ( $K_{O_2}$ ) de las bacterias amonioxidantes.**

Siguiendo el proceso descrito en el apartado 5.1.1 (página 147) se han realizado tres experiencias en días diferentes cuyos resultados se muestran en la Figura 44. En esta figura se puede apreciar el descenso del oxígeno disuelto a medida que transcurría el experimento, además se puede ver que los experimentos se llevaron a cabo a una concentración de OD inicial y un pH diferentes.

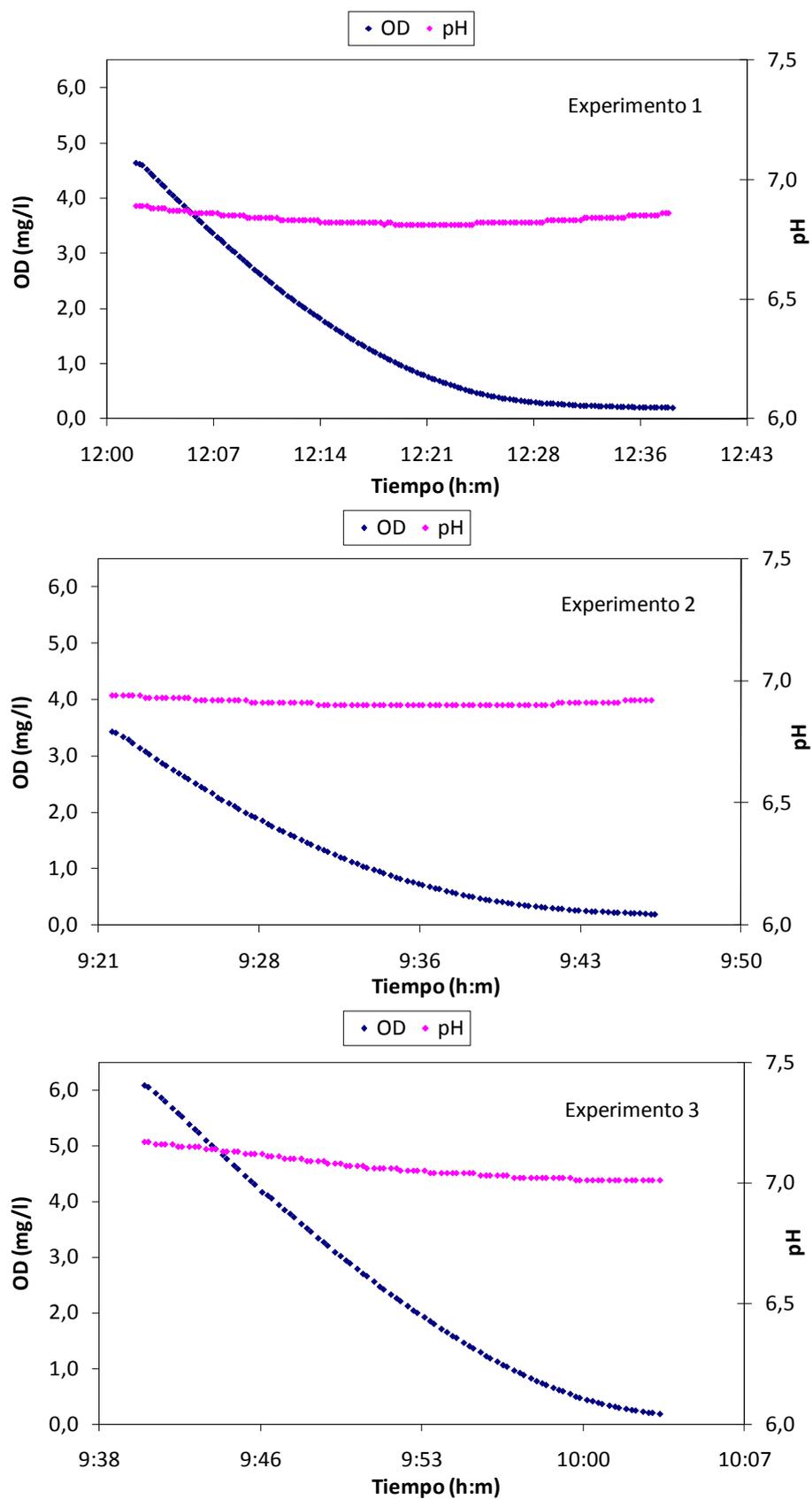


Figura 44. Resultados experimentales de los ensayos para la determinación de la constante  $K_{O_2}$  en el reactor SHARON.

Teniendo en cuenta el desarrollo descrito en la página 148, para determinar la constante de semisaturación del oxígeno se realizó un ajuste a la concentración de OD experimental empleando la siguiente ecuación:

$$S_{O_2}^{t+\Delta t} = S_{O_2}^t - K \cdot \frac{S_{O_2}^t}{K_{O_2} + S_{O_2}^t} \cdot \Delta t \quad \text{Ec.- 88}$$

Tomando como primer dato la concentración de OD inicial de cada experimento y variando los valores de K y  $K_{O_2}$  para ajustar el OD calculado al experimental, se ha obtenido un resultado adecuado en los tres experimentos empleando la misma constante de semisaturación del oxígeno. En la Figura 45 se muestra como las predicciones del modelo reproducen adecuadamente los resultados experimentales. En la Tabla 32 se presenta los valores de las constantes obtenidas en cada caso.

Experimento	Constante K	Constante $K_{O_2}$ (mg $O_2$ /l)	pH medio
(1)	0.0055	1.45	6.83
(2)	0.0060	1.45	6.91
(3)	0.0080	1.45	7.07

Tabla 32. Valores de las constantes obtenidas en el ajuste para la determinación de  $K_{O_2}$  y pH medio registrado en cada uno de los ensayos realizados.

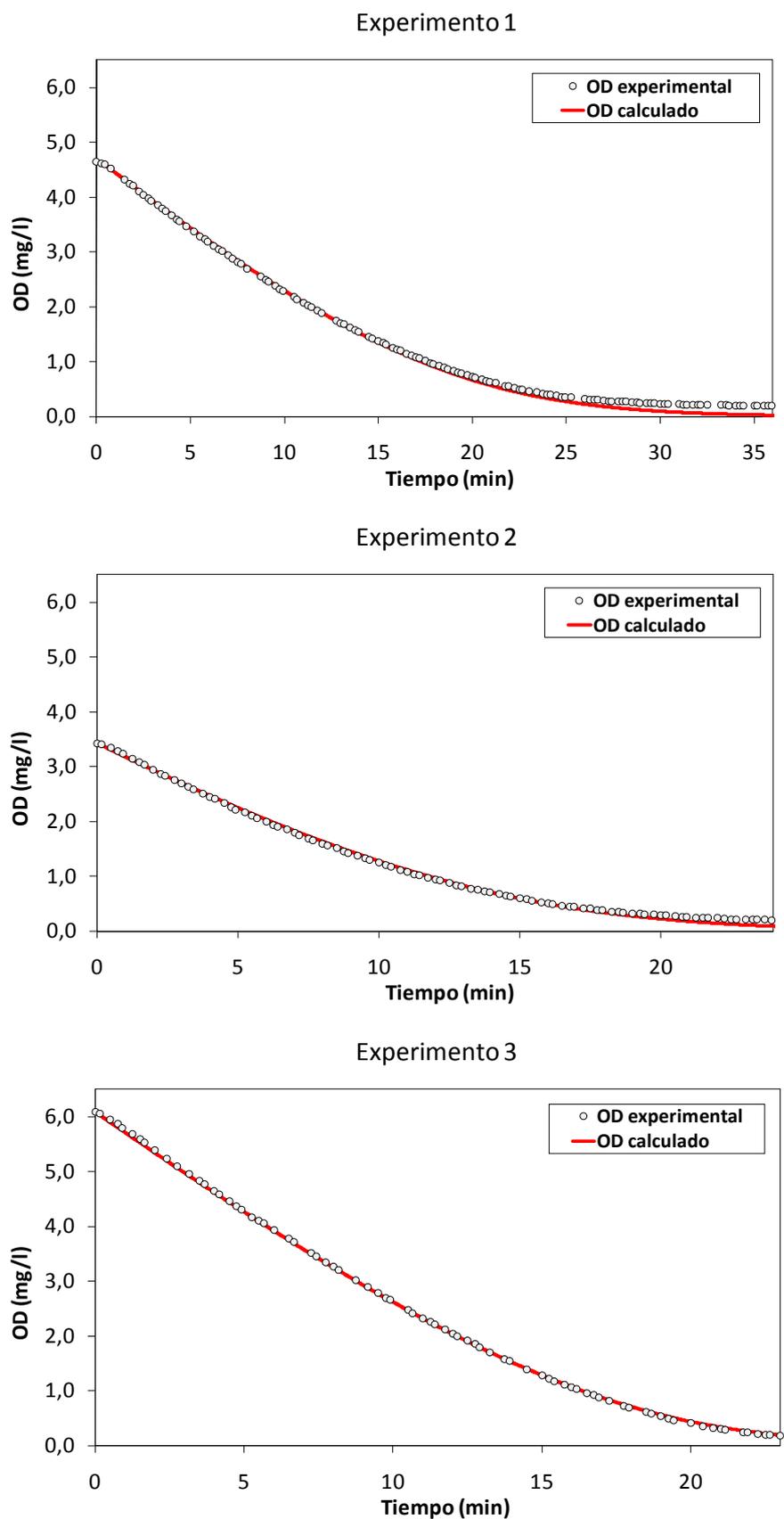


Figura 45. Resultados del ajuste del modelo a la evolución del OD determinado en los experimentos.

Como se puede ver en la Tabla 32, en el procedimiento descrito se ha obtenido una  $K_{O_2} = 1.45 \pm 0.06$  mg  $O_2/l$ . En la Tabla 33 se compara el valor de  $K_{O_2}$  estimado en este trabajo de investigación con valores de esta constante encontrados en la bibliografía consultada. El valor estimado en este estudio es considerablemente mayor que el valor propuesto en los modelos ASM (Henze *et al*, 2000) y el determinado en la mayor parte estudios previos. Sin embargo, Hellinga *et al.* (1999) y Sánchez *et al.* (2001) también obtuvieron valores de  $K_{O_2}$  altos en sus investigaciones. Estas diferencias probablemente son debidas a las condiciones de operación en cada uno de los estudios, ya que según el sistema operado se favorece el desarrollo de especies diferentes. Además, se suma a este hecho la propia aclimatación de las bacterias a las condiciones del sistema.

<b>Constante <math>K_{O_2}</math> (mg <math>O_2/l</math>)</b>	<b>Referencia</b>
1.45 ± 0.06	Esta tesis
0.74	Guisasola <i>et al.</i> , (2005)
1.45	Hellinga <i>et al.</i> , (1999)
0.9	Volcke <i>et al.</i> , (2006)
0.94	Van Hulle <i>et al.</i> , (2007)
1.66	Sánchez <i>et al.</i> , (2001)
0.6	Wiesmann <i>et al.</i> , (1994)
0.5	EPA (1993)
0.4	Henze <i>et al.</i> , (2000)
0.16	Hunik <i>et al.</i> , (1994)
0.3	Nowak <i>et al.</i> , (1995)

**Tabla 33. Valores de de  $K_{O_2}$  determinados en esta tesis y en otros estudios consultados.**

El valor de la constante K presenta ligeras variaciones en cada experimento debido a que en esta constante se engloban el resto de parámetros que afectan a la OUR. Aunque casi todos los parámetros englobados en esta constante se considera que no varían entre los distintos experimentos, entre ellos se encuentra el valor de la concentración de bacterias presentes en el medio, que puede variar según el momento en que fue realizado el experimento.

Además de diferentes concentraciones de bacterias los experimentos se realizan a pH ligeramente diferentes, lo que afectará también a la variación de la OUR y por tanto al valor de la constante K ajustada. Como se puede ver en la Figura 44 y en la Tabla 32 el pH del sistema aumenta del experimento (1) al (3); y se puede apreciar también en la tabla que el valor de K aumenta del experimento (1) al (3), lo que muestra cierta correlación con el incremento de pH observado. En estos datos se observa un incremento de la K de casi un 50 % al pasar de pH 6.83 a 7.07. Este gran ascenso de la actividad, aunque en su mayoría puede ser debido a una mayor concentración de bacterias, también es atribuible al ascenso del pH

a pesar de ser un incremento tan pequeño. Como se puede ver en los resultados del apartado 6.1.4 (pg. 194) en este rango de pH hay ensayos donde la actividad de las bacterias aumentó en casi un 20 % al pasar de pH 6.8 a 7.1. Por otro lado, como también se verá en el apartado mencionado, el pH del reactor SHARON R<sub>1</sub> en el momento de llevar a cabo el experimento puede dar lugar a importantes cambios en el pH óptimo de las bacterias. Así, para un pH de 6.8 hay experimentos en los que las bacterias se encontraban a un 60 % de su actividad máxima, mientras que en otros la actividad alcanzaba hasta un 85 % de la máxima.

**6.1.2 Constantes de semisaturación e inhibición del amoníaco ( $K_{NH_3}/K_{INH_3}$ ) de las bacterias amonioxidantes.**

Para la determinación de las constantes  $K_{NH_3}$  y  $K_{INH_3}$  de la ecuación cinética del proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes se han realizado los ensayos descritos en el apartado 5.1.2 (página 148). Se han llevado a cabo un total de 7 experimentos a 4 niveles de pH diferentes: 6.5 (experimentos 1 y 2), 7.0 (experimentos 3 y 4), 7.5 (experimentos 5 y 6) y 8.1 (experimento 7). A lo largo de estos experimentos la actividad de la biomasa (medida como OUR) fue registrada a diferentes concentraciones de amonio desde 45 a 10000 mg N-NH<sub>4</sub>/l, utilizando cloruro amónico (NH<sub>4</sub>Cl) como fuente del sustrato. El registro de OUR se mantuvo en cada nivel de amonio durante aproximadamente una hora antes de añadir más sustrato. La Tabla 34 muestra las concentraciones de TAN evaluadas en cada experimento.

Concentración de TAN (N-NH <sub>4</sub> mg/l)						
Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Exp. 7
pH 6.5	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.0	pH 7.5	pH 7.5	pH 8.1
70	100	63	300	300	45	45
95	250	95	800	800	250	190
300	550	150	1100	1100	600	534
2100	950	950	1500	1500	1000	1055
5000	1200	2500	2100	2100	1400	1490
10000	1500	5500	4100	4100	2000	1900
	1800	10000	8100	6000	2800	2350
	2200				4000	2770
	4000					
	7000					

**Tabla 34. Concentraciones de TAN (mg N-NH<sub>4</sub>/l) evaluadas en cada experimento.**

La Figura 46 muestra la evolución con el tiempo de la OUR y el pH en los diferentes niveles de amonio examinados a lo largo del experimento 3 (realizado a pH 7.0). La OUR medida en todos los experimentos descritos en la calibración del reactor SHARON es corregida, cuando

es necesario, teniendo en cuenta el volumen de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  añadido para el control de pH además del volumen evaporado a lo largo del experimento. Como se observa en este experimento la OUR registrada aumenta a medida que se incrementa la concentración del sustrato añadido hasta alcanzar la actividad máxima de las bacterias amonioxidantes a una concentración de 950 mg N-NH<sub>4</sub>/l. La actividad se mantiene en su valor máximo hasta que se incrementa la concentración del sustrato a 5500 mg N-NH<sub>4</sub>/l. A partir de esta concentración de TAN la OUR experimenta una clara reducción. En el resto de experimentos se obtuvieron resultados similares. Al inicio de cada experimento, se observó un incremento de la actividad a medida que se incrementaba el sustrato presente y había un rango de concentración donde se mantenía esta actividad máxima; pero, finalmente, se llegaba una concentración en que la OUR empezaba a descender de forma drástica.

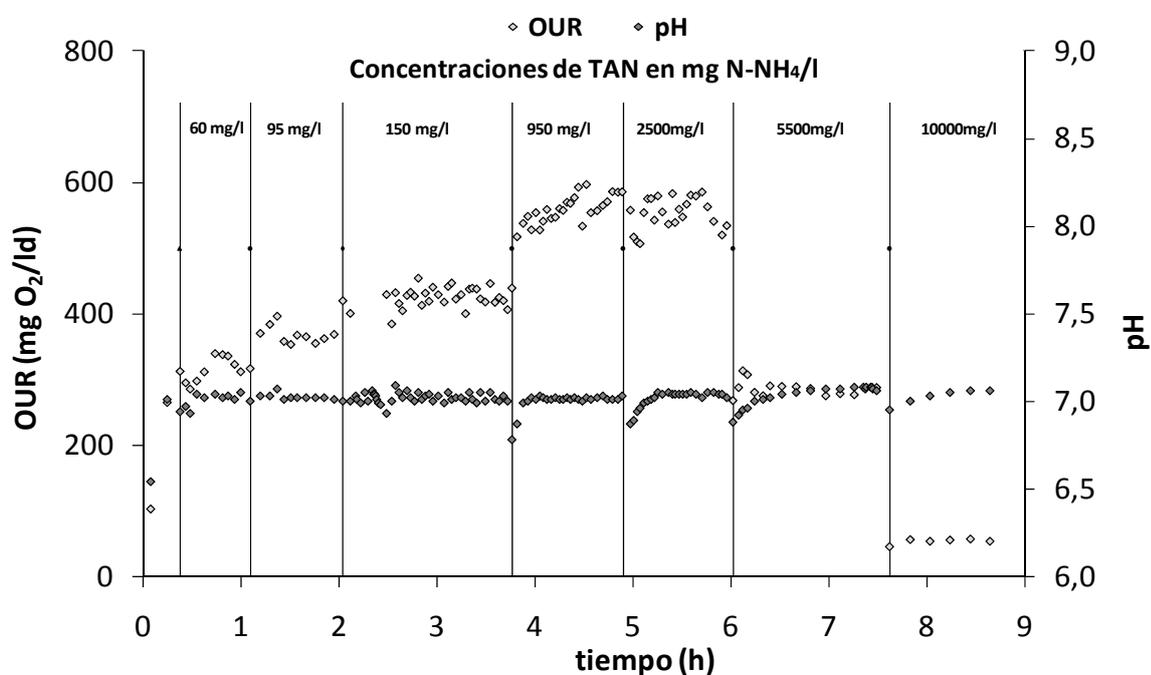


Figura 46. Evolución de la OUR (mg O<sub>2</sub>/ld) con el tiempo a las concentraciones de TAN (mg N-NH<sub>4</sub>/l) evaluadas en el ensayo respirométrico nº 3 llevado a cabo a pH 7.

Dado que la OUR medida se mantiene relativamente constante para cada nivel de TAN evaluado, el análisis de resultados está basado en el valor medio de OUR para cada nivel. Puesto que los experimentos se realizaron en condiciones diferentes (pH, muestras de días diferentes, concentraciones de TAN evaluadas,...) la OUR máxima alcanzada también fue diferente entre los distintos experimentos realizados. Por consiguiente, para poder comparar los efectos de las diferentes concentraciones de TAN en los experimentos llevados a cabo a diferentes valores de pH, la actividad de las bacterias se normaliza y se expresa como un porcentaje de la OUR máxima registrada en cada ensayo. Además, aunque las medidas realizadas son de TAN (mg N-NH<sub>4</sub>/l) se ha calculado también, en todos los

experimentos y en cada uno de los niveles, la concentración equivalente de NH<sub>3</sub> por medio del equilibrio químico.

En la Tabla 35 se puede ver las concentraciones de TAN y de NH<sub>3</sub> evaluadas en los ensayos, y la velocidad de consumo de oxígeno medida para cada concentración. La Figura 47 muestra los resultados de la actividad de las bacterias amonioxidantes frente a la concentración de TAN (gráficas superiores) y frente a la concentración de amoníaco (gráficas inferiores) para todos los experimentos realizados. Las gráficas (a) y (c) muestran el rango completo de concentraciones examinadas, mientras que las gráficas (b) y (d) muestran la actividad de las bacterias a concentraciones bajas para poder observar mejor la afinidad de las bacterias por el sustrato. Al analizar las gráficas (b) y (d) se puede concluir que el amoníaco es el verdadero sustrato de las bacterias amonioxidantes, ya que en todos los experimentos realizados a pH diferentes, se observa el mismo patrón de ascenso de la actividad conforme se incrementa la concentración de NH<sub>3</sub> independientemente del pH. En la Figura 47 (b) se observa que, a bajas concentraciones de TAN, para una misma concentración de, por ejemplo, 100 mg N-NH<sub>4</sub>/l la OUR oscila entre aproximadamente un 40 y un 95 %, por lo tanto, este no es el sustrato de las bacterias ya que con una misma concentración se obtienen actividades muy diferentes. El valor de la constante de semisaturación para el amoníaco fue determinado ajustando la ecuación Ec.- 89 a los resultados experimentales de la Figura 47 (d).

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{S_{NH3}}{S_{NH3} + K_{NH3}} \quad \text{Ec.- 89}$$

Con dicho ajuste se obtuvo un valor de la constante de  $K_{NH3} = 0.32$  mg N-NH<sub>3</sub>/l, el cual está en concordancia con valores propuestos por otros autores como Hellinga *et al.*, 1998 (con una constante de 0.46 g N-NH<sub>3</sub>/m<sup>3</sup>) y Ciudad *et al.*, 2006 (con un valor de 0.3 g N-NH<sub>3</sub>/m<sup>3</sup>).

	mg N-NH <sub>4</sub> /l	mg N-NH <sub>3</sub> /l	OUR (%)
pH = 6.5	70	0,18	51,3
	95	0,24	59,8
	100	0,26	44,6
	250	0,64	63,3
	300	0,76	80,0
	550	1,40	78,2
	950	2,42	87,3
	1200	3,05	95,0
	1500	3,82	95,6
	1800	4,58	100,0
	2100	5,35	100,0
	2200	5,60	96,8
	5000	12,73	70,8
10000	25,46	9,0	
pH = 7.0	63	0,51	57,7
	95	0,76	64,9
	150	1,20	77,5
	300	2,40	88,7
	800	6,41	98,2
	950	7,61	100,0
	1100	8,81	100,0
	1500	12,01	98,2
	2100	16,82	96,4
	2500	20,02	99,6
	4100	32,83	72,7
	5500	44,01	51,7
	10000	80,09	9,9
pH = 7.5	45	1,12	73,7
	250	6,22	89,6
	300	7,47	95,2
	600	14,94	97,0
	800	19,92	100,0
	1000	24,89	100,0
	1100	27,38	99,7
	1400	34,85	100,0
	1500	37,34	99,6
	2000	49,78	95,5
	2100	52,28	95,5
	2800	69,70	86,6
	4000	99,57	74,6
4100	102,07	65,0	
pH = 8.1	45	5,62	92,9
	190	23,74	92,9
	534	66,72	92,9
	1055	131,81	100,0
	1490	186,16	100,0
	1900	237,38	100,0
	2770	346,08	80,0

Tabla 35. Concentraciones de TAN y NH<sub>3</sub>, y OUR (en %) a cada pH evaluado.

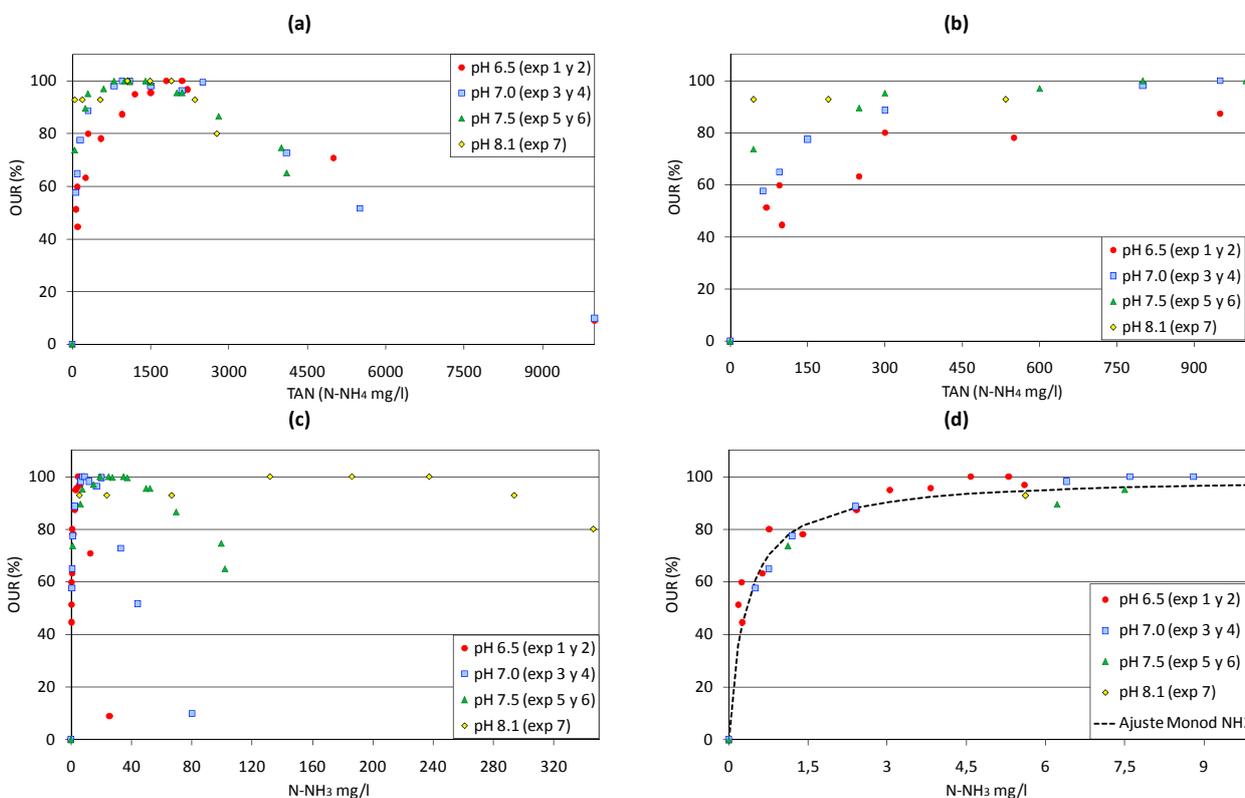


Figura 47. Actividad de las bacterias amonioxidantes expresada en porcentaje de la OUR máxima frente a la concentración de TAN (a y b) y la concentración de amoníaco (c y d).

En la Figura 47 (c) se puede observar que no existe inhibición del proceso por altas concentraciones de amoníaco a los diferentes valores de pH evaluados. Esto se observa claramente en el experimento realizado a pH 8.1 (experimento 7), dado que en este caso se alcanzan las máximas concentraciones de amoníaco y no se observa prácticamente inhibición. Además la actividad de las bacterias observada a, por ejemplo, 30 mg N-NH<sub>3</sub>/l va desde un 0 % a pH 6.5 hasta una actividad máxima del 100 % a un pH de 7.5. Sin embargo, si se observa la Figura 47 (a) parece que las altas concentraciones de TAN (N-NH<sub>4</sub>/l) son el inhibidor real de las bacterias, ya que todos los experimentos siguen la misma tendencia de reducción de la OUR a todos los pH estudiados.

Para verificar la inhibición de la actividad de las bacterias AOB por altas concentraciones de TAN se realizaron otra serie de experimentos, con el objetivo de comprobar si este descenso de la actividad a altas concentraciones es debido al NH<sub>4</sub> o a la elevada salinidad como sugieren algunos autores (Hunik *et al.*, 1992; Mosquera-Corral *et al.*, 2005). Estos experimentos se realizaron empleando la misma metodología que los ensayos previos con NH<sub>4</sub>Cl, pero modificando la sal empleada (se usaron tanto otras sales de amonio como sales sin ion amonio). Las sales evaluadas en estos nuevos experimentos se pueden ver en la Tabla 36. En la Tabla 37 se puede ver las concentraciones de sal estudiadas en cada experimento.

	Sal empleada
<b>Experimento 8</b>	NaCl
<b>Experimento 9</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
<b>Experimento 10</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
<b>Experimento 11</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Experimento 12</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Experimento 13</b>	Mezcla 1:1 de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> :NaCl
<b>Experimento 14</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
<b>Experimento 15</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O

Tabla 36. Sales empleadas en los ensayos para determinar la inhibición por salinidad.

Concentración de sal (mol/l)							
*Adición inicial de NH <sub>4</sub> Cl para proporcionar sustrato a las bacterias.							
Exp.8	Exp.9	Exp.10	Exp.11	Exp.12	Exp.13	Exp.14	Exp.15
0.07*	0.006	0.010	0.005	0.006	0.005	0.07*	0.07*
	0.11	0.013	0.011	0.009	0.018	0.012	0.14
	0.15	0.021	0.02	0.021	0.064	0.026	0.18
	0.23	0.030	0.04	0.071	0.107	0.040	0.21
	0.31	0.045	0.08	0.136	0.142	0.076	0.25
	0.42	0.12	0.15	0.21	0.24	0.15	0.29
	0.54	0.20	0.22	0.32	0.43	0.18	0.32
		0.28	0.33	0.46	0.58	0.25	0.36
		0.35	0.44	0.71	0.78	0.29	0.39
		0.43	0.54				0.46
		0.51					
		0.59					

Tabla 37. Concentraciones de sal (mol/l) evaluadas en cada uno de los experimentos.

En los experimentos donde se utilizaba una sal sin amonio (exp. 8, 14 y 15), se necesitó añadir antes de comenzar el ensayo una concentración de 1000 mg TAN/l para proporcionar a las bacterias sustrato suficiente para evitar la limitación de su crecimiento. En estos casos se empleó cloruro de amonio. Todos los experimentos fueron realizados a un pH de 7 para poder compararlos entre sí, pudiendo descartar el efecto del pH.

La evolución de la OUR y el pH con el tiempo a lo largo de los experimentos 10 y 14 realizados con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente, se muestra en la Figura 48. Los experimentos realizados con sales de amonio (experimentos 9, 11, 12 y 13) mostraron resultados similares a los del experimento 10. En todos se observa que la actividad de las bacterias sigue una tendencia ascendente, debida al incremento de la concentración de sustrato disponible, hasta una concentración de la sal determinada (mol/l), punto en el cual las bacterias alcanzan su actividad máxima (en el caso del experimento 10 se alcanza a 0.22 M). La actividad de las bacterias se mantiene aproximadamente al máximo en un rango determinado de concentración por encima del cual, cada nueva adición de sal provoca una reducción paulatina de la actividad (la gráfica muestra, que en el experimento 10, a partir de una salinidad aproximada de 0.44 M el descenso de la OUR es mucho más acusado). En cambio, los experimentos realizados utilizando una sal sin amonio (experimento 8 y 15) presentan una representación similar a la del experimento 14 (Figura 48 inferior). En estos casos se parte de una actividad máxima debida a la adición inicial de 1000 mg/l de TAN. A partir de aquí la OUR va descendiendo debido al incremento de la concentración de sal.

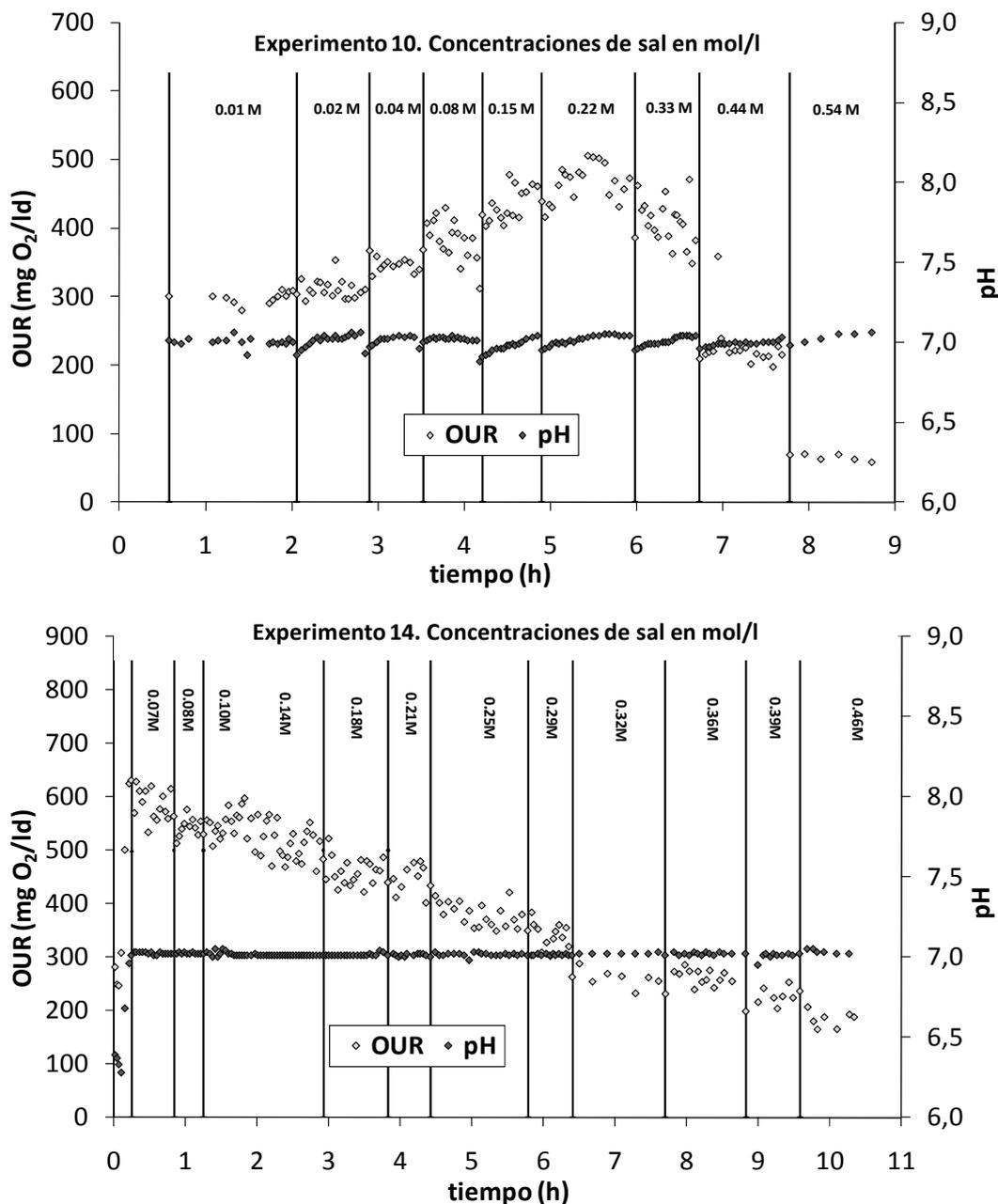


Figura 48. Evolución de la OUR (mg O<sub>2</sub>/ld) con el tiempo a las concentraciones de sal (mol/l) evaluadas en los ensayos respirométricos nº 10 y nº 14, llevados a cabo a pH 7.

Para observar la posible inhibición por salinidad en todos los experimentos (desde el experimento 1 al 15) se representó la OUR medida en función de la concentración de sal. En la Figura 49 se puede observar dicha representación. La principal conclusión que se extrae de estas gráficas es que se alcanza la misma reducción de la OUR a la misma concentración de sal, independientemente de la sal añadida, de la concentración de TAN en el experimento y del pH al que se realizó el experimento. Por lo tanto, la reducción de OUR observada en el primer grupo de experimentos usando solamente NH<sub>4</sub>Cl (ver Figura 47 (a)) es atribuida al aumento de salinidad en el medio y no al incremento en la concentración de TAN.

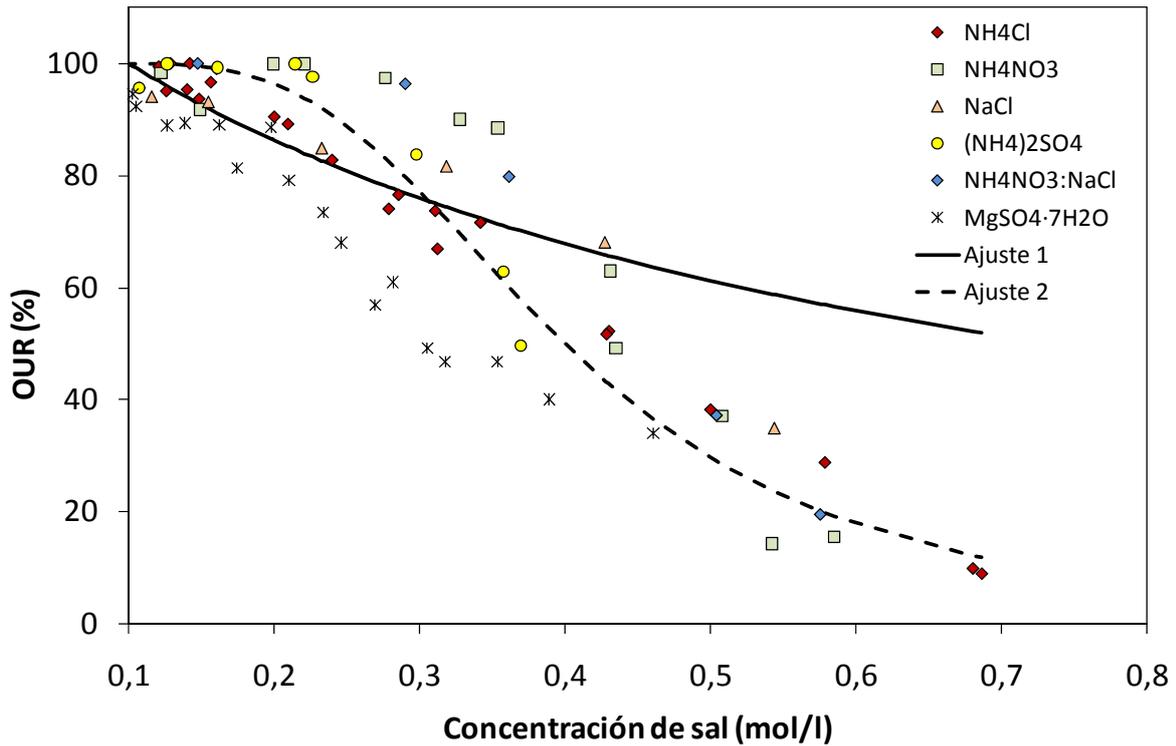


Figura 49. Evolución de la OUR (mg O<sub>2</sub>/ld) en función de la salinidad (mol/l) a lo largo de todos los experimentos realizados agrupados según la sal empleada (experimentos del 1 al 15).

A la vista de estos resultados se concluyó que no era el amonio, ni el amoníaco, ni la concentración total de nitrógeno amoniacal lo que inhibía la actividad de las bacterias. Los resultados mostraron que la salinidad del medio comienza a ejercer un efecto negativo sobre las bacterias antes de que se pueda apreciar una inhibición por sustrato (Claros *et al*, 2010).

Con los presentes resultados se tuvo que modificar el modelo para incluir un término de inhibición por salinidad y eliminar la función de inhibición por sustrato, propuesta en el modelo inicial. En un principio se propuso la función de inhibición no competitiva (Ec.- 90), pero al no obtener el ajuste adecuado se utilizó la función Hill (Ec.- 91) que dio mejores predicciones de los datos experimentales.

$$\text{Función de inhibición no competitiva} \rightarrow \frac{K_M}{K_M + S_M} \quad \text{Ec.- 90}$$

$$\text{Función Hill} \rightarrow \frac{K_M^n}{K_M^n + S_M^n} \quad \text{Ec.- 91}$$

En la Figura 49 se puede ver el resultado de los ajustes de dichas funciones de inhibición. Como se observa la función Hill reproduce mejor los resultados (Ajuste 2, Ec.- 91), que la inhibición no competitiva (Ajuste 1, Ec.- 90).

En la función Hill se eleva cada uno de los términos de ésta a una constante “n”. Aunque el parámetro “n” añadido no tiene sentido físico, esta segunda ecuación representa mucho mejor los resultados experimentales. Los valores de los parámetros obtenidos en el ajuste de esta nueva función de inhibición fueron de  $K_M = 0.3 \text{ mol/l}$  y  $n = 3$ .

### **6.1.3 Constante de inhibición del ácido nitroso ( $K_{I\text{HNO}_2}$ ) de las bacterias amonioxidantes.**

La determinación de la constante de inhibición por ácido nitroso se llevó a cabo con los experimentos descritos en el apartado 5.1.3 (página 151). En estos experimentos se añadió, antes de iniciar cada registro,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para proporcionar sustrato suficiente a las bacterias amonioxidantes, y excluir la limitación de la actividad por falta de amonio (según los resultados del apartado anterior se estableció como concentración de partida  $1000 \text{ mg/l}$  de TAN ( $\text{mg N-NH}_4/\text{l}$ )). El aumento progresivo de nitrito para estudiar su inhibición se consiguió mediante la adición al reactor de  $\text{NaNO}_2$  y se estudió un rango de valores de 0 hasta  $5000 \text{ mg/l}$  de  $\text{TNO}_2$  ( $\text{N-NO}_2/\text{l}$ ).

Se llevaron a cabo un total de 3 experimentos a 3 valores de pH diferentes (6.25, 6.50 y 7.00), optándose por valores más bajos que en los ensayos para el estudio del efecto del amoníaco, ya que, la concentración de ácido nitroso (cuyo efecto se pretende estudiar) será tanto mayor cuanto más bajo sea el pH, y por tanto, habrá que añadir menos cantidad de  $\text{NaNO}_2$  al reactor. La temperatura en los ensayos fue de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . A valores de pH por encima de 7 se necesitan unas concentraciones muy elevadas de nitrito para que la concentración de ácido nitroso pueda alcanzar valores que den lugar a la inhibición de las bacterias. En la Tabla 38 se presentan las concentraciones de nitrito evaluadas en cada uno de los experimentos y la Figura 50 muestra la evolución de la OUR y el pH en el tiempo para los distintos niveles de nitrito evaluados en el experimento realizado a pH 6.25. En los otros dos experimentos las gráficas obtenidas fueron similares a esta. Al inicio de los experimentos se tiene la actividad máxima registrada en cada ensayo, y a partir de ésta, la actividad va descendiendo a medida que se incrementa la concentración del nitrito añadido.

Concentración de TNO2 (mg N-NO <sub>2</sub> /l)/mg N-HNO <sub>2</sub> /l		
pH 6.25	pH 6.5	pH 7.0
170/0.189	95/0.059	75/0.015
350/0.389	200/0.125	550/0.109
500/0.556	550/0.344	1550/0.297
1000/1.112	1170/0.732	3000/0.911
1550/1.724	2000/1.251	4600/0.594
2000/2.224	3000/3.128	
	5000/1.878	

Tabla 38. Concentraciones de TNO2 (mg N-NO<sub>2</sub>/l) evaluadas en cada experimento.

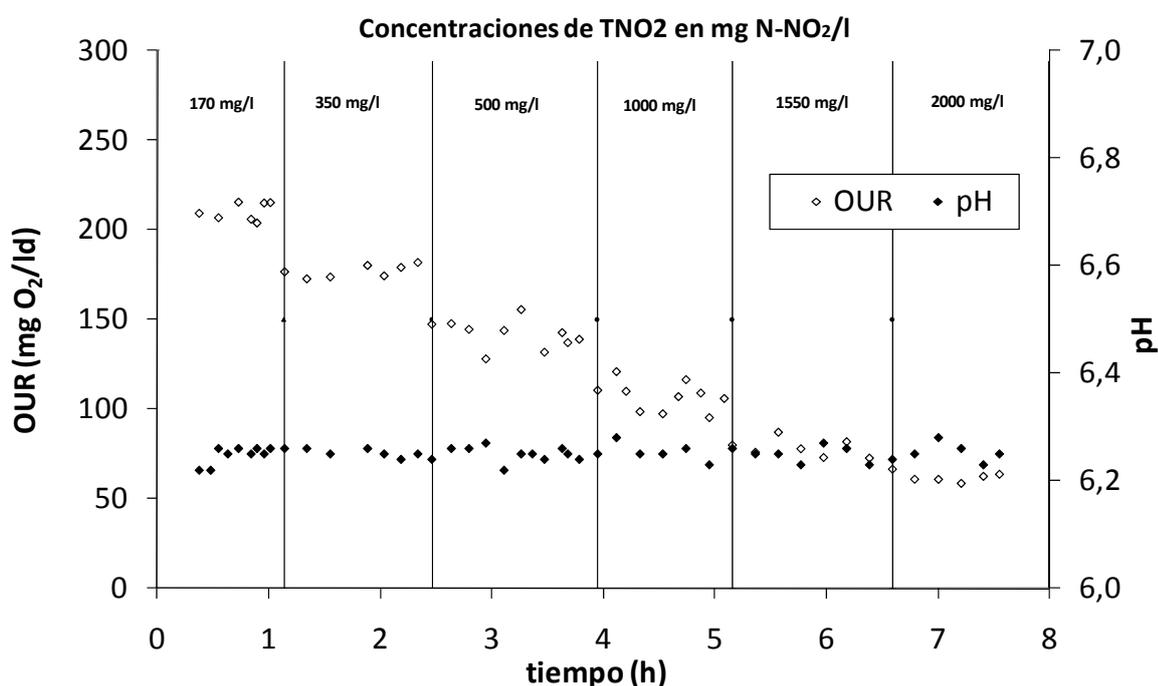
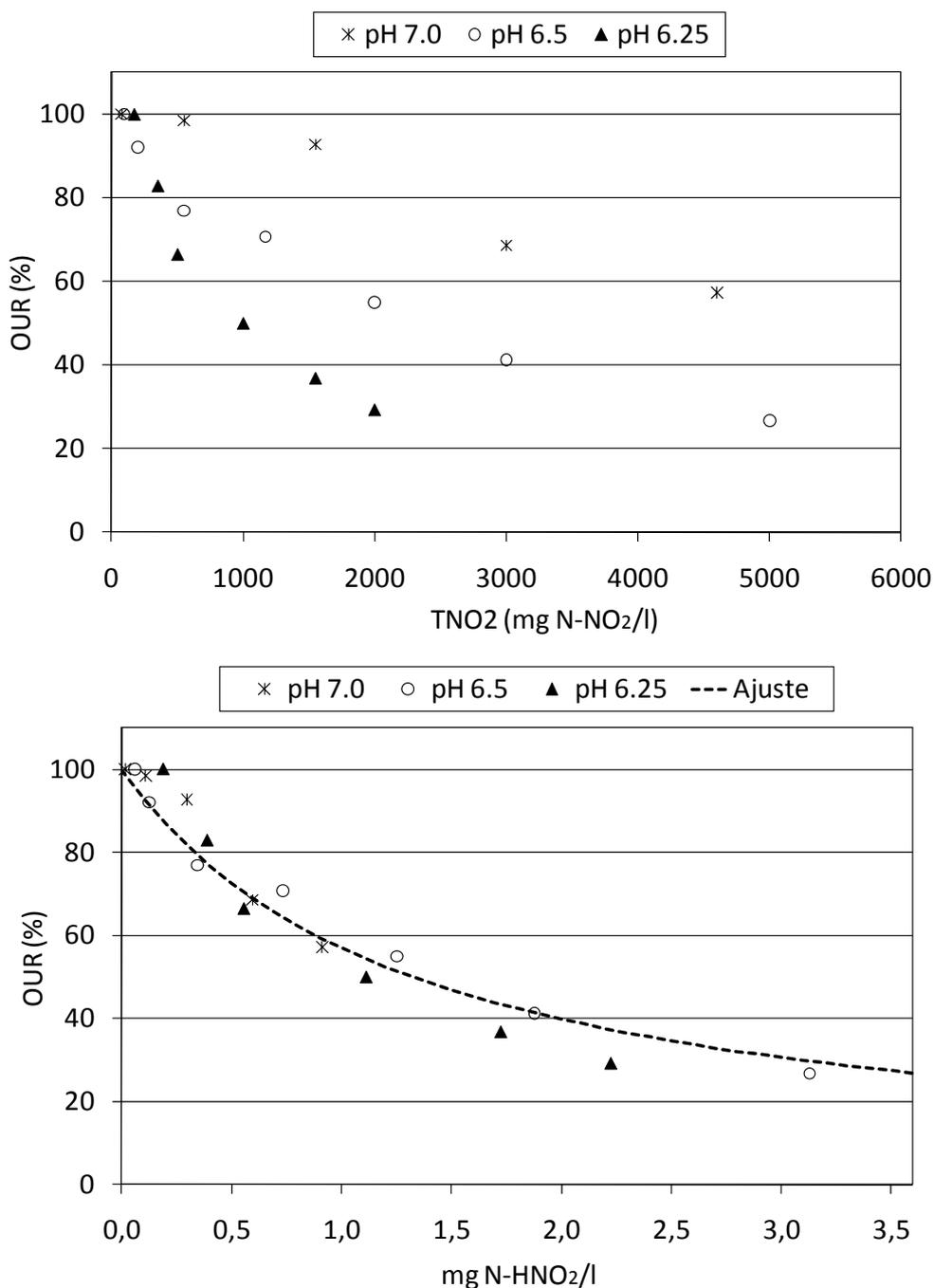


Figura 50. Evolución de la OUR (mg O<sub>2</sub>/ld) en el tiempo a las concentraciones de nitrito (mg N-NO<sub>2</sub>/l) evaluadas en el ensayo llevado a cabo a pH 6.25.

El tratamiento de los resultados obtenidos en los tres experimentos ha sido similar al de los experimentos con adición de amonio. Ya que la OUR medida se mantiene relativamente constante para cada nivel de TNO2 estudiado, se ha determinado valores medios de OUR para cada uno de estos niveles. Para poder comparar los efectos de las diferentes concentraciones de TNO2 en los experimentos llevados a cabo a diferentes valores de pH, la actividad de las bacterias se normaliza y se expresa como un porcentaje de la OUR máxima registrada en cada ensayo. Se ha representado la actividad de las bacterias (en porcentaje) frente a la concentración de TNO2 medida (mg N-NO<sub>2</sub>/l) y frente a la concentración de ácido nitroso (mg N-HNO<sub>2</sub>/l) calculada a partir del equilibrio ácido - base (ver Figura 51).



**Figura 51. Actividad de las bacterias amonioxidantes expresada en porcentaje de la OUR máxima frente a la concentración de TNO<sub>2</sub> (superior) y la concentración de ácido nitroso (inferior).**

Las gráficas muestran claramente que la inhibición es debida al ácido nitroso presente en el medio, ya que es en la Figura 51 (inferior) donde todos los experimentos siguen una misma tendencia de descenso de la actividad a medida que aumenta el ácido nitroso, independientemente del pH empleado en cada caso. En esta misma gráfica se ha representado el resultado de ajustar la función de inhibición no competitiva por ácido nitroso (Ec.- 92) a los resultados experimentales.

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \quad \text{Ec.- 92}$$

A partir de este ajuste se ha determinado un valor de la constante de inhibición por ácido nitroso de 1.32 mg N-HNO<sub>2</sub>/l. Esta constante tiene un valor mayor que el propuesto por algunos autores como Hellinga *et al.* (1999), lo que indica una mayor resistencia a la inhibición por el HNO<sub>2</sub>, posiblemente porque el fango del reactor SHARON está aclimatado a concentraciones de nitrito bastante altas. Aun así, el valor de la constante se encuentra dentro del rango 0.07-2.80 mg/l, que son los valores obtenidos de la bibliografía para esta constante (ver Tabla 31 de la página 145).

#### 6.1.4 Constantes de inhibición del pH (K<sub>H</sub>/K<sub>IH</sub>) de las bacterias amonioxidantes.

Para la determinación de la influencia directa del pH en la actividad de las bacterias se llevaron a cabo un total de 9 experimentos siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.1.4 (página 152) de la metodología de calibración. En cada uno de estos experimentos se estudió la actividad de las bacterias a medida que se realizaba un incremento del pH en el reactor de ensayos. Los valores de pH establecidos en todos experimentos fueron 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 y 9.0. En la Tabla 39 se muestra los valores de las concentraciones de amonio y nitrito empleadas en cada uno de los experimentos. Las concentraciones de amonio y nitrito fueron ajustadas usando NH<sub>4</sub>Cl y NaNO<sub>2</sub>, respectivamente.

Experimentos	Concentración inicial (mg/l)				M inicial (mol/l)
	TAN (N-NH <sub>4</sub> )	TNO2 (N-NO <sub>2</sub> )	(N-NH <sub>3</sub> )	(N-HNO <sub>2</sub> )	Salinidad
1	520	700	0.682	0.868	0.04
2	550	1000	0.560	1.644	0.05
3	550	2000	0.564	3.200	0.07
4	1100	1000	0.939	1.931	0.08
5	1100	4000	0.917	7.904	0.15
6	1100	4000	0.938	7.726	0.15
7	1150	500	1.024	1.033	0.08
8	1100	200	1.004	0.363	0.07
9	2000	2000	1.871	3.523	0.15

Tabla 39. Concentraciones de amonio y nitrito (mg/l) evaluadas en cada experimento.

En la Figura 52 se presentan los resultados del experimento nº 2, donde se observa la evolución de la OUR a medida que se incrementa el setpoint del pH. Tal y como muestra la Figura 52 conforme se incrementa el pH en el reactor también se tiene un incremento de la OUR hasta una actividad máxima a partir de la cual comienza a descender a medida que se sigue elevando el pH.

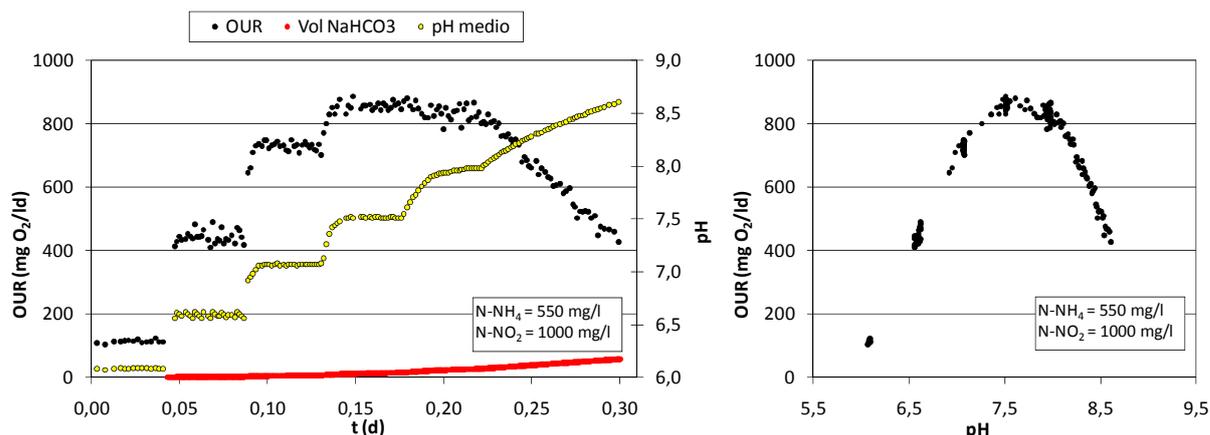


Figura 52. Resultado del experimento nº 2 para la calibración de las constantes de inhibición del pH. Evolución de la OUR con el tiempo (izquierda) y evolución de la OUR en función del pH (derecha).

Como muestra la Figura 52 , las bacterias amonioxidantes tienen un rango óptimo de pH para su crecimiento que viene descrito por los parámetros incluidos en el término  $I_{pH}$  del modelo desarrollado. Como se ha adelantado en el desarrollo del modelo, este término, en un principio tenía la forma que podemos ver en la Ec.- 93, pero tras analizar los resultados de los experimentos se estableció una nueva función de inhibición para las bacterias (Ec.- 94) que permitiese un mejor ajuste de los datos experimentales. La inhibición por pH descrita por la Ec.- 93 es una inhibición simétrica a ambos lados del pH óptimo de crecimiento. Sin embargo durante las experiencias realizadas para la calibración de los parámetros del modelo se observó que la inhibición por pH en estas bacterias es más acusada a pH altos que a pH bajos. La Ec.- 94 permite ajustar de forma asimétrica la inhibición por pH a ambos lados del pH óptimo gracias a las nuevas constantes  $A_H$  y  $A_{IH}$  que aparecen en la función.

$$I_{pH} = \frac{S_H}{K_H + S_H} \cdot \frac{K_{IH}}{K_{IH} + S_H} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad \text{Ec.- 93}$$

$$I_{pH} = \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad \text{Ec.- 94}$$

$K_H, K_{IH}$ = constantes de inhibición por pH bajo y alto, respectivamente (mol  $H^+$ /l).

En la Figura 53 se pueden ver dos de los experimentos ajustados con ambas funciones de pH. Se observa que, aunque el ajuste con la función Ec.- 93 es aceptable en ambos casos, la función sigmoideal mejora las predicciones de los resultados experimentales.

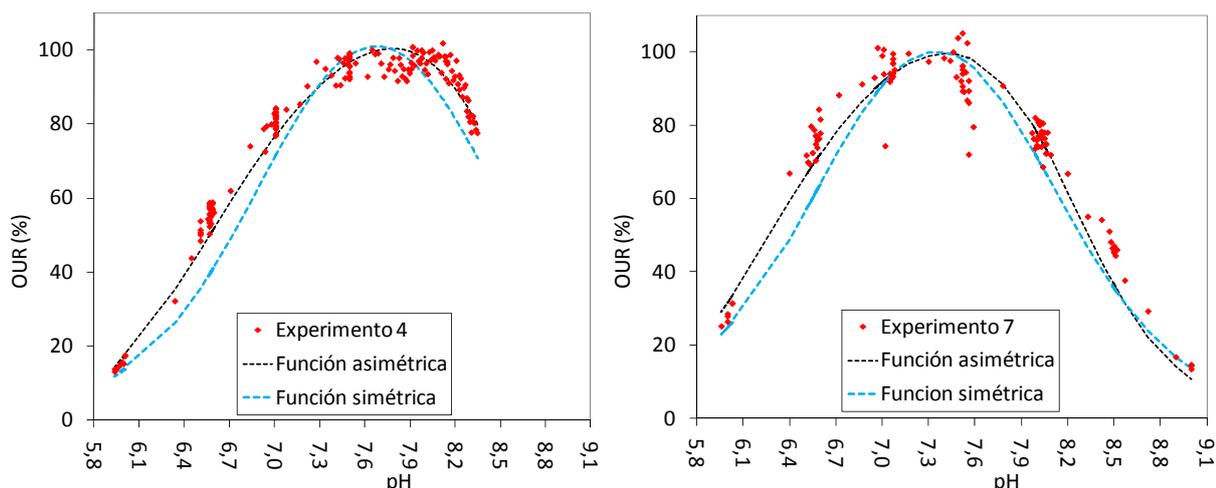


Figura 53. Ajuste de la función OUR-pH para dos de los experimentos usando una función con ajuste simétrico a ambos lados del pH óptimo y otra función con ajuste asimétrico.

Otra conclusión inmediata obtenida a la vista de los resultados obtenidos fue que el rango óptimo de pH era diferente para los distintos experimentos. En la Figura 54 se puede ver los resultados experimentales de todos los ensayos realizados. En esta figura se han representado valores medios de OUR en cada uno de los valores de pH examinados para evitar la aglomeración de puntos y ver con más claridad la diferencia entre los experimentos. Se observa que los resultados de los ensayos mostraban un comportamiento diferente ante el pH según el momento en que se realizaron (los experimentos 1 al 4 se realizaron antes, mientras que los experimentos de 5 al 9 se llevaron a cabo en un periodo posterior). Se puede ver claramente que los ensayos se agrupan en torno a dos valores óptimos de pH diferentes (los experimentos representados en rojo tienen un pH óptimo mayor que los otros).

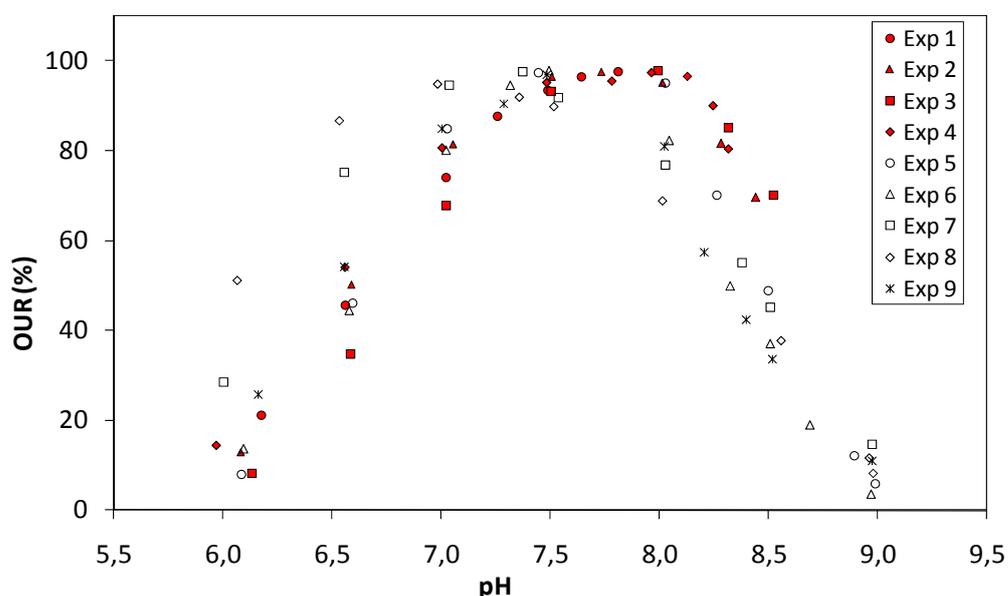


Figura 54. OUR medida (%) frente al pH en los 9 ensayos realizados.

Para la determinación de las cuatro constantes de la nueva función de inhibición por pH se ha realizado un ajuste del modelo a los resultados obtenidos en estos últimos experimentos de variación de pH usando los valores de los parámetros obtenidos en los apartados anteriores. Por tanto, la función a ajustar ha sido:

$$r = K \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + K_{NH_3}} \cdot \frac{K_M^n}{S_M^n + K_M^n} \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})}$$

Ec.- 95

$$r = K \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + 1.45} \cdot \frac{S_{NH_3}}{S_{NH_3} + 0.32} \cdot \frac{0.3^3}{S_M^3 + 0.3^3} \cdot \frac{1.32}{S_{HNO_2} + 1.32} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})}$$

Donde,

$$K = \mu_{NH}^{max} \cdot X_{NH} \cdot \frac{3.43 - Y_{NH}}{Y_{NH}}$$

Ec.- 96

Los parámetros a determinar mediante el ajuste de la Ec.- 95 son: K, A<sub>H</sub>, A<sub>IH</sub>, K<sub>H</sub> y K<sub>IH</sub>. El ajuste se realizó minimizando el error cuadrático medio entre los valores experimentales y las predicciones del modelo, realizando previamente para cada ensayo la simulación de la evolución de las concentraciones de NH<sub>3</sub> y HNO<sub>2</sub> (mediante el equilibrio químico con las concentraciones de TAN y TNO<sub>2</sub>, respectivamente), así como de la salinidad del medio en mol/l.

En la Tabla 40 se muestran los valores de todos los parámetros obtenidos tras el ajuste y en la Figura 55 se compara las predicciones del modelo con los resultados experimentales para todos los experimentos. Como se puede ver el modelo reproduce adecuadamente los resultados experimentales de todos los ensayos.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4	Experimento 5	Experimento 6	Experimento 7	Experimento 8	Experimento 9
<b>K</b>	1148	1393	1364	1275	1244	1275	1203	677	800
<b>K<sub>H</sub></b>	6.40	6.40	6.40	6.40	5.70	5.70	5.70	5.70	5.70
<b>K<sub>IH</sub></b>	8.55	8.55	8.55	8.55	8.20	8.20	8.20	8.20	8.20
<b>A<sub>H</sub></b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>A<sub>IH</sub></b>	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>pH<sub>opt</sub></b>	7.6-7.7	7.6-7.7	7.6-7.7	7.6-7.7	7.2-7.3	7.2-7.3	7.2-7.3	7.2-7.3	7.2-7.3

Tabla 40. Parámetros obtenidos en el ajuste del modelo desarrollado a los datos experimentales.

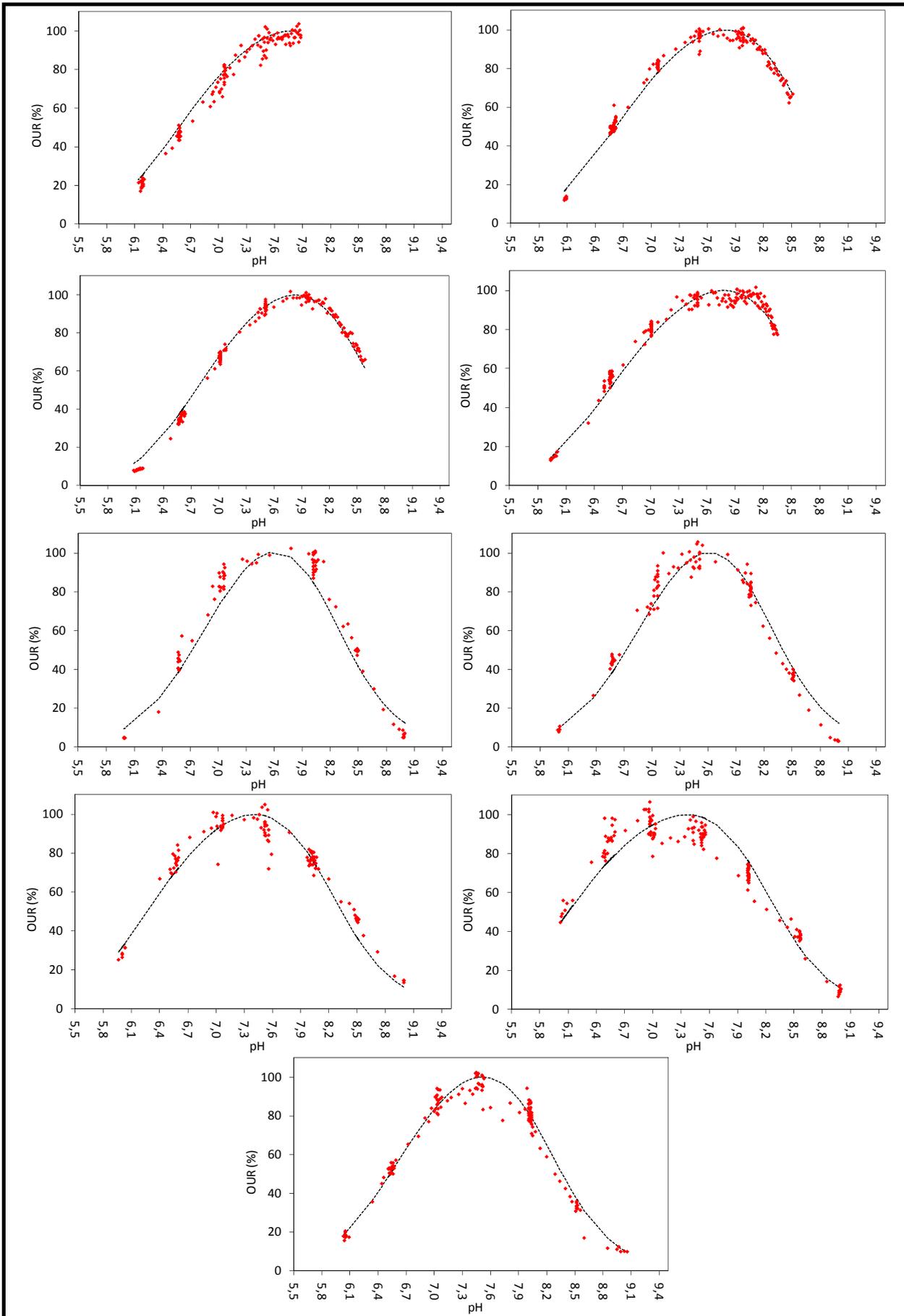


Figura 55. Ajuste del modelo matemático a los datos experimentales. OUR (%) frente al pH.

Como era de esperar fue imposible conseguir un buen ajuste de las predicciones a los resultados experimentales utilizando las mismas constantes de inhibición por pH. Se puede ver en la Tabla 40 que el ajuste se ha realizado organizando los experimentos en dos grupos con diferentes constantes de pH de acuerdo a los resultados vistos en la Figura 54 (además de los diferentes valores de K para cada uno de los experimentos, ya que este valor es función de la concentración de microorganismos en el momento en que se realizó el ensayo).

A la vista de los resultados es posible que esta diferencia entre las constantes de inhibición por pH estuviese relacionada con la variación del pH en el reactor  $R_1$ , origen de las muestras usadas en todos los experimentos. La Figura 56 muestra que en los cuatro primeros experimentos el pH óptimo obtenido en el ajuste es ligeramente mayor (ya que tienen mayores constantes  $K_H$  y  $K_{IH}$ ) que el obtenido en los cinco últimos experimentos, pasando de un pH óptimo de 7.6-7.7 a un pH óptimo de 7.2-7.3. Esto concuerda con un descenso del pH medio en el reactor  $R_1$ , ya que se pasa de un pH medio de 6.60 en la primera etapa a un pH medio de 6.18 para la etapa correspondiente a los últimos ensayos. En la Figura 57 se puede ver una comparación de dos experimentos, uno realizado en la primera etapa cuando el pH del reactor  $R_1$  era más alto (experimento 2) y otro llevado a cabo al final de la etapa en la que el pH del reactor era menor (experimento 9). Sin necesidad de realizar el ajuste del modelo ya es obvio que el rango óptimo de pH de las bacterias ha variado de uno a otro.

Con estos resultados se puede decir que las constantes de inhibición por el pH irán determinadas en cada caso por las condiciones ambientales en las que se desarrollan las bacterias, ya que son capaces de adaptar su pH óptimo a las condiciones en las que crecen.

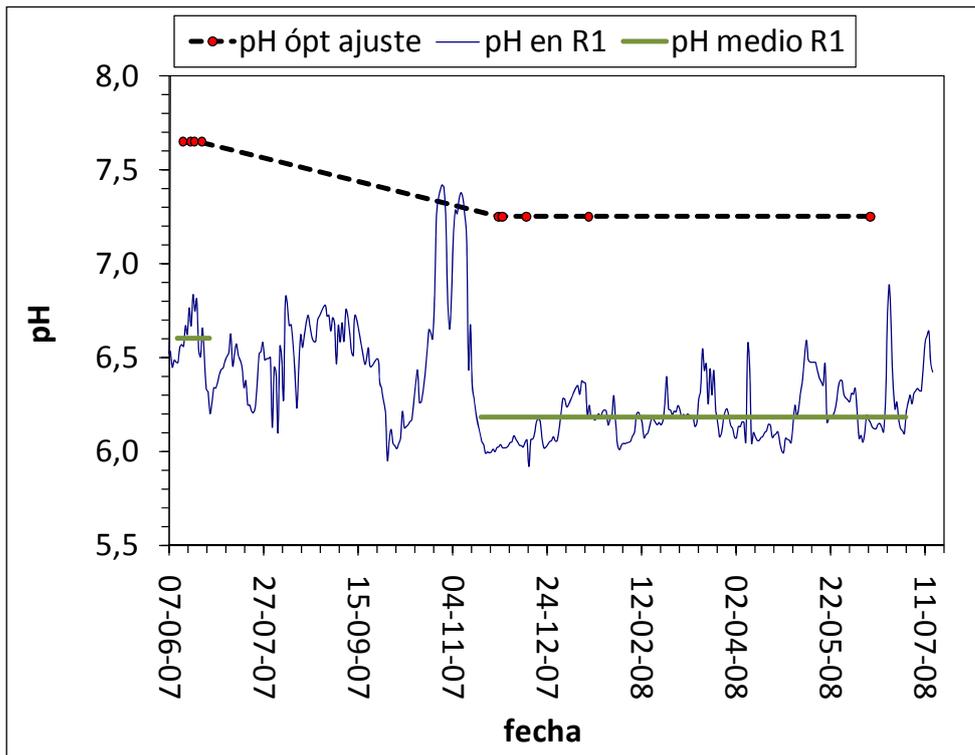


Figura 56. Variación del pH medio en el reactor R<sub>1</sub> y su relación con el pH óptimo de las bacterias amonioxidantes obtenido en el ajuste de los datos experimentales.

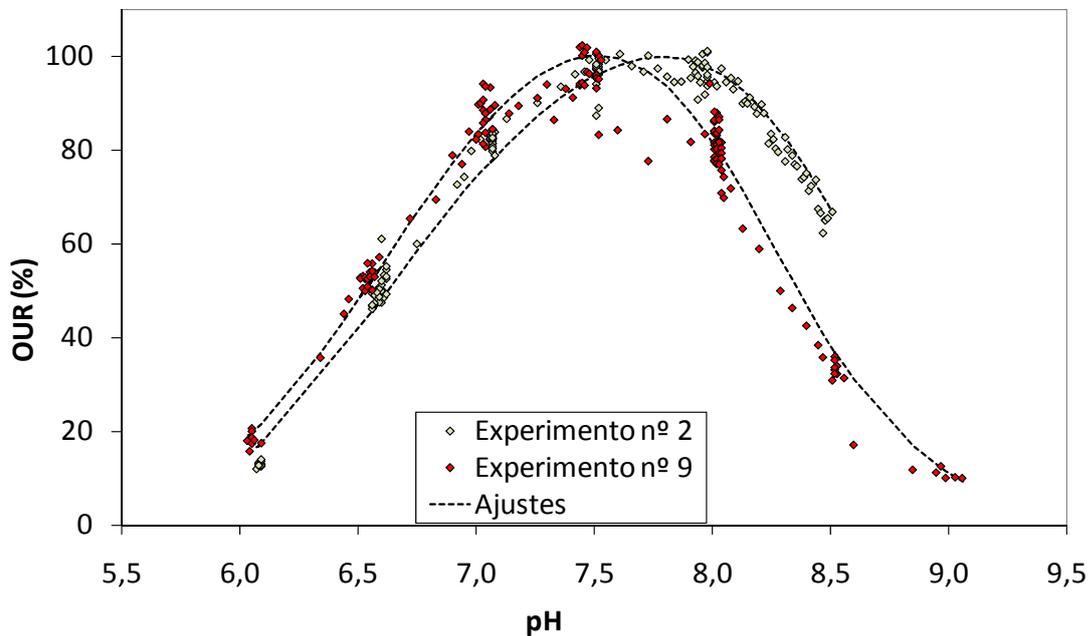


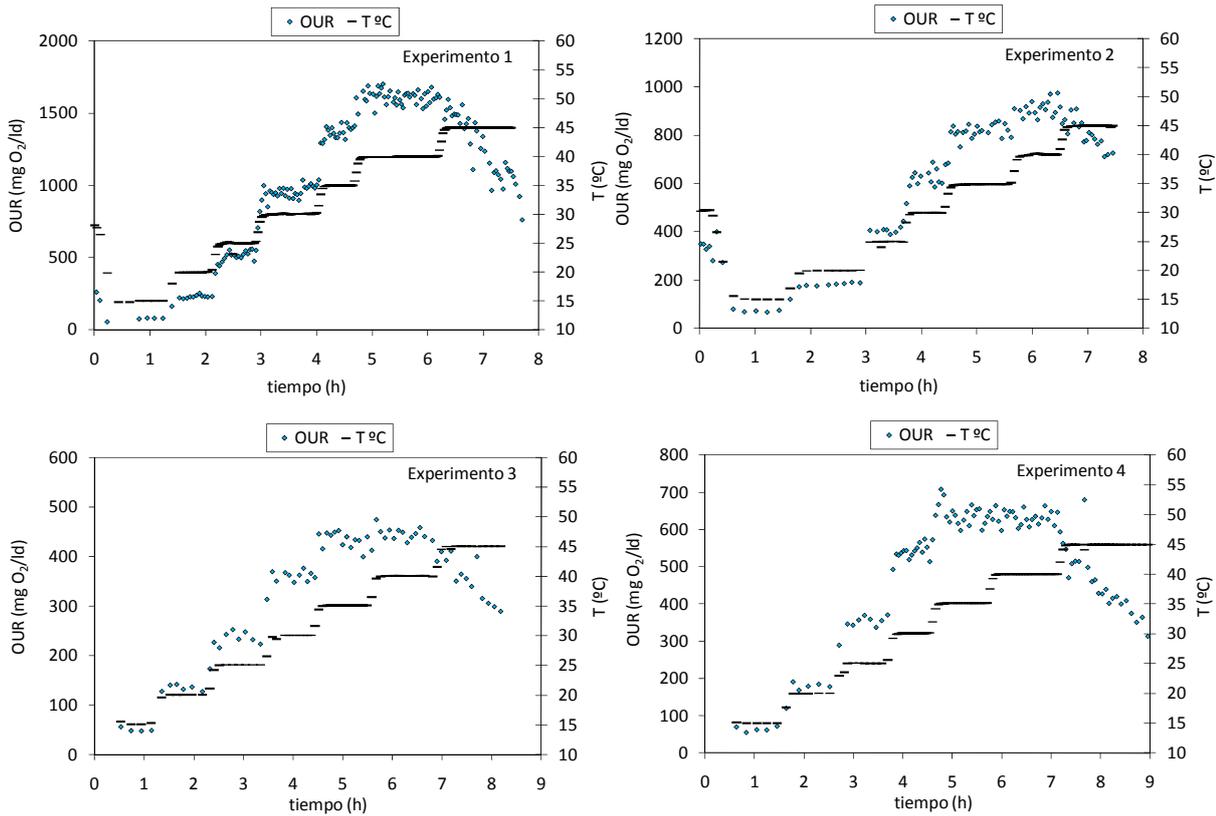
Figura 57. Comparación de los resultados experimentales de dos de los ensayos de cada uno de los grupos establecidos (Exp 2 de la primera etapa y Exp 9 de la segunda).

### **6.1.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad de las bacterias amonioxidantes.**

La determinación de la influencia de la temperatura sobre el desarrollo de las bacterias amonioxidantes se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 5.1.5 (página 153). Se realizaron dos experimentos de este tipo cuando el reactor SHARON se encontraba operando a una temperatura de 30 °C. Posteriormente se incrementó la temperatura del reactor a 35 °C para poder determinar el efecto de este parámetro sobre fango aclimatado a condiciones diferentes. Una vez comprobado que el proceso continuaba estable ante este cambio, se volvieron a realizar dos experimentos más. Todos los experimentos citados se llevaron a cabo manteniendo un pH constante de 7.0, mientras que las concentraciones de amonio y nitrito no se modificaron, es decir, fueron las que tenía el fango extraído del reactor SHARON en cada caso (de esta forma, según los resultados de experimentos previos, las bacterias disponían de sustrato suficiente para su desarrollo y al mismo tiempo el nitrito presente no alcanzaba concentraciones suficientes como para inhibir el proceso). Los ensayos comenzaban con una temperatura inicial de 15 °C que se aumentaba progresivamente 5 °C cada hora hasta alcanzar una temperatura de 45 °C. La cuantificación por FISH, mediante la sonda EUBmix, realizada a las muestras antes de los ensayos mostraban valores de aproximadamente 97 % de población de bacterias amonioxidantes.

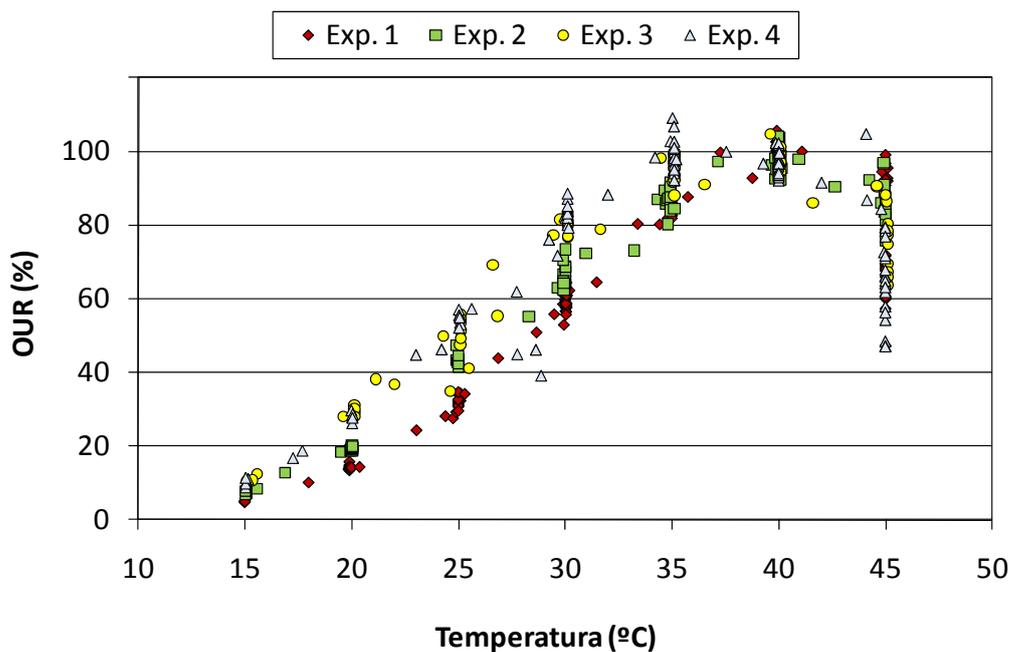
Los resultados de estos 4 experimentos se pueden ver en la Figura 58. En todos los ensayos se alcanzó una temperatura máxima de 45 °C porque, como se observa en las representaciones gráficas, la actividad de las bacterias aumenta a medida que se incrementa la temperatura, hasta los 40 °C, pero una vez alcanzado el valor de 45 °C la actividad de las bacterias amonioxidantes empieza a descender de forma significativa. El proceso de nitrificación parcial no llega a estabilizarse a los 45 °C en ninguno de los experimentos.

Al observar los experimentos 1 y 2, que son los ensayos realizados con fango aclimatado a 30 °C, se puede ver que al pasar de 35 a 40 °C se observa un ligero incremento de la actividad. En cambio los ensayos con fango aclimatado a una temperatura de 35 °C (experimentos 3 y 4) las bacterias alcanzan su actividad máxima a los 35 °C y se mantienen en este nivel de actividad hasta pasar a los 45 °C. Por lo tanto, el fango aclimatado a una mayor temperatura alcanza antes su actividad máxima y con ello dispone de un mayor rango de temperatura (entre 35 y 40 °C) donde mantiene esta actividad máxima. Sin embargo, esta aclimatación no eleva la temperatura a la cual las bacterias comienzan a descender su actividad (45 °C).



**Figura 58. Experimentos para el estudio del efecto de la temperatura en fango del reactor SHARON. Experimentos 1 y 2 con fango aclimatado a 30°C. Experimentos 3 y 4 con fango aclimatado a 35 °C.**

El valor de OUR máxima alcanzada en cada experimento es diferente, por lo que, para poder comparar los resultados de los 4 experimentos se ha normalizado respecto a la velocidad de consumo de oxígeno máxima alcanzada en cada caso (Figura 59).



**Figura 59. Resultados experimentales de todos los ensayos de T<sup>a</sup> normalizados respecto a la OUR máxima.**

Esta figura refleja algunos resultados interesantes desde el punto de vista de aplicación del proceso SHARON a una EDAR industrial.

- ✓ El proceso de nitrificación parcial no es estable a 45 °C debido a que la OUR desciende considerablemente.
- ✓ El rango de temperatura en que la actividad de las bacterias amonioxidantes es óptima (> 80%) está comprendido entre 32 °C y 42 °C, mientras que ésta desciende hasta un 60% cuando el proceso se encuentra en 30 °C.
- ✓ Para temperaturas menores a 30 °C la actividad de los organismos amonioxidantes se ve afectada de manera drástica.

Cabe destacar que la estabilidad del proceso fue determinada sólo durante aproximadamente 1 hora en cada nivel de temperatura, siendo necesario por tanto, realizar experimentos a temperatura fija durante un tiempo más prolongado. La Figura 60 muestra los resultados obtenidos al evaluar el comportamiento de la OUR a 35 y 40 °C en ensayos de aproximadamente 8 horas de duración. La evaluación a 45 °C no fue necesaria debido a que, como se ha comprobado en los ensayos previos, en menos de 1 hora la actividad desciende hasta en un 50%.

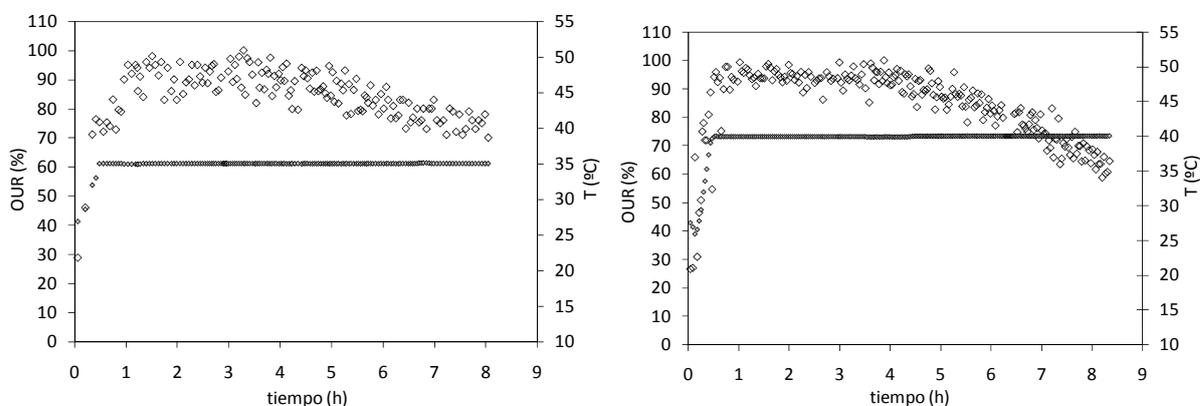


Figura 60. Evolución de la OUR a temperatura constante de 35 °C (izquierda) y 40 °C (derecha).

Los resultados obtenidos indican que la actividad de las bacterias se mantuvo estable con el tiempo durante 4-5 horas a ambas temperaturas. Posteriormente la actividad empieza a descender ligeramente, alcanzándose una actividad del 70% tras 8 horas de experimento. Dicho descenso no puede atribuirse a la falta de sustrato debido a que la concentración de amonio al final del experimento fue suficiente como para que el proceso continuará funcionando adecuadamente (la concentración de  $\text{NH}_3$  al final de los experimentos fue de 5.3 mg/l en el ensayo a 35 °C y de 7.2 mg/l en el ensayo realizado a 40 °C). De igual manera, este descenso tampoco puede deberse a inhibición por presencia de ácido nitroso, puesto

que su concentración al final del experimento fue mínima (0.13 mg N-HNO<sub>2</sub>/l en ambos ensayos) debido al pH al que se estaba realizando los ensayos (pH de 7).

Teniendo en cuenta que el reactor SHARON, de donde proceden las muestras para llevar a cabo los experimentos, estaba trabajando en ese momento a 30 °C, la causa del descenso de actividad se puede atribuir a la no adaptación de la población microbiana a cambios repentinos de temperatura. La prueba de viabilidad celular realizada al inicio y final del experimento a 40 °C arrojó como resultados que la proporción de bacterias no viables al inicio del experimento fue del 12% ± 5%, mientras que al final del experimento la proporción de bacterias no viables se incrementó a 22% ± 7%. Por lo tanto, a estas temperaturas tan elevadas la biomasa no es capaz de adaptarse y va descendiendo paulatinamente el porcentaje de bacterias viables, con lo que la OUR desciende también lentamente y no llega a estabilizarse.

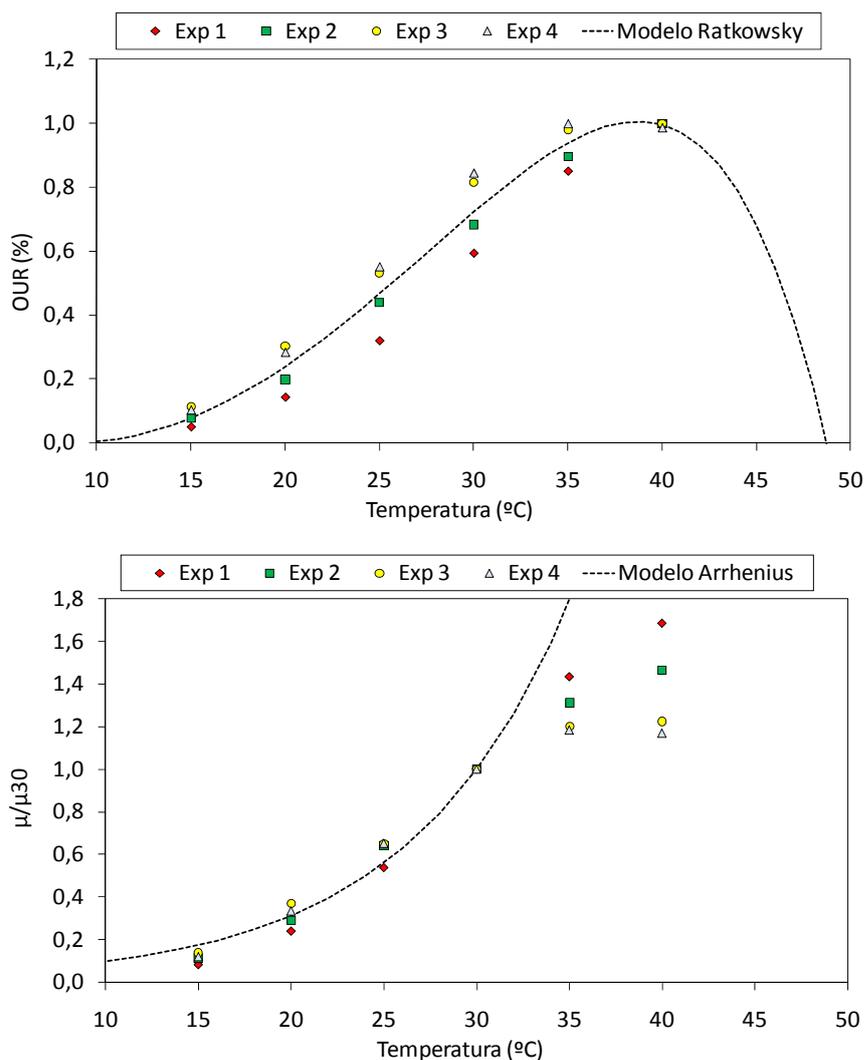
Para la determinación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las bacterias se han ajustado los resultados experimentales obtenidos en estos ensayos a las funciones descritas en el apartado 4.2.3 (página 136): modelo de Arrhenius (Ec.- 97) y modelo modificado de Ratkowsky (Ec.- 98).

$$\mu(T) = \mu(T_r) \cdot \theta^{(T-T_r)} \quad \text{Ec.- 97}$$

$$\mu(T) = [b \cdot (T - T_{min})]^2 \cdot [1 - e^{c \cdot (T - T_{max})}] \quad \text{Ec.- 98}$$

Para estos ajustes se ha determinado el valor medio de OUR en cada nivel de temperatura, despreciando en todos los casos el valor de OUR a 45 °C porque como se ha mencionado éste no llega a estabilizarse. Además, en las ecuaciones se ha considerado el valor de 30 °C como la temperatura de referencia (T<sub>r</sub>) ya que es la temperatura habitual de trabajo en un reactor SHARON.

La Figura 61 muestra los resultados obtenidos en ambos ajustes. En el caso del ajuste con el modelo de Arrhenius se han normalizado las OURs experimentales respecto a la OUR medida a la temperatura de referencia (30 °C) para poder comparar los experimentos, ya que las muestras de fango usado estaban aclimatadas a temperaturas diferentes.



**Figura 61. Resultados de los ajustes de los modelos de Arrhenius (figura superior) y Ratkowsky modificado (figura inferior) a los resultados experimentales.**

Como se ve en la Figura 61 los datos experimentales se ajustan adecuadamente con la ecuación de Arrhenius, pero solamente hasta una temperatura de 30 °C. A partir de aquí la ecuación de Arrhenius no puede representar el cambio que sufre la velocidad de crecimiento de las bacterias amonioxidantes como consecuencia de las elevadas temperaturas. En cambio el modelo modificado de Ratkowsky, aunque no tiene un sentido físico, reproduce mejor los resultados experimentales en todo el rango de temperaturas evaluadas.

Por lo tanto, en sistemas donde no se desee trabajar a temperaturas superiores a 30 °C el modelo de Arrhenius podrá reproducir correctamente los resultados experimentales, pero si el proceso opera a temperaturas superiores (como sucede en un reactor SHARON) habrá que utilizar otras alternativas para determinar el efecto de altas temperaturas sobre la velocidad del proceso.

Los resultados experimentales fueron ajustados con el modelo de Ratkowsky obteniendo unos valores de las constantes de  $b = 0.0046$ ,  $c = 0.0766$ ,  $T_{\min} = 8.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $T_{\max} = 48.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . El ajuste realizado con la ecuación de Arrhenius proporcionó un valor de la constante de  $\theta_{\text{NH}} = 1.12$ , valor que concuerda con el valor mayormente aceptado por la comunidad científica para la constante de Arrhenius de las bacterias autótrofas ( $\theta_{\text{aut}} = 1.111$ , Henze *et al.*, 1999). Como se describió en la introducción se denomina *coeficiente de temperatura* a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. En este caso, el valor de  $\theta_{\text{NH}} = 1.12$  indica que existe un aumento en la velocidad de crecimiento de aproximadamente un 12 % por cada grado que aumenta la temperatura.

### **6.1.6 Rendimiento celular de las bacterias amonioxidantes ( $Y_{\text{NH}}$ ).**

Como se ha definido en el desarrollo del modelo, el rendimiento de las bacterias amonioxidantes ( $Y_{\text{NH}}$ ) se define como la cantidad de biomasa producida por unidad de sustrato degradado. Para la determinación del parámetro estequiométrico  $Y_{\text{NH}}$  se utiliza el procedimiento experimental descrito en el apartado 5.1.6 (página 154) en el que se mide el oxígeno consumido durante la oxidación de una cantidad determinada de amonio.

Debido a las altas concentraciones con las que se trabaja en el reactor SHARON se consideró necesario determinar la constante  $Y_{\text{NH}}$  realizando los ensayos directamente con el fango extraído del reactor  $R_1$ , para obtener un valor del rendimiento en las condiciones reales de operación en un reactor SHARON. Para ello se analiza el amonio inicial procedente del reactor antes de iniciar el ensayo, se pasa el fango al montaje experimental donde se realiza el ensayo respirométrico y se vuelve a medir la concentración de amonio pasado un determinado periodo de tiempo. En este mismo periodo de tiempo se registra la velocidad de consumo de oxígeno en el reactor, y a partir de ésta se puede determinar el oxígeno consumido en todo el ensayo. Con esta información se calcula entonces el valor de la constante estequiométrica como se describe en la ecuación Ec.- 75 (página 155).

La Figura 62 muestra los resultados de los 3 ensayos realizados para la determinación de esta constante estequiométrica siguiendo la metodología propuesta. En estos ensayos la OUR medida incluye la actividad endógena presente en el reactor. Para determinar qué porcentaje de este consumo de OD es debido a dicha actividad se llevó a cabo un ensayo en el que se midió la velocidad de consumo de oxígeno durante 1 hora aproximadamente. Posteriormente se llevó a cabo una adición de tiourea para inhibir el proceso de nitrificación y poder observar así si existe consumo de OD por otro tipo de actividad. La Figura 63 muestra el resultado obtenido en este ensayo. Como se puede observar, la velocidad de

consumo de oxígeno descendió hasta aproximadamente un 1.5 % de la inicial. Por tanto, para el cálculo del oxígeno consumido, en cada uno de los experimentos de la Figura 62, se tuvo en cuenta que un 1.5 % de la OUR medida experimentalmente corresponde a la actividad endógena.

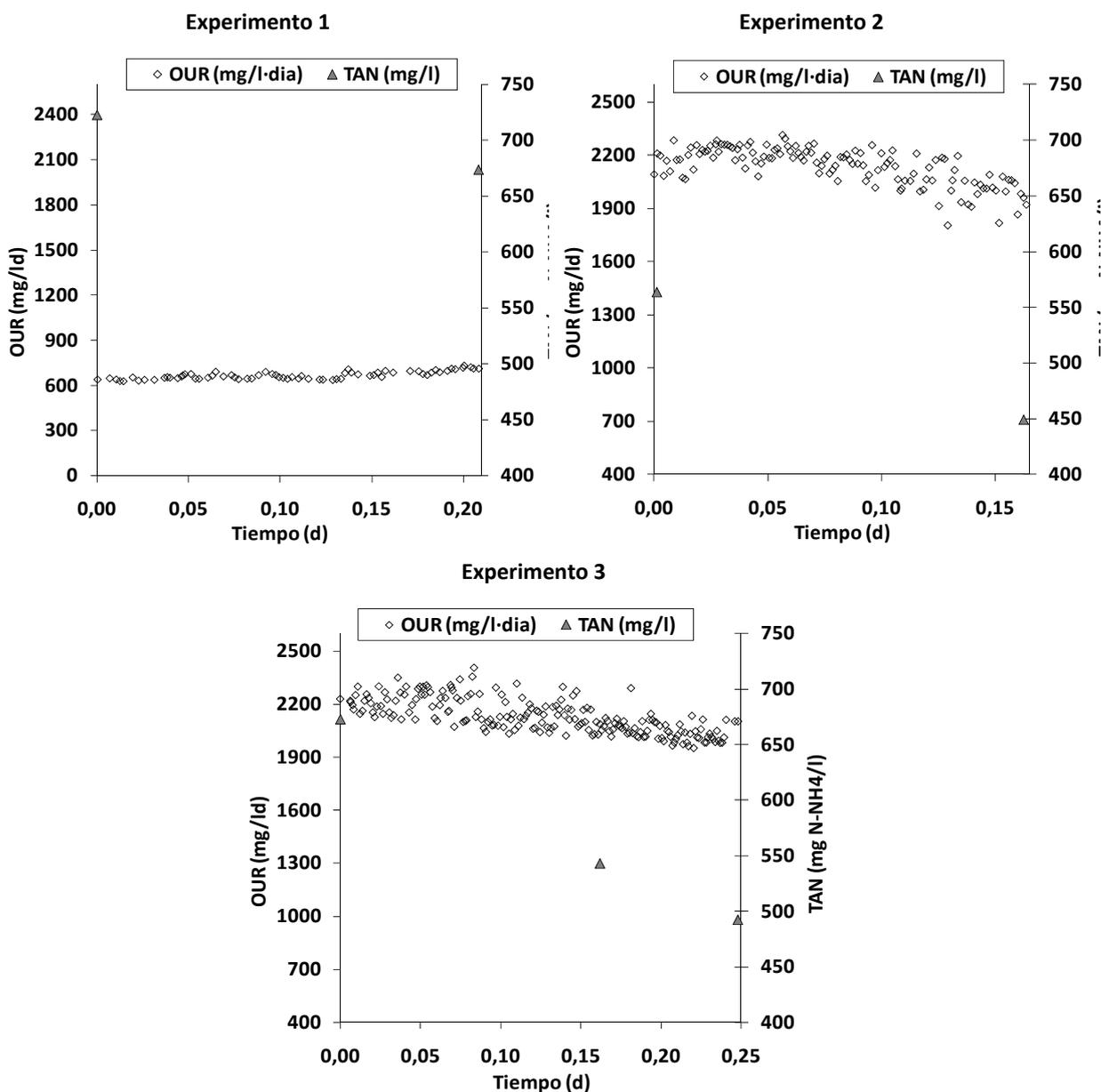


Figura 62. Evolución de la OUR y concentración de TAN de los ensayos para la determinación de la  $Y_{NH}$  del fango del reactor SHARON.

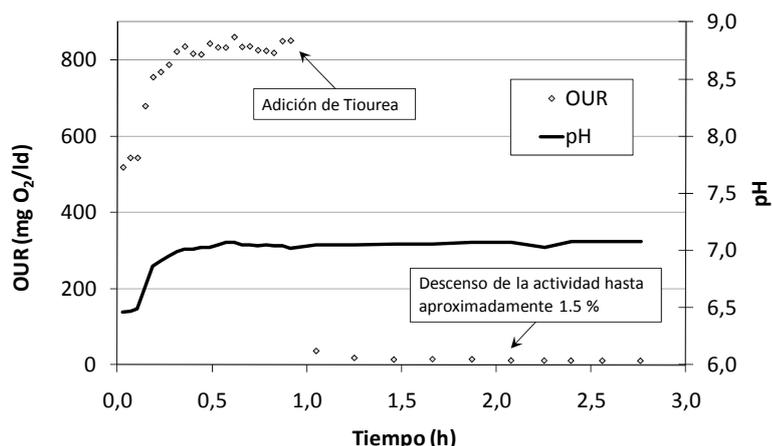


Figura 63. Determinación del consumo de OD debido a la actividad endógena en una muestra de fango del reactor SHARON.

	OD consumido (mg O <sub>2</sub> /l)	TAN consumido (mg N-NH <sub>4</sub> /l)	Y <sub>NH</sub> (g DQO/g TAN)
Experimento 1	136.2	49.1	0.53
Experimento 2	339.1	114.3	0.37
Experimento 3	521.1	180.5	0.43

Tabla 41. Valores de rendimiento de las bacterias amonioxidantes determinados experimentalmente.

Calculando el oxígeno consumido mediante el área bajo la curva de OUR en función del tiempo, y aplicando la Ec.- 75 (página 155) se determinó la  $Y_{NH}$  en cada uno de los experimentos (Tabla 41). Como se puede ver en la tabla, además de que los valores obtenidos son bastante más altos que los recopilados de la bibliografía (0.15 g DQO/g N Hellinga *et al.*, 1999 y Volcke, 2006; 0.21 g DQO/g N Magrí, 2007; 0.24 g DQO/g N Dosta, 2007) existe una diferencia considerable de un experimento a otro.

Aunque los ensayos respirométricos son el método más extensamente usado para la determinación de los parámetros de las bacterias en los procesos de calibración, diferentes estudios han mostrado que la calidad de la información obtenida en este tipo de ensayos está gobernada por la relación entre la concentración inicial del sustrato y la concentración inicial de biomasa ( $S_0/X_0$ ). Si esta relación es baja el sustrato es rápidamente asimilado y no existe un crecimiento significativo de la biomasa (Choi *et al.*, 2006; Orhon *et al.*, 2003). En cambio, si los organismos disponen de una concentración alta de sustrato podrá haber desarrollo de la biomasa. Estudios recientes (Browner *et al.*, 1998; Gatti *et al.*, 2010) mostraron que el empleo del sustrato disponible para llevar a cabo el proceso de catabolismo y/o anabolismo conlleva variaciones en el rendimiento de las bacterias que se determina experimentalmente. La variación del rendimiento de las bacterias con el cambio

de la relación  $S_0/X_0$  se puede entender teniendo en cuenta que la relación sustrato/microorganismos determina si en el proceso de consumo del sustrato prevalece el catabolismo o el anabolismo. Si existe una limitación de sustrato (baja relación  $S_0/X_0$ ), predomina el proceso de catabolismo y la producción de energía para el mantenimiento de las bacterias dominará sobre la multiplicación de microorganismos. En cambio, si existe una gran cantidad de sustrato disponible (media-alta relación  $S_0/X_0$ ), entonces prevalece el anabolismo. Los microorganismos tendrán suficiente sustrato para su crecimiento y la multiplicación celular dominará sobre la producción de energía.

Para relaciones  $S_0/X_0$  aun más elevadas, otros estudios anteriores ya determinaron la influencia de  $S_0/X_0$  con el rendimiento heterótrofo (Chudoba *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1996). Estos autores encontraron un descenso del rendimiento a medida que asciende la relación sustrato/microorganismos. A altos valores de la relación  $S_0/X_0$ , la eficiencia para acoplar el anabolismo y el catabolismo es menor por desperdicio de la energía (Liu *et al.*, 1996). Se necesita más sustrato para obtener la misma cantidad de energía para crecimiento. Otros datos mostraron un incremento de la constante  $Y$  a valores bajos de la relación  $S_0/X_0$  y un descenso de la constante cuando la relación  $S_0/X_0$  sobrepasa un valor determinado (Chang *et al.*, 1993). Esto sugiere que una vez alcanzado un límite máximo de  $S_0/X_0$  ocurre un desacople del catabolismo del anabolismo, y existe un desprendimiento de energía. Si no se alcanza este valor límite las bacterias son capaces de regular la tasa de catabolismo exactamente a las necesidades del anabolismo. La Figura 64 muestra una comparación de la tendencia del rendimiento de las bacterias heterótrofas a medida que se incrementa la relación  $S_0/X_0$  propuestas por Chang *et al.* (1993) y Liu *et al.* (1996).

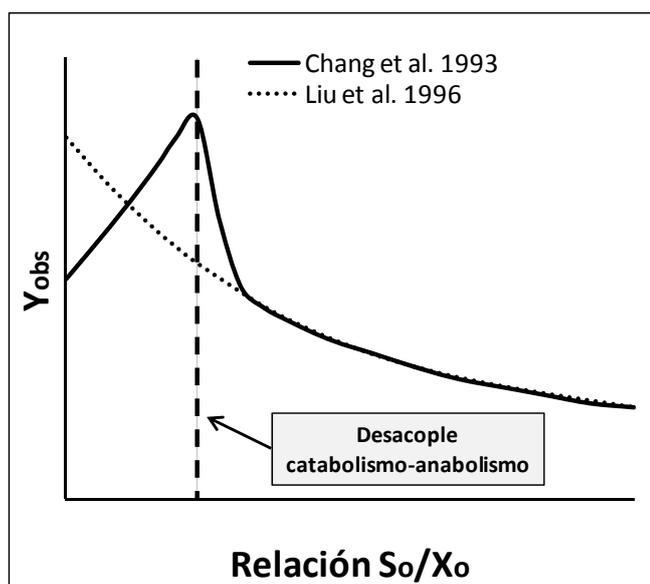


Figura 64. Relación entre el rendimiento observado de las bacterias heterótrofas y  $S_0/X_0$ . Chang *et al.* (1993) y Liu *et al.* (1996).

Aunque los estudios citados hacen referencia a la determinación del rendimiento de bacterias heterótrofas es probable que la respuesta de las bacterias autótrofas a diferentes relaciones  $S_0/X_0$  sea similar. En este caso, los valores de rendimiento determinados en la calibración del reactor SHARON (Tabla 41) se corresponden con la primera etapa descrita por Chang *et al* (1993), en donde aun no se ha producido el desacople entre catabolismo y anabolismo, y un incremento en la relación  $S_0/X_0$  provoca el incremento del rendimiento. En el caso de los 3 ensayos realizados en este trabajo de tesis se observa una relación entre el cambio en el valor de  $S_0/X_0$  y la  $Y_{NH}$  obtenida en cada ensayo (Figura 65). Al aumentar la relación sustrato/microorganismos el valor de la constante estequiométrica  $Y_{NH}$  también se incrementa.

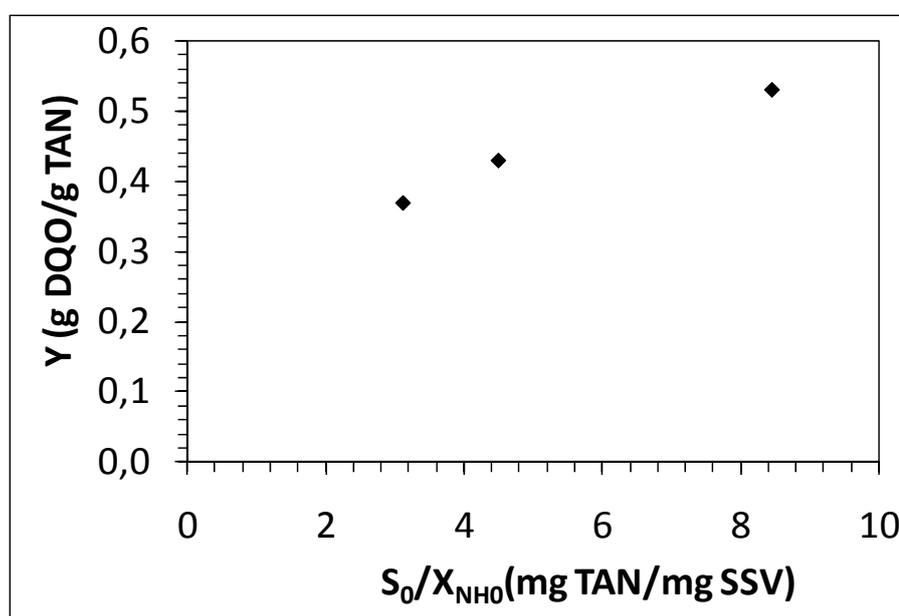


Figura 65. Relación entre la  $Y$  experimentalmente y la relación  $S_0/X_0$ .

Dicho esto, se puede asumir que las diferencias con los valores de bibliografía pueden deberse a la forma en que se ha realizado el ensayo respirométrico, ya que la relación  $S_0/X_0$  es alta en todos los experimentos realizados en este estudio. Aunque, según la hipótesis comentada, parece que no se han alcanzado aún relaciones de  $S_0/X_0$  lo suficientemente altas para provocar el desacople catabolismo – anabolismo. En resumen, las diferentes condiciones de operación en los ensayos ha desembocado en una distribución diferente de la energía entre el crecimiento celular y el mantenimiento de las bacterias.

Por lo tanto, a la hora de determinar el valor de la constante de rendimiento celular es muy importante analizar las condiciones en las que se realiza los ensayos respirométricos. Ya que en el reactor SHARON estudiado se mantenía una alta relación  $S_0/X_0$  (debido a la carga del influente y a que solo se oxida la mitad del amonio de entrada), en la determinación del

rendimiento de las bacterias amonioxidantes también se trabajó con valores altos de esta relación para que el resultado obtenido fuese representativo de este sistema. Con ello, se ha obtenido un valor más alto de  $Y_{NH}$  al que se puede observar en otros estudios.

### 6.1.7 Tasa máxima de crecimiento de las bacterias amonioxidantes ( $\mu_{NH}$ ).

Para la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias amonioxidantes presentes en el reactor SHARON se empleó la ecuación Ec.- 100 y los resultados de los ajustes para la determinación de las constantes de inhibición por pH descritos en el apartado 6.1.4 (página 194). En estos ajustes se determinó una constante K que incluía los términos que se muestran en la ecuación Ec.- 99.

$$K = \mu_{NH}^{max} \cdot X_{NH} \cdot \frac{3.43 - Y_{NH}}{Y_{NH}} \quad \text{Ec.- 99}$$

↓

$$\mu_{NH}^{max} = K \cdot \frac{Y_{NH}}{X_{NH} \cdot (3.43 - Y_{NH})} \quad \text{Ec.- 100}$$

Aparte del valor del parámetro K, obtenido en los ajustes, fue necesario determinar la concentración de bacterias amonioxidantes en cada uno de los experimentos. Para ello se empleó el método de cuantificación desarrollado por Borrás L. (2008) descrito en el apartado 5.1.7 (página 155). Con dicho método se obtiene el porcentaje másico de bacterias amonioxidantes presentes en la biomasa. Para ello, se debe combinar la técnica FISH y la tinción con DAPI. Mediante la primera, se determina el porcentaje de área ocupado por bacterias amonioxidantes frente al área ocupada por las bacterias del dominio *Eubacteria*. En el caso de las muestras empleadas en estos ensayos se determinó que el  $97 \pm 1$  % de las bacterias corresponde a bacterias amonioxidantes. Con la tinción con DAPI se corregirá el porcentaje obtenido mediante FISH debido a que las sondas actualmente descritas para el dominio *Eubacteria* han demostrado no cubrir el total de bacterias presentes en la muestra. Mediante el porcentaje másico de bacterias autótrofas frente a bacterias del dominio *Eubacteria*, corregido mediante la relación EUB/DAPI, y multiplicado por el valor de  $DQO_{SUS}$ , podemos obtener el valor de  $X_{NH}$  en unidades de DQO por litro. En el trabajo de investigación desarrollado por Borrás L. (2008) se determinó que el porcentaje de bacterias hibridadas con la sonda EUBmix frente a bacterias teñidas con DAPI fue de  $91 \pm 1$ %. Aparte del porcentaje de bacterias se determinó el porcentaje de biomasa no viable mediante la técnica de viabilidad celular, obteniéndose un 12 % de no viables.

Aunque en la determinación de las constantes de inhibición por pH se llevaron a cabo un total de 9 experimentos, en el presente apartado únicamente se van a emplear los resultados de los ajustes de aquellos experimentos en los que su relación  $S_0/X_0$  se encuentra en el rango estudiado en el apartado de la determinación del rendimiento de las bacterias (3.12 – 8.46 mg  $NH_4$ /mg SSV). De esta forma el valor de  $Y_{NH}$ , necesario en la ecuación Ec.-100, fue determinado mediante extrapolación en la representación  $Y_{NH}$  frente a  $S_0/X_0$  obtenida en el apartado anterior. De los experimentos realizados, 6 de ellos presentaban una relación  $S_0/X_0$  demasiado alta para poder calcular el valor de la  $Y_{NH}$  y por ello fueron descartados en la determinación de la  $\mu$  de las bacterias amonioxidantes. En la Tabla 42 se puede ver los experimentos con una relación  $S_0/X_0$  adecuada para poder determinar el valor de la  $Y_{NH}$ .

En el seguimiento del reactor SHARON no se realizaron medidas de DQO porque las altas concentraciones de nitrito del reactor provocaban mucho error en las analíticas. Por lo tanto, el valor de  $DQO_{SUS}$  se obtuvo teniendo en cuenta la relación 0,7 g SSV/g de bacteria medida como DQO, y que en el reactor SHARON prácticamente todo son bacterias.

Por otro lado, como se ha comentado, en los ensayos de viabilidad celular se concluyó que un  $12 \pm 1$  % de la DQO medida correspondía a biomasa no viable, por lo que el 88 % restante pertenece a la biomasa viable de la muestra. El  $97 \pm 1$  % de esta biomasa viable pertenece a las bacterias amonioxidantes y además este valor debe ser corregido con el 91 % determinado mediante la técnica de tinción DAPI. En la Figura 66 se muestra un resumen del procedimiento para determinar la concentración de bacterias amonioxidantes y, con esta, la tasa máxima de crecimiento de las bacterias.

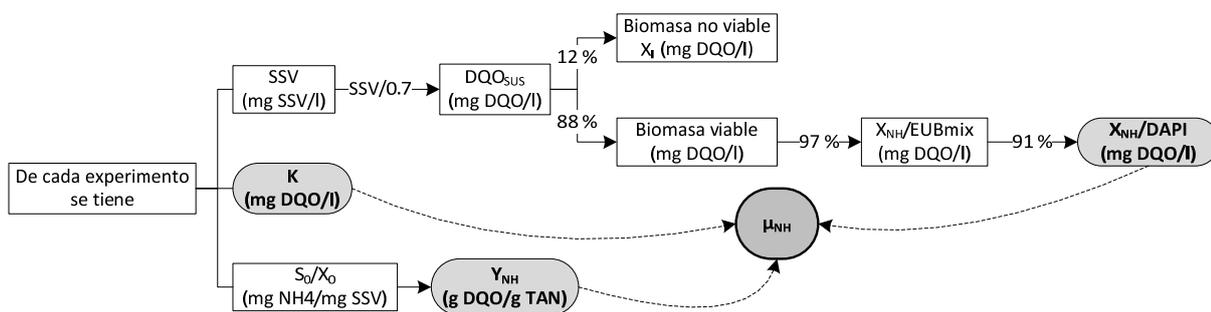


Figura 66. Proceso a seguir para la determinación de la  $\mu_{NH}$ .

Experimento	K	NH <sub>4</sub> inicial	SSV	S <sub>0</sub> /X <sub>0</sub>	Y <sub>NH</sub>	DQO <sub>SUS</sub>	Biomasa viable	Biomasa no viable (X <sub>i</sub> )	X <sub>NH</sub>	μ <sub>NH</sub> <sup>max</sup>
	mg DQO/d	mg TAN/l	mg SSV/l	mg TAN/ mg SSV	g DQO/ g TAN	mg DQO/l	mg DQO/l	mg DQO/l	mg DQO/l	d <sup>-1</sup>
1	1148	520	63	8,01	0,52	90,00	79,20	10,80	69,91	2,93
2	1393	550	73	7,31	0,50	104,29	91,77	12,51	81,01	2,93
3	1364	550	75	7,11	0,49	107,14	94,29	12,86	83,23	2,76
4	1275	1100	74	14,42						
5	1244	1100	91	11,73						
6	1275	1100	91	11,73						
7	1203	1150	72	15,49						
8	677	1100	45	23,71						
9	800	2000	130	14,92						

Relaciones S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> muy altas

**Tabla 42. Parámetros obtenidos en la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias AOB presentes en el reactor SHARON.**

Como se puede ver en la Tabla 42, mediante los cálculos descritos se obtiene una  $\mu = 2.87 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$  (30 °C). El valor determinado se encuentra dentro del rango de valores recopilados en bibliografía (Tabla 31, página 145). Es un valor bastante alto pero hay que tener en cuenta que ha sido determinado en un sistema que opera a una temperatura elevada (30 °C), y como se ha comentado en la introducción de la tesis el incremento de temperatura produce un aumento de los procesos cinéticos (tanto crecimiento como lisis de las bacterias). Con el modelo modificado de Ratkowsky que describe el efecto de la temperatura sobre la actividad de las bacterias y los parámetros del modelo obtenidos en la calibración (apartado 6.1.5, página 201), se obtiene que a 20 °C las bacterias presentarían una  $\mu = 0.95 \text{ d}^{-1}$ , que es un valor típico de tasa de crecimiento en bacterias amonioxidantes a estas temperaturas.

### 6.1.8 Simulaciones de los reactores SHARON operados en el laboratorio.

Para validar los valores de los parámetros obtenidos en la calibración de las bacterias amonioxidantes presentes en el reactor SHARON se llevaron a cabo un conjunto de simulaciones del funcionamiento de los reactores SHARON operados en el laboratorio. Las simulaciones se han realizado utilizando el software DESASS, en cual se ha implementado previamente el modelo de nitrificación vía nitrito desarrollado en esta tesis. Además de la implementación del modelo desarrollado, se incluyó en el programa como nuevo elemento de tratamiento el reactor SHARON. El seguimiento realizado a los reactores SHARON descritos en esta tesis permitió detectar que puede tener lugar una importante evaporación en el reactor. Dado esto, una de las opciones que se incluyó en las características de diseño del reactor SHARON fue la posibilidad de especificar el caudal de evaporación que tiene lugar en éste.

En las simulaciones realizadas con el programa DESASS, en primer lugar se simuló el estado estacionario del reactor SHARON R<sub>1</sub> con el objetivo de validar los valores de los parámetros calibrados y además obtener, por ajuste de los resultados, el valor de la constante b (tasa de lisis de las bacterias) del proceso de lisis de las bacterias amonioxidantes. Dado que, mediante la metodología de calibración descrita, se habían determinado todos los parámetros del modelo excepto la constante de lisis, existía un único valor de b con el cual los resultados de la simulación se ajustaban adecuadamente a los resultados experimentales obtenidos en la operación del reactor SHARON R<sub>1</sub>.

Posteriormente, se llevó a cabo la simulación del estado estacionario obtenido en cada una de las etapas evaluadas en el reactor SHARON R<sub>2</sub>. De esta forma se determinó si el modelo propuesto podía reproducir la evolución del sistema a medida que se incrementaba el caudal de entrada y la temperatura del sistema.

### 6.1.8.1 Simulación del reactor SHARON R<sub>1</sub>. Determinación de la tasa de lisis de las bacterias amonioxidantes.

Para realizar la simulación de cualquier esquema de operación en el programa DESASS es imprescindible conocer las características del influente a tratar y las condiciones en las que se trabaja. En la Tabla 43 se presentan los valores utilizados en la simulación como valores característicos del influente y las condiciones de operación del reactor. Como ya se comentó en la descripción de los reactores, lo más destacable en este tipo de sistemas es la elevada concentración de amonio y alcalinidad del influente, así como las elevadas temperaturas de operación.

	Parámetro	Valor	Unidades
Concentración en el influente	S <sub>NH4</sub>	1000,00	mg/l
	S <sub>PO4</sub>	7,60	mg/l
	S <sub>alk</sub>	4000,00	mg/l
	S <sub>Ca</sub>	0,90	mg/l
	S <sub>Mg</sub>	5,00	mg/l
	S <sub>K</sub>	3,14	mg/l
Condiciones de operación	Q <sub>ent</sub>	1,50	l/d
	Q <sub>evap</sub>	0,45	l/d
	Q <sub>sal</sub>	1,05	l/d
	V <sub>reactor</sub>	7,00	l
	OD <sub>medio</sub>	2,00	mg/l
	T <sup>a</sup>	30,00	°C
	TRC	6,67	d

Tabla 43. Características del agua de entrada y condiciones de operación del reactor SHARON simulado.

Las simulaciones realizadas se hicieron en régimen estacionario. Es decir, no se calculó la evolución del sistema desde el comienzo de la operación del reactor hasta alcanzar el estado estacionario, sino únicamente el funcionamiento del reactor en cada estado estacionario.

En esta simulación se utilizaron los valores de los parámetros de las bacterias amonioxidantes obtenidos en la calibración del modelo, excepto el valor de la tasa de lisis que ha sido optimizado por ajuste a los resultados experimentales. En la Tabla 44 se muestran todos los valores de los parámetros de las bacterias AOB usados. Los parámetros de las bacterias nitritoxidantes fueron fijados de la bibliografía dado que como no se encontraban en el reactor SHARON lo único que predecía el modelo era que no se desarrollaban en el reactor. Como se puede ver en dicha tabla, las simulaciones se han realizado con un valor de  $b = 0.52 \text{ d}^{-1}$  para reproducir los resultados experimentales. Este valor de la tasa de lisis, determinado para 30°C, equivale a un valor de  $0.17 \text{ d}^{-1}$  para 20 °C (según el modelo de Ratkowsky modificado) el cual se encuentra dentro del rango establecido por la bibliografía para estas bacterias ( $0.08 - 0.21 \text{ d}^{-1}$ ).

Parámetro	Valor	Unidades
$Y_{NH}$	0,50	$g \text{ DQO}/g \text{ TAN}$
$\mu_{NH}$	2,87	$d^{-1}$
$b_{NH}$	<b>0,52</b>	$d^{-1}$
$K_{O_2}$	1,45	$mg/l$
$K_{NH_3}$	0,32	$mg/l$
$K_{IHNO_2}$	1,32	$mg/l$
$K_M$	0,30	$mol/l$
$n$	3,00	-
$A_H$	1,00	-
$K_H$	5,70	-
$A_{IH}$	3,00	-
$K_{IH}$	8,52	-

Tabla 44. Valores de los parámetros estequiométricos y cinéticos de las bacterias amonioxidantes usados en la simulación.

Los valores obtenidos mediante la simulación realizada vienen recogidos en la Tabla 45 junto con los valores experimentales para facilitar la comparación. En dicha tabla se puede ver que el modelo propuesto ha sido capaz de reproducir favorablemente los resultados experimentales obtenidos en el seguimiento del reactor.

Parámetro	Valor		Unidades
	Simulación	Experimental	
$S_{NH_4}$	618	$616 \pm 68$	mg/l
$S_{NO_2}$	790	$780 \pm 67$	mg/l
$S_{NO_3}$	1,43	< 2,00	mg/l
$X_I$	12	$12 \pm 1$	mg/l
$X_{NH}$	90	$86 \pm 6$	mg/l
$DQO_{sus}$	108	$100 \pm 7$	mg/l
SSV	75,6	$70,3 \pm 5,3$	mg/l
pH	6,39	$6,47 \pm 0,15$	-
Alcalinidad	20,6	< 30,0	mg/l

Tabla 45. Comparación de los resultados de la simulación con los experimentales para el estado estacionario del reactor SHARON R<sub>1</sub>.

### 6.1.8.2 Simulación del reactor SHARON R<sub>2</sub>. Determinación de la capacidad máxima de tratamiento del reactor.

Como se describió en la operación del reactor SHARON R<sub>2</sub> (apartado 3.2.3, página 102), se llevaron a cabo incrementos sucesivos del caudal de entrada de dicho reactor para poder determinar la capacidad máxima de tratamiento en el sistema. Con las siguientes simulaciones se pretendía comprobar si el modelo propuesto podía reproducir los TRC mínimos, obtenidos en este reactor, para poder llevar a cabo el proceso de nitrificación vía nitrito. Con el incremento del caudal realizado en el reactor se determinó que, para una temperatura de 30 °C, el proceso requiere de un TRC de 1.75 d mientras que si la temperatura se incrementa a 35 °C el TRC se podía descender a 1.52 d (ver Tabla 23 en la página 107).

En estas simulaciones las características del agua de entrada y las condiciones de operación del reactor SHARON R<sub>2</sub> fueron las mismas que las usadas en el reactor SHARON R<sub>1</sub> (Tabla 43) exceptuando los siguientes puntos:

- ◇ Se realizaron simulaciones del reactor a 30 y 35 °C para determinar el TRC mínimo necesario cuando el reactor opera a cada una de estas temperaturas.
- ◇ El caudal de evaporación en este reactor fue diferente en cada una de las etapas evaluadas.
- ◇ El caudal de entrada fue diferente en cada simulación, por lo tanto, el TRC también se fue modificando en cada una de las simulaciones.

Con las simulaciones llevadas a cabo en este apartado se pudo comparar, en primer lugar, los datos obtenidos por simulación con los datos experimentales del estado estacionario en cada una de las etapas evaluadas en el reactor SHARON (en total se estudiaron 12 periodos

diferentes, donde se modificó el TRC o la temperatura del reactor). Además, los resultados de las simulaciones permitieron comparar la evolución del proceso de nitrificación con el TRC cuando el sistema opera a dos temperaturas diferentes.

En la Figura 67 se presenta la comparación de los resultados experimentales con los datos obtenidos por simulación del reactor SHARON. Las gráficas muestran la evolución de la concentración del amonio y nitrito a medida que se modifica el TRC y la temperatura del sistema. Como se puede ver en ambas figuras los valores simulados se ajustan satisfactoriamente a las concentraciones de amonio y nitrito medidas en el reactor SHARON R<sub>2</sub>. Las mayores discrepancias se encuentran en las etapas en las que el proceso de nitrificación se veía claramente afectado por las condiciones del sistema (etapa con TRC 1.56 d y 30 °C, y etapa con TRC de 1.4 d y 35 °C). Estas diferencias se deben a que en el reactor SHARON operado en el laboratorio, cuando se observaba un descenso brusco del proceso de nitrificación, no se dejaba evolucionar el sistema hasta el estado estacionario para evitar la pérdida del proceso, ya que esto supondría una nueva puesta en marcha. Por lo tanto, es lógico que los resultados de las simulaciones no coincidan con los experimentales en estos puntos. Si el sistema hubiese evolucionado sin ninguna intervención es probable que se hubiesen alcanzado las concentraciones de amonio y nitrito previstas en las simulaciones.

A partir de la Figura 67 también se puede concluir que el modelo, al igual que los resultados experimentales, predice que a 30 °C el proceso de nitrificación desciende bruscamente cuando se alcanza un TRC de 1.56 d. Sin embargo, cuando la temperatura en el sistema es de 35 °C, los resultados experimentales muestran un descenso del proceso de nitrificación cuando el TRC alcanza los 1.4 d, mientras que las simulaciones predicen que el sistema sigue siendo estable cuando el TRC alcanza este valor. Como se comentará con las siguientes simulaciones, esta diferencia no es significativa porque el modelo predice que el proceso de nitrificación desciende cuando el TRC es de 1.3 d y no 1.4 d.

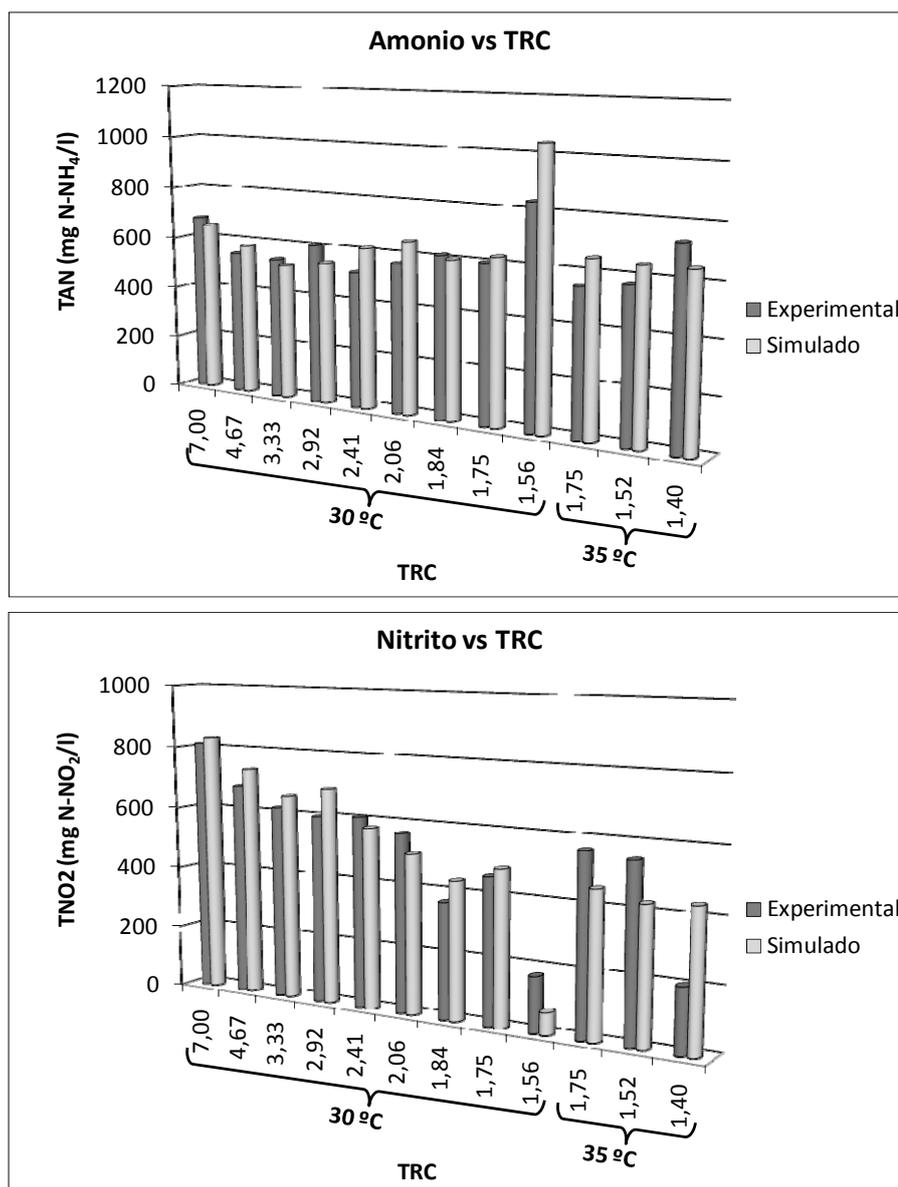


Figura 67. Efecto del TRC y la T (observado en los experimentos y en las simulaciones) en la concentración de amonio y nitrito.

Con las simulaciones que se discuten a continuación se pretendía observar como aumentaba la capacidad máxima de tratamiento del reactor cuando se incrementa la temperatura del sistema. En la Figura 68 se puede ver los resultados de dichas simulaciones. En las gráficas se ha representado las concentraciones de amonio y nitrito obtenidas en las simulaciones a medida que se incrementaba el TRC del reactor (Figura 68 (a) y (c)). Además, ya que se incluyó un caudal de evaporación de 0.5 l/d en las simulaciones, se ha realizado una corrección de las concentraciones obtenidas para poder observar mejor la evolución del proceso con el TRC (Figura 68 (b) y (d)). La corrección de las concentraciones se ha realizado de la siguiente forma:

$$[S]_{\text{corregida}} = [S]_{\text{simulada}} \cdot \frac{Q_{\text{salida}}}{Q_{\text{entrada}}} \quad \text{Ec.- 101}$$

En la Figura 68 se puede ver que si el sistema trabaja a una temperatura de 35 °C requiere un menor TRC (por encima de 1.3 d) para alcanzar un buen nivel de nitrificación que si opera a 30 °C (superior a 1.7 d). Estos resultados son similares a los obtenidos de forma experimental, con los que se concluyó que es necesario un TRC mínimo comprendido entre 1.56 y 1.75 d para un sistema a 30 °C y entre 1.40 y 1.52 d cuando se opera a 35 °C.

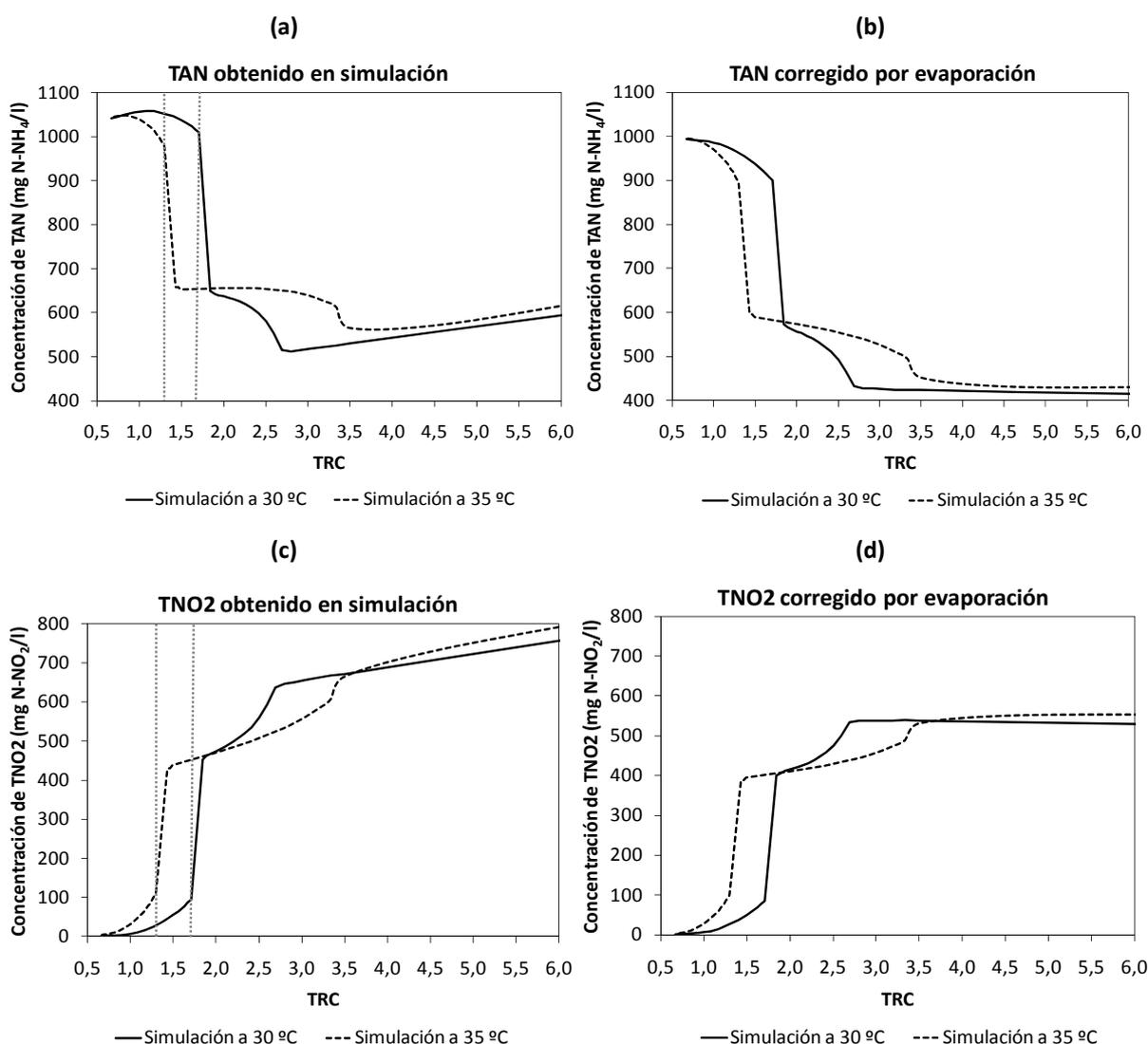


Figura 68. Evolución del proceso de nitrificación con el TRC del reactor SHARON. Concentraciones de TAN y TNO2 obtenidas por simulación (a y c) y corregidas por evaporación (b y d).

De la Figura 68 se puede extraer también que el proceso de nitrificación atraviesa por tres etapas en función del TRC del sistema, independientemente de la temperatura a la que se trabaja. Estas tres etapas se pueden ver más claramente en las gráficas donde se muestran las concentraciones corregidas por evaporación (Figura 68 (b) y (d)). En primer lugar se ve

que la concentración de amonio desciende lentamente (y por lo tanto la de nitrito asciende también muy despacio) a medida que se aumenta el TRC del reactor. Cuando se alcanza el TRC mínimo establecido para cada una de las temperaturas (por encima de 1.3 y 1.7 d para 30 y 35 °C, respectivamente) el proceso de nitrificación sufre un incremento brusco. A partir de este punto, la oxidación del amonio sigue aumentando pero de forma muy lenta a medida que se aumenta el TRC hasta llegar un momento en el proceso se encuentra al máximo de su capacidad y permanece estable a pesar de que se siga incrementando el TRC. La única diferencia entre las simulaciones a 30 y 35 °C es la duración de cada una de estas etapas en función del TRC.

Estos cambios en el proceso de nitrificación en función del TRC se pueden entender mejor si se observa las predicciones del modelo para la alcalinidad a distintos TRC (Figura 69). Como se puede ver en dicha figura la alcalinidad también presenta una evolución en tres etapas. Lo que sucede en el sistema es lo siguiente:

- 1º) Cuando el TRC es muy bajo el proceso de nitrificación es mínimo y por lo tanto apenas existe oxidación de amonio. Esto conlleva que no exista un descenso del pH y apenas se consume alcalinidad.
- 2º) Cuando el TRC es adecuado para el desarrollo de las bacterias amonioxidantes el proceso de nitrificación se incrementa de forma importante. Esto supone un descenso del pH que se corregirá con la alcalinidad presente en el sistema (de ahí el descenso brusco observado en la alcalinidad).
- 3º) A partir de aquí el incremento del TRC mejora de forma gradual el proceso de nitrificación (el amonio desciende, aparece nitrito y la alcalinidad se va consumiendo lentamente).
- 4º) Llega un momento en que la alcalinidad ha sido consumida por completo y por ello, aunque el TRC sea cada vez mayor, el proceso de nitrificación se estabiliza y no se puede aumentar el porcentaje de oxidación del amonio. Comparando las gráficas de las simulaciones y las corregidas por evaporación en la Figura 68 se puede ver que, en esta última etapa, es donde tiene mayor influencia el proceso de evaporación ya que es cuando se tiene un menor caudal de entrada y, por tanto, el caudal de evaporación provoca una concentración importante de los sustratos en el reactor.

Los resultados de estas simulaciones concuerdan con los obtenidos en el reactor SHARON R<sub>1</sub>. Como se describió en las simulaciones del apartado anterior, este reactor trabajaba a un TRC de 6.67 d con el que se encontraba en una situación de estabilidad en la que se oxidaba la

mitad del amonio de la entrada. En este reactor la alcalinidad se consumía por completo y por ello el proceso de nitrificación parcial se mantenía estable en un 50 % de oxidación de amonio. También es evidente que el sistema podía haber trabajado a un TRC menor, pero ya que con este valor se consiguió el lavado de las bacterias nitritoxidantes del sistema se decidió continuar trabajando con dicho TRC.

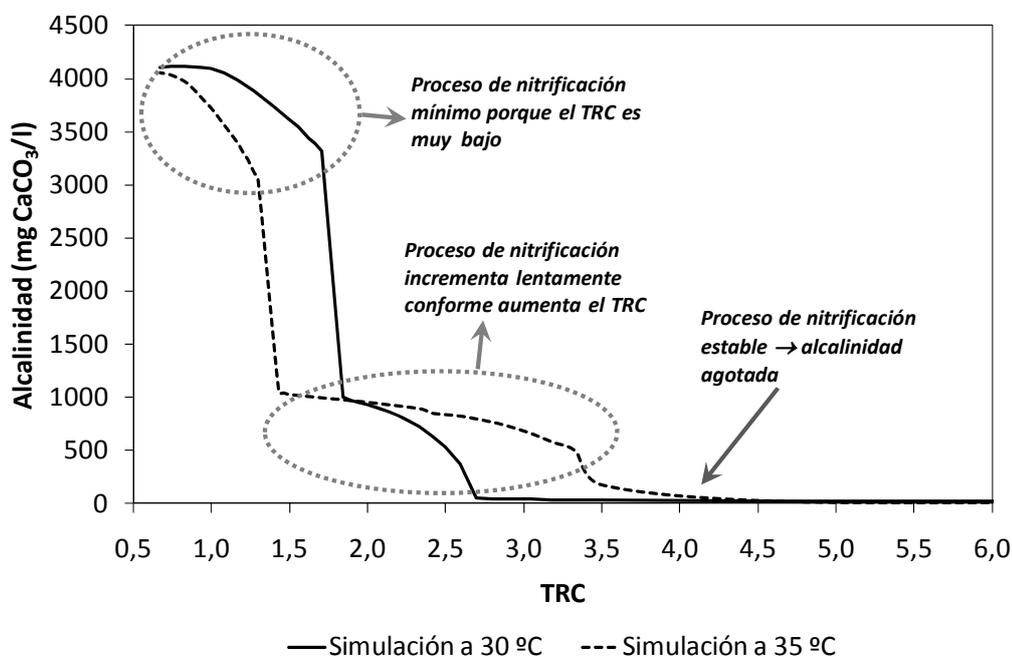


Figura 69. Evolución de la alcalinidad en el reactor SHARON a medida que se incrementa el TRC obtenida por simulación del sistema.

Como conclusión final de todas las simulaciones realizadas, decir que la buena concordancia entre los valores simulados y los experimentales supone la validación, tanto del modelo propuesto como de la metodología de calibración de los parámetros de las bacterias amonioxidantes presentes en el reactor SHARON.

## 6.2 Calibración de bacterias desarrolladas en una planta piloto de fangos activados.

A continuación se describen los resultados obtenidos en los ensayos realizados siguiendo la metodología experimental desarrollada en el apartado 5.2 (página 156) para la calibración de los parámetros de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes presentes en la planta de tratamiento de aguas residuales con eliminación de nutrientes a escala piloto. Esta metodología de calibración está basada también en técnicas respirométricas.

En este caso se trata de muestras que contienen una mayor diversidad de bacterias y por ello el proceso de calibración debe ser diferente. Para la determinación de los parámetros

del modelo de nitrificación desarrollado, la calibración se basa en la posibilidad de aislar los distintos procesos de oxidación del amonio y el nitrito debidos a los dos grupos de bacterias que intervienen en la nitrificación.

En todos los ensayos que se describen a continuación se emplearon las sales  $\text{NaNO}_2$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para obtener las concentraciones de nitrito y amonio, respectivamente, necesarias en cada uno de los experimentos.

### **6.2.1 Método para medir independientemente las actividades de bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes en cultivos mixtos.**

Antes de poder empezar con la calibración de la bacterias hubo que llevar a cabo un estudio para determinar el método más adecuado a seguir en los experimentos, que permitiese medir por separado la actividad de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes, involucradas en el proceso de nitrificación. En el apartado 5.2.1 (página 157) se han descrito los dos métodos que se han estudiado en el presente trabajo de investigación.

En primer lugar se intentó utilizar un inhibidor adecuado para la actividad de cada grupo de bacterias. En el caso del inhibidor de la actividad de las bacterias amonioxidantes, se empleó Aliltiourea (ATU) puesto que es un compuesto muy utilizado para la inhibición de la nitrificación, ya que este compuesto inhibe a las bacterias amonioxidantes. Únicamente fue necesario verificar que este compuesto no inhibía a las bacterias nitritoxidantes. Para ello se llevaron a cabo 3 ensayos con adición de 10 mg/l de nitrito<sup>1</sup>. En el segundo y tercer ensayo se añadieron además previamente 5 y 20 mg/l de Aliltiourea, respectivamente, para poder comparar la actividad de las bacterias en presencia y ausencia del inhibidor. La Figura 70 muestra los resultados obtenidos en los 3 ensayos. Como se puede ver, la diferencia entre las pendientes (OURs) antes y después de la adición del sustrato es similar en los tres casos, así que la respuesta de las bacterias ante la adición del sustrato es la misma tanto en el caso en que no se ha añadido ATU como en los dos ensayos con adición previa de este compuesto. Por lo tanto, como la ATU no afecta al crecimiento de las bacterias nitritoxidantes, es un inhibidor adecuado de las bacterias amonioxidantes.

---

<sup>1</sup> Al igual que en el resto de adiciones de los experimentos, una adición de 10 mg/l de nitrito indica que se añadió en el reactor de ensayo la disolución de nitrito necesaria para alcanzar los 10 mg/l de nitrito deseados.

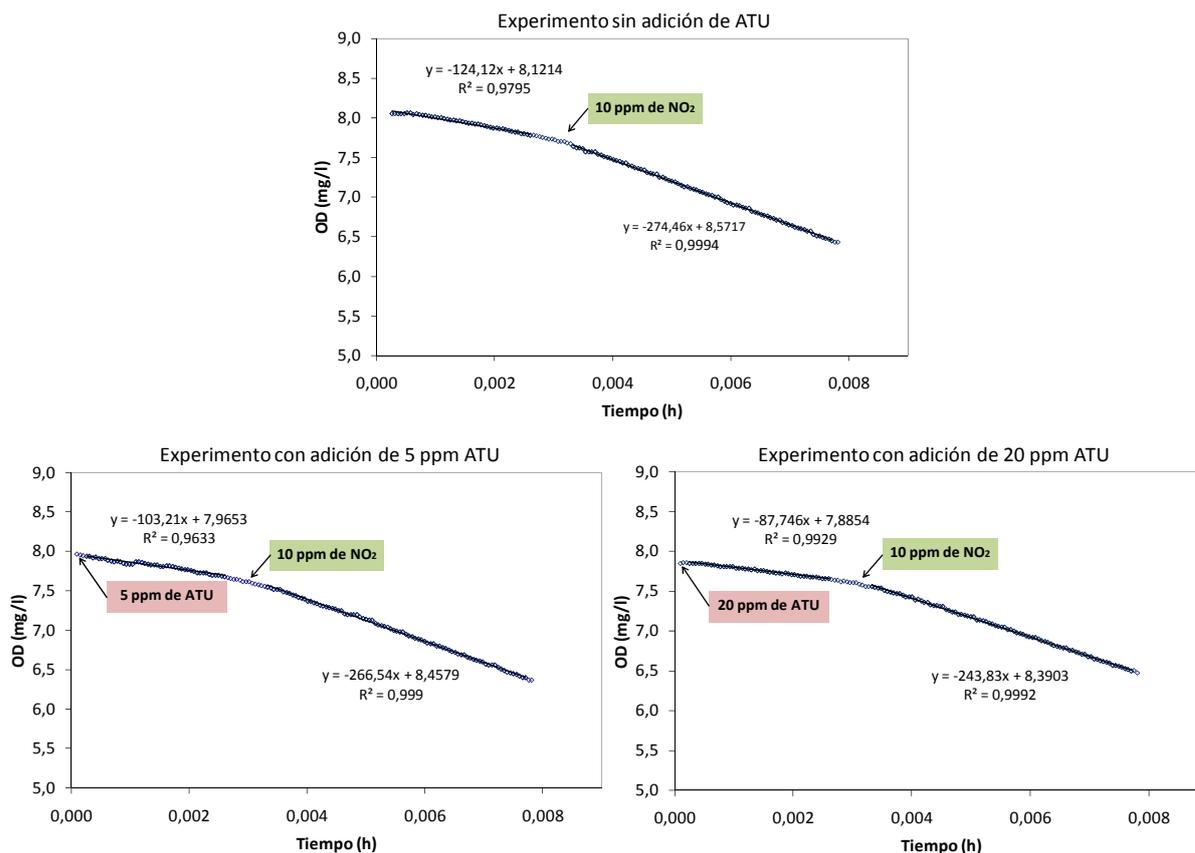


Figura 70. Actividad de las bacterias nitritoxidantes en ausencia y presencia de alitiourea.

A la hora de establecer un inhibidor de las bacterias nitritoxidantes se realizó una revisión bibliográfica para determinar compuestos usados en otros estudios para inhibir la actividad de estas bacterias. Se observó que diferentes estudios emplearon el clorato para inhibir la oxidación del nitrito en suelos, sedimentos y sistemas de fangos activados (Belser and Mays, 1980; Hynes and Knowles, 1983; Surmacz-Gorska *et al.*, 1996). En estos estudios se concluye que el  $\text{NaClO}_3$  inhibe la oxidación de nitrito a nitrato realizado por *Nitrobacter* spp., pero no afecta la oxidación de amonio a nitrito llevada a cabo por la *Nitrosomona* spp. En este trabajo de investigación se evaluó la eficacia como inhibidor del clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ).

Para determinar si era posible usar el clorato en el proceso de calibración se siguió la metodología descrita en el apartado 5.2.1.1 (página 158). En primer lugar se examinó si este compuesto inhibía por completo a las bacterias nitritoxidantes. Para ello se realizaron 3 ensayos añadiendo al inicio de cada uno cantidades diferentes de clorato (las concentraciones de clorato examinadas fueron 10, 20 y 50 mM) y posteriormente se realizó una adición de 10 mg/l de nitrito. Los resultados de estos ensayos se compararon con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores donde no se añadió ATU al reactor (Figura 70, gráfica superior). De esta forma se observa la actividad de las bacterias en ausencia del compuesto y su respuesta cuando en el medio hay presente diferentes concentraciones de

clorato. Como se ve en la Figura 71, en los ensayos donde se ha añadido menor cantidad de clorato (10 y 20 mM  $\text{ClO}_3^-$ ) la actividad de las bacterias nitróxidas es considerablemente menor que en el ensayo donde no existía inhibidor ninguno (Figura 70, gráfica superior). Pero no es hasta alcanzar la concentración de 50 mM  $\text{ClO}_3^-$  en donde se observa que no existe actividad ninguna de las bacterias nitróxidas al añadir el sustrato al reactor. De estos ensayos se obtiene que el clorato puede inhibir completamente la actividad de las bacterias nitróxidas, pero la concentración requerida para alcanzar este grado de inhibición es mucho mayor que las concentraciones propuestas en bibliografía (Hynes *et al.*, 1983 proponen una concentración de 10 mM).

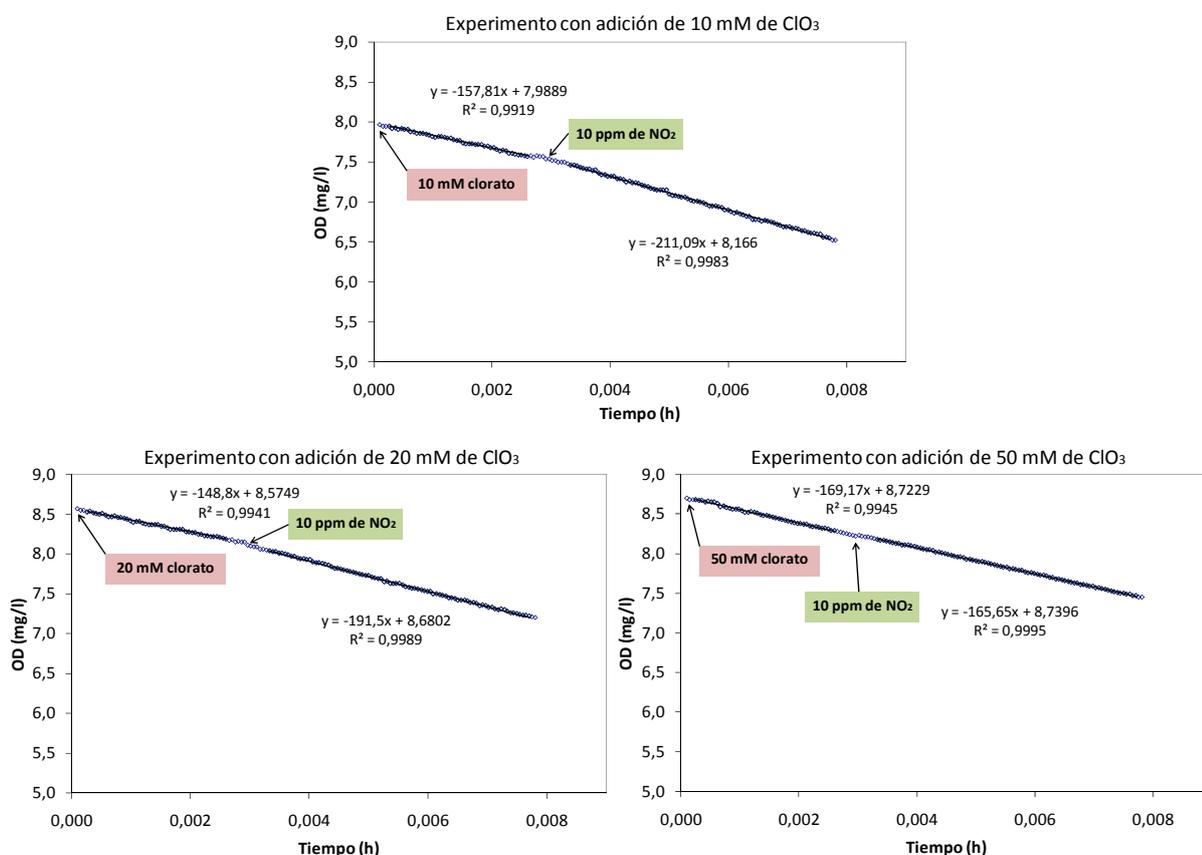


Figura 71. Actividad de las bacterias nitróxidas en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{NaClO}_3$ .

Después de verificar que el clorato inhibe la actividad de las bacterias nitróxidas, se realizaron otros experimentos para comprobar si el uso de este compuesto afecta o no al crecimiento de las bacterias amonioxidas. Observando la respuesta de las bacterias ante la adición de amonio para alcanzar una concentración de 5 mg/l, en ausencia y presencia de 50 mM de clorato, se pudo comprobar que la actividad de las bacterias amonioxidas se redujo en más de un 20 % cuando se añadió el clorato previamente en el fango (Figura 72). Aunque en las gráficas se observa una reducción de la actividad de casi un 35 %, al menos un 15 % de esta reducción es debido a la inhibición de las bacterias nitróxidas por el

clorato. Este dato se ha determinado a partir de los ensayos previos donde se ha podido determinar la actividad máxima alcanzada por las bacterias nitrificantes en ausencia del inhibidor. Hynes *et al.* (1983) sugieren que el clorato inhibe la oxidación del amonio a nitrito en cultivos mixtos debido al clorito ( $\text{ClO}_2^-$ ) producido por la reducción del clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ) llevada a cabo por las bacterias nitrificantes.

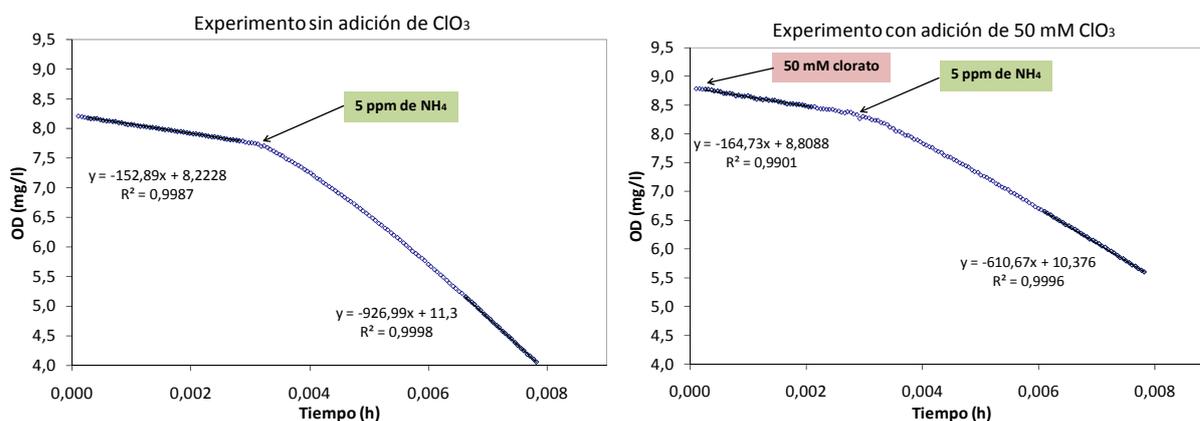


Figura 72. Actividad de las bacterias amonioxidantes en ausencia y presencia de 50 mM  $\text{ClO}_3^-$ .

Del estudio de la inhibición por clorato se concluyó que este compuesto inhibe la actividad de las bacterias nitrificantes si la concentración es suficientemente alta, pero a estas mismas concentraciones también se observa que existe cierto grado de inhibición de las bacterias amonioxidantes. Por lo tanto, se descartó el empleo de este compuesto en el proceso de calibración del modelo.

Ante la imposibilidad de utilizar clorato como inhibidor de bacterias nitrificantes, se decidió analizar el método de adiciones sucesivas propuesto por Moussa *et al.* (2003), que consiste en añadir al fango una concentración determinada de nitrito para alcanzar la velocidad máxima de las bacterias nitrificantes y una posterior adición de amonio para medir la actividad de amonioxidantes. Para determinar la validez de este método previamente había que conocer la concentración de nitrito a usar en la primera adición, para conseguir que las bacterias nitrificantes alcanzasen su actividad máxima. Este dato se obtuvo de los experimentos de calibración de la constante de semisaturación del ácido nitroso de las bacterias nitrificantes, resultados que se describen en el apartado 6.2.2.1 (página 227). De acuerdo con la representación de OUR frente al  $\text{NO}_2^-$  obtenida en dicho apartado se decidió usar una concentración de 3 mg N- $\text{NO}_2^-$ /l en los ensayos de adiciones sucesivas, porque este es el valor mínimo al que las bacterias alcanzan su actividad máxima.

Una vez conocida la concentración de nitrito a usar en los ensayos se llevaron a cabo experimentos para verificar la utilidad de este método. Estos experimentos consistieron en las tres adiciones consecutivas que se indican a continuación:

- ✓ *Primera adición:* 3 mg/l de nitrito para conseguir que las bacterias nitritoxidantes alcancen su máxima actividad.
- ✓ *Segunda adición:* 0.5 mg/l de amonio para proporcionar sustrato a las bacterias amonioxidantes (y evitar proporcionar excesivo sustrato a las NOB para luego verificar que estaban al máximo de su actividad).
- ✓ *Tercera adición:* 1 mg/l de nitrito para comprobar si se modificaba la actividad de las bacterias nitritoxidantes.

La inclusión de esta última adición en el procedimiento permite verificar que el proceso de oxidación de nitrito se encuentra a su máxima velocidad con la primera adición de nitrito. La Figura 73 muestra el resultado de uno de estos experimentos, donde se puede observar que la tercera adición no produce ningún cambio en la actividad registrada. Los resultados de estos experimentos mostraron que usando una concentración de nitrito de 3 mg/l N-NO<sub>2</sub> en la primera adición permite alcanzar la velocidad máxima en el proceso de oxidación de nitrito y, por lo tanto, con la adición consecutiva de amonio se puede medir la actividad de las bacterias amonioxidantes independientemente de la de las nitritoxidantes.

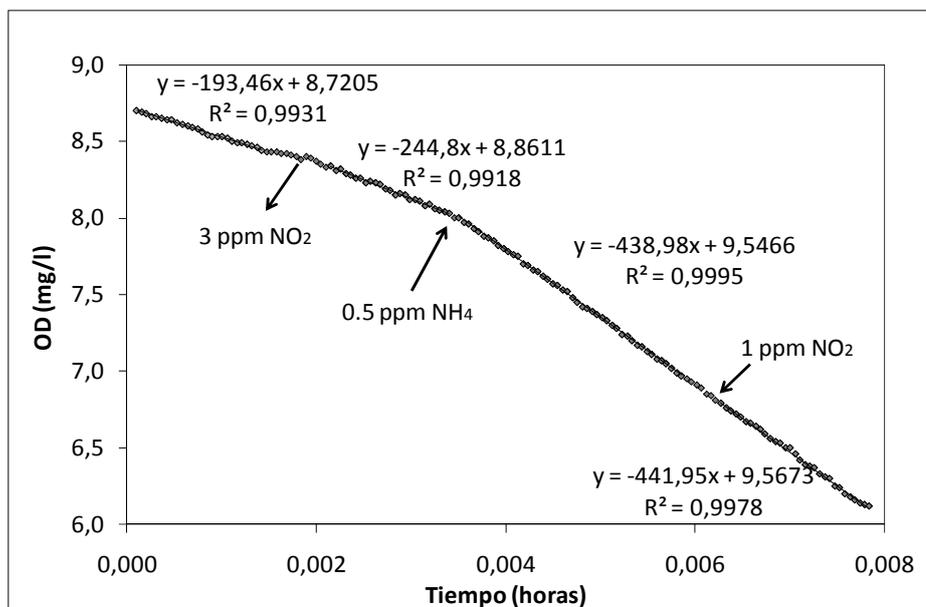


Figura 73. Experimento para evaluar la validez del método de adiciones consecutivas.

Ante los resultados obtenidos en los dos métodos evaluados se decidió emplear el método de adiciones sucesivas de nitrito y amonio para la calibración de los parámetros de las bacterias amonioxidantes, ya que este proporcionó mejores resultados.

## **6.2.2 Determinación de parámetros de las bacterias nitritoxidantes.**

### **6.2.2.1 Constantes de semisaturación e inhibición del ácido nitroso ( $K_{HNO_2}/K_{IHNO_2}$ ).**

Para la determinación de estas constantes se han llevado a cabo los experimentos descritos en el apartado 5.2.2.1.1 (página 164). Estas constantes se determinan conjuntamente ya que los ensayos consisten en medir la actividad de las bacterias a distintas concentraciones de nitrito, variándolas desde valores muy bajos (para determinar la afinidad por el sustrato) hasta valores lo suficientemente altos para determinar si existe o no inhibición por sustrato. Con este barrido de concentraciones se obtiene la variación de la OUR en función de la concentración de nitrito. En la determinación de estos parámetros se han llevado a cabo 9 experimentos a pH diferente. En cada experimento se mide la actividad de las bacterias a distintas concentraciones de nitrito utilizando para cada concentración una nueva muestra de fango en condiciones endógenas.

En la Tabla 46 se muestran las concentraciones de nitrito empleadas en cada ensayo y el pH en cada experimento. Se llevaron a cabo 5 experimentos en la calibración realizada cuando el reactor BABE se encontraba operativo, y otros 4 cuando la planta piloto trabajaba sin este reactor. Como se observa en la Tabla 46 la concentración máxima de nitrito evaluada fue de 10 mg/l, ya que ésta es una concentración bastante más alta que las que suelen darse en un proceso de fangos activados. También se puede ver que el experimento realizado a menor pH fue el N° 4, con un valor de 6.9. Esto es debido a que en los experimentos llevados a cabo a un pH de 6.5 no se detectaba actividad de las bacterias nitritoxidantes para ninguna concentración de nitrito, es decir, a valores inferiores de pH la inhibición por este factor no permitía el crecimiento de la biomasa.

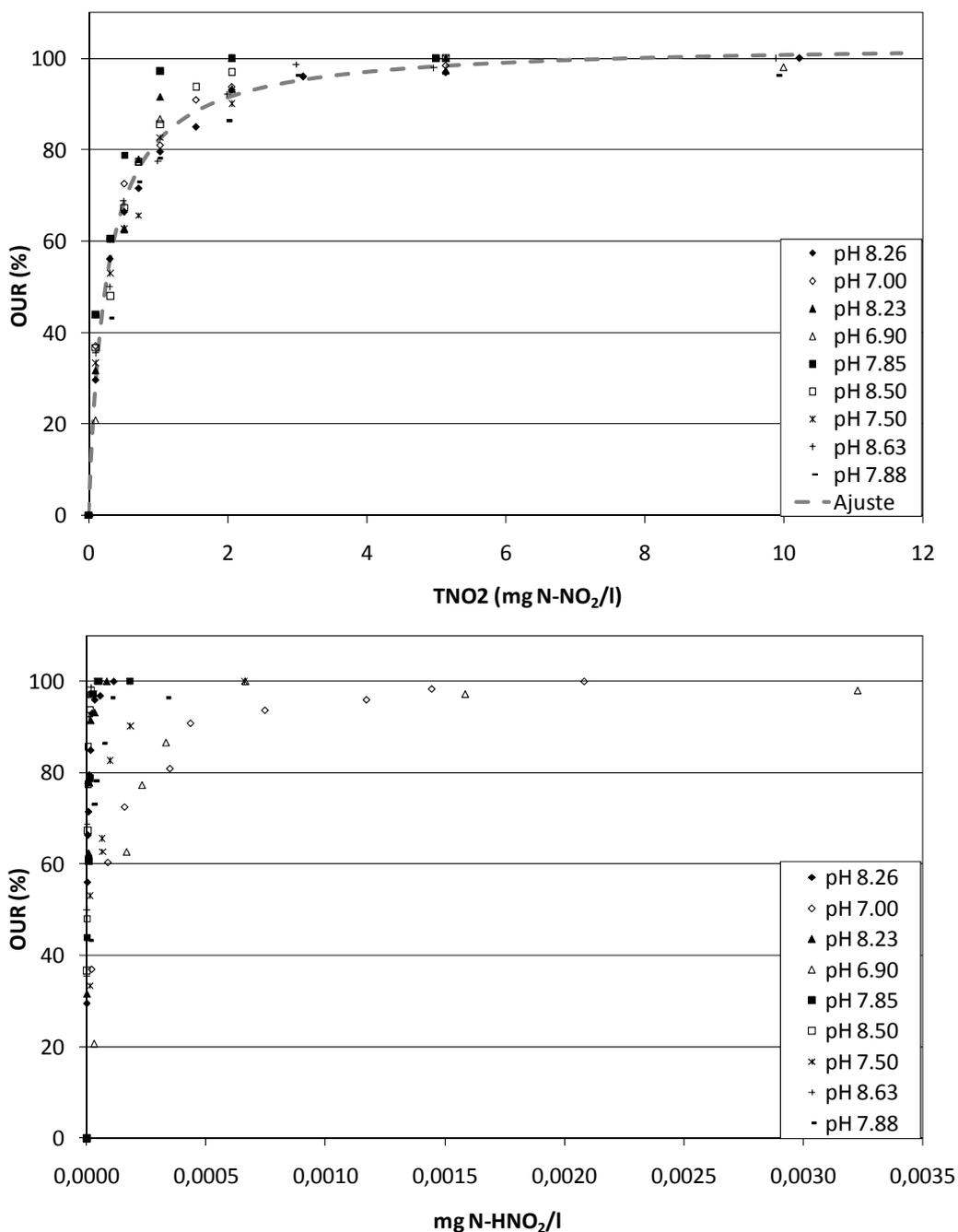
		Experimento								
		Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8	Nº 9
Etapa →		Con reactor BABE					Sin reactor BABE			
pH →		<b>8.26</b>	<b>7.00</b>	<b>8.23</b>	<b>6.90</b>	<b>7.85</b>	<b>8.50</b>	<b>7.50</b>	<b>8.63</b>	<b>7.88</b>
Concentración de TNO2 (mg N-NO <sub>2</sub> /l)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.30
	0.31	0.31	0.51	0.52	0.31	0.31	0.31	0.30	0.70	
	0.52	0.52	0.72	0.72	0.52	0.52	0.52	0.50	1.00	
	0.72	1.03	1.03	1.03	1.03	0.72	0.72	1.99	2.00	
	1.03	1.55	2.06	2.06	2.06	1.03	1.03	2.99	2.99	
	1.55	2.06	5.13	5.14	5.13	1.55	2.06	4.97	4.98	
	2.06	3.09		10.10		2.06	5.13	9.89	9.90	
	3.09	5.13				5.13				
	5.13	10.22								
	10.22									

Tabla 46. Concentraciones de nitrito evaluadas en cada una de los ensayos y pH al que fueron llevados a cabo los experimentos.

Los resultados de estos experimentos se han normalizado respecto al valor máximo de OUR alcanzado en cada caso para poder comparar las distintas gráficas entre sí. La Figura 74 muestra la velocidad de consumo de oxígeno registrada frente a las concentraciones de TNO2 y de ácido nitroso en cada uno de los experimentos. Se han representado todos los datos experimentales en un mismo gráfico ya que no se observó diferencias aparentes entre los ensayos realizados en las dos etapas, con y sin reactor BABE en el esquema de operación de la planta piloto.

El aspecto más importante a destacar en estas gráficas es que el modelo reproduce adecuadamente los resultados experimentales si se considera el TNO2 como sustrato en la ecuación del modelo, contrariamente a lo que cabría esperar dado que según la bibliografía el sustrato real asimilado por las bacterias es el HNO<sub>2</sub>. La representación de la actividad de las bacterias frente a la concentración de ácido nitroso no presenta correlación entre los diferentes experimentos a diferentes valores de pH; por ejemplo, para una concentración de 0.0001 mg/l de HNO<sub>2</sub> la actividad de las bacterias varía entre 60-100 %. Si se representa frente a la concentración de TNO2 los experimentos a diferentes pH presentan una clara tendencia que ha podido ajustarse con el modelo (Ec.- 102) utilizando una constante de semisaturación  $K_{NO_2} = 0.26$  mg N-NO<sub>2</sub>/l. Este valor es similar al determinado por Manser et al. (2005a) en la calibración de una planta piloto mediante ensayos en batch (0.28 mg N-NO<sub>2</sub>/l) y por Wett y Rauch (2003) en un SBR a escala piloto (0.3 mg N-NO<sub>2</sub>/l).

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{S_{NO_2}}{S_{NO_2} + K_{NO_2}} \quad \text{Ec.- 102}$$



**Figura 74. Actividad de las bacterias nitróxidas expresada en porcentaje de OUR máxima frente a la concentración de TNO<sub>2</sub> (superior) y la concentración de HNO<sub>2</sub> (inferior).**

La otra conclusión clara que se obtiene de estas gráficas es que las bacterias nitróxidas no presentan inhibición por sustrato a las concentraciones con las que se han realizado los experimentos. Dado que, lo normal en una planta de tratamiento de aguas residuales es que no exista acumulación de nitrito, el término de inhibición de las bacterias nitróxidas por ácido nítrico puede ser eliminado del modelo. Esta conclusión fue obtenida por la mayoría de modelos en los que se trabajó con aguas residuales con concentración típicas de nitrito (Moussa et al., 2005; Kampschreur et al., 2007, 2008; Kaelin et al., 2009 entre otros).

### **6.2.2.2 Constante de inhibición del amoníaco ( $K_{INH3}$ ).**

Para determinar si las bacterias nitritoxidantes pueden ser inhibidas por altas concentraciones de amoníaco habría que llevar a cabo los experimentos descritos en el apartado 5.2.2.1.2 (página 165). Sin embargo, visto los resultados de la calibración de las bacterias en el reactor SHARON, se decidió no realizar estos ensayos ya que era probable que existiese una inhibición por salinidad antes que por alta concentración de amoníaco. En cambio, se llevaron a cabo dos experimentos con fango de la planta piloto en condiciones endógenas para determinar de forma conjunta la inhibición por amoníaco de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes. En estos ensayos se sometió a una única muestra de fango a incrementos sucesivos de amonio hasta concentraciones mucho más altas que las habituales para un sistema de fangos activados. Los valores de temperatura y pH fijados en estos experimentos fueron de 20 °C y 7.0, respectivamente.

En la Figura 75 se pueden ver los resultados obtenidos en los dos ensayos y las concentraciones de TAN empleadas en cada uno de los intervalos. Como se observa se necesitan alcanzar concentraciones muy altas (alrededor de 400 mg/l de TAN) para poder llegar a inhibir la actividad de las bacterias. En una planta de tratamiento de aguas residuales las concentraciones de amoníaco no llegan a ser tan altas como en un reactor SHARON, y por ello, es casi imposible llegar a concentraciones que provoquen inhibición de la actividad bacteriana. Así que en la ecuación cinética del proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes se puede despreciar el término de inhibición por amoníaco o por salinidad siempre que las concentraciones con las que se trabaje no sean excesivas.

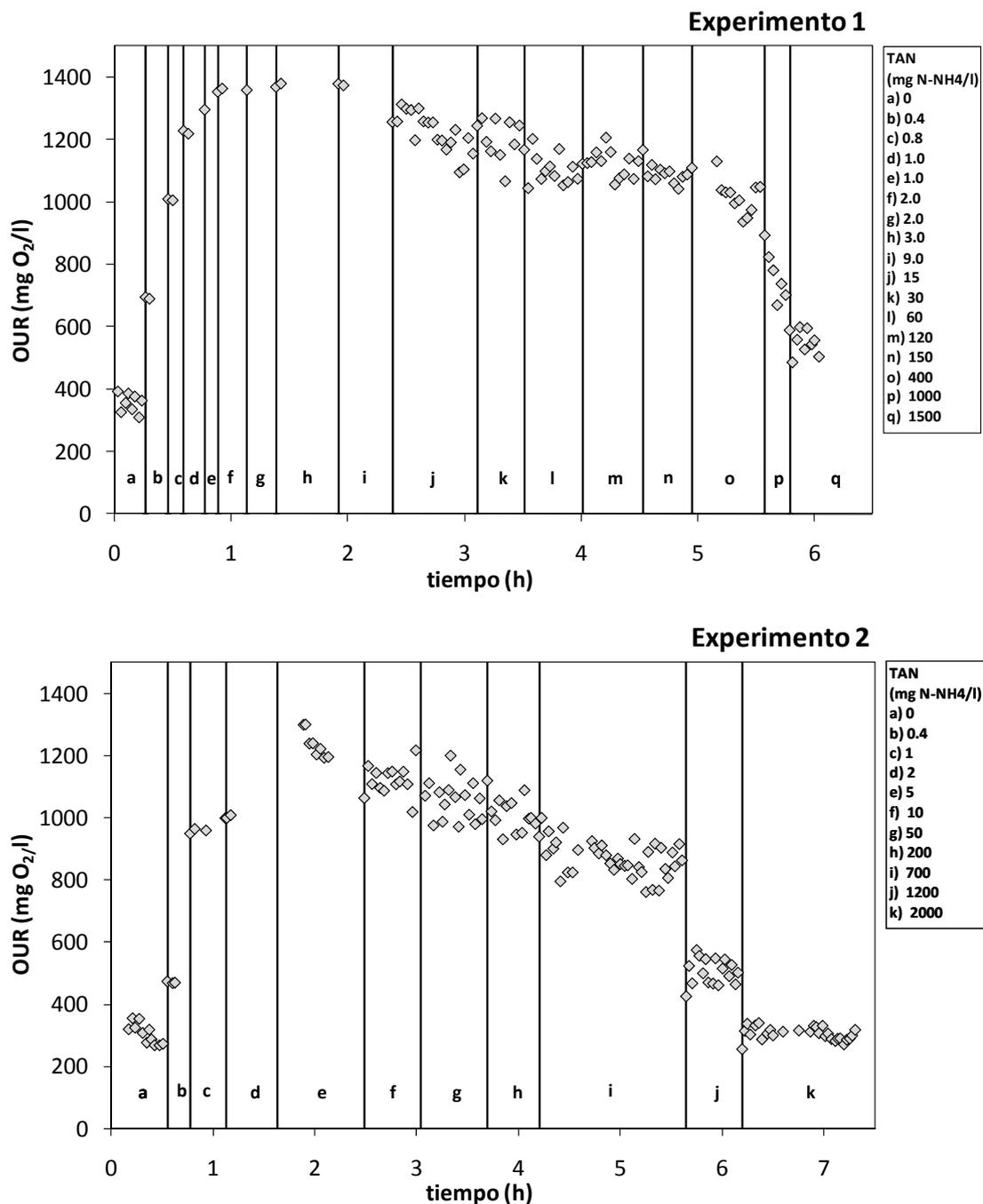


Figura 75. Evolución en el tiempo de la actividad de las bacterias a medida que se incrementa la concentración de TAN (mg N-NH<sub>4</sub>/l).

No se ha realizado una determinación de la constante de inhibición por salinidad, como se hizo en la calibración del reactor SHARON, porque en estos ensayos no se ha separado la actividad de amonioxidantes y nitritoxidantes, ya que lo único que se pretendía era corroborar que se necesitan alcanzar concentraciones muy altas (inusuales de un EDAR) para llegar a inhibir a las bacterias. Además, tampoco se tienen medidas de salinidad de la planta piloto con las que determinar la constante de inhibición por este factor.

### **6.2.2.3 Constante de semisaturación del oxígeno ( $K_{O_2}$ ).**

Se llevaron a cabo dos determinaciones de la constante  $K_{O_2}$  siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.1.3 (página 166), una durante la fase en que el reactor BABE se encontraba operativo y otra cuando se eliminó este reactor del esquema de la planta piloto. En cada una de estas determinaciones se llevaron a cabo los dos experimentos descritos para la determinación de la constante. En el experimento con adición de sustrato se añadieron antes de empezar el ensayo 15 mg/l de ATU para asegurar que no existía ningún consumo de oxígeno por parte de las bacterias amonioxidantes. Posteriormente se añadieron 15 mg/l de  $NO_2$ , evitando una limitación del crecimiento de las bacterias nitritoxidantes por falta de sustrato. La Figura 76 muestra la evolución de OD frente al tiempo realizadas en las calibraciones.

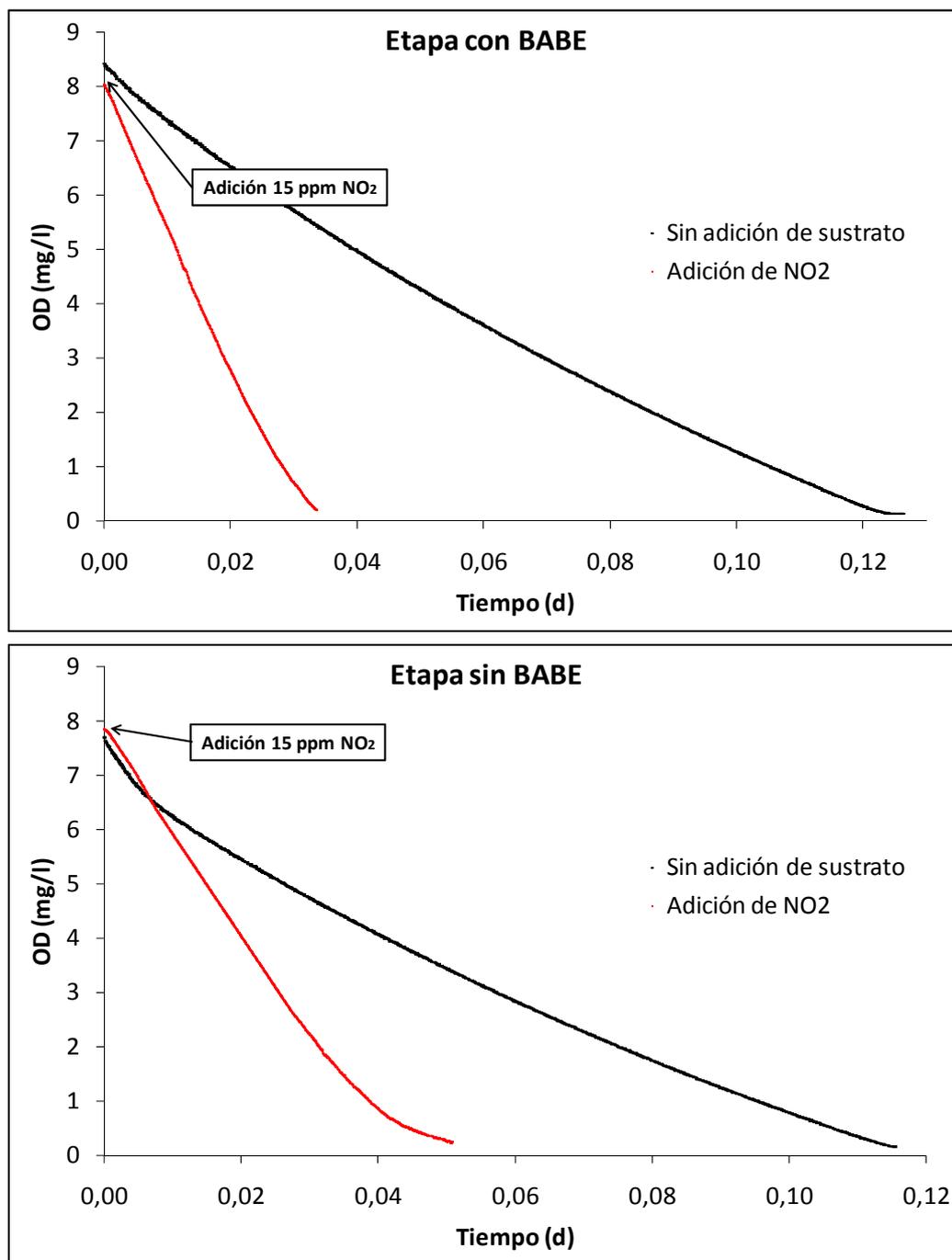


Figura 76. Resultados experimentales de los ensayos para la determinación de la  $K_{O_2}$  de las bacterias nitritoxidantes de la planta piloto.

El proceso de ajuste de los datos experimentales fue similar al descrito en la calibración del reactor SHARON, con la salvedad de que en este caso se tienen dos gráficas de OD frente tiempo: la primera corresponde a la actividad de la biomasa en condiciones endógenas (datos sin adición de sustrato) y la otra representa la evolución del OD debido tanto al consumo endógeno como a la actividad de las bacterias nitritoxidantes (datos obtenidos con adición de nitrito). Para poder determinar la constante de semisaturación  $K_{O_2}$  correspondiente a las bacterias nitritoxidantes se debe realizar un ajuste del modelo a esta

segunda gráfica de OD frente a tiempo, teniendo en cuenta el consumo de oxígeno medido con el primer ensayo sin adición de ningún sustrato. Como se describió en la metodología de calibración (apartado 5.2.2.1.3, página 166) la función de ajuste en este caso tiene un término correspondiente al consumo de las bacterias nitritoxidantes y otro debido a la actividad endógena. Por lo tanto, la forma de determinar el OD que se debe ajustar a los datos experimentales es la siguiente:

$$S_{O_2}^{t+\Delta t} = S_{O_2}^t - K \cdot \frac{S_{O_2}^t}{K_{O_2} + S_{O_2}^t} \cdot \Delta t - f^{end}(O_2) \cdot \Delta t \quad \text{Ec.- 103}$$

En este ajuste la  $f^{end}(O_2)$  se corresponde con la pendiente en cada intervalo de tiempo calculada a partir de la gráfica del experimento sin adición de sustrato como se indica en la siguiente expresión:

$$f^{end}(O_2) = \frac{S_{O_2}^{t+\Delta t} - S_{O_2}^t}{(t + \Delta t) - t} = \frac{S_{O_2}^{t+\Delta t} - S_{O_2}^t}{\Delta t} \quad \text{Ec.- 104}$$

Ajustando los valores de K y  $K_{O_2}$  por el método de mínimos cuadrados para reproducir las medidas de OD, se ha obtenido una predicción adecuada de los dos experimentos empleando la misma constante de semisaturación del oxígeno. El resultado de este ajuste es el que se muestra en la Figura 77.

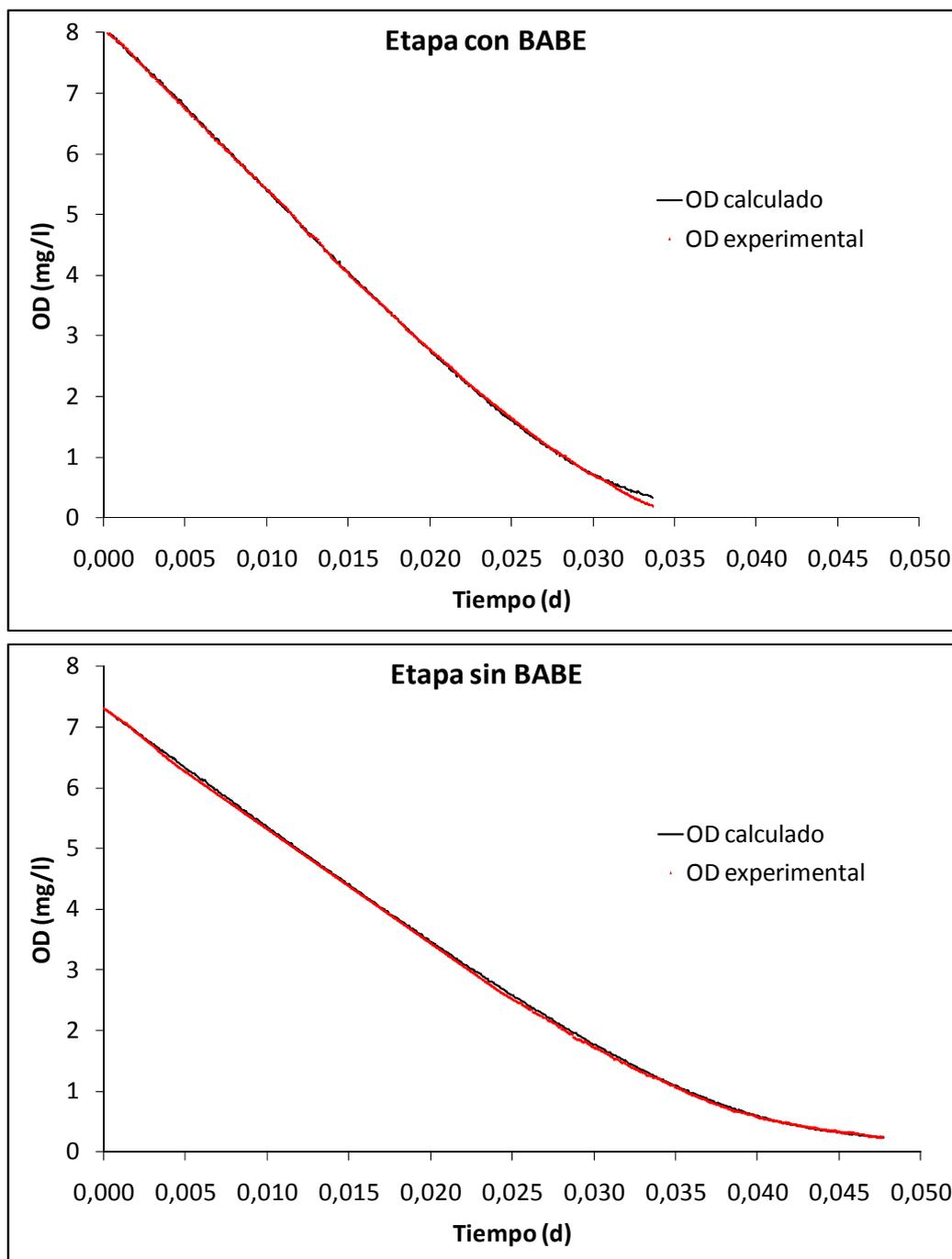


Figura 77. Resultados del ajuste para la determinación de la constante  $K_{O_2}$  de las bacterias nitrificantes en planta piloto.

Como se puede ver el modelo propuesto reproduce adecuadamente los datos experimentales. En el proceso de ajuste descrito se ha obtenido una  $K_{O_2} = 0.67 \pm 0.02$  mg  $O_2/l$ , valor que se encuentra dentro del rango de valores obtenidos del estudio bibliográfico (0.13 – 1.10 mg  $O_2/l$ ).

### 6.2.2.4 Constantes de inhibición del pH ( $K_H/K_{IH}$ ).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.1.4 (página 167) se ha obtenido la variación de la OUR en función del pH para las bacterias nitritoxidantes. Para ello se ha medido la velocidad máxima de las bacterias en una serie de experimentos en los que se ajusta el pH inicial al valor a estudiar y posteriormente se añade la misma concentración de nitrito en cada uno de ellos. En estos experimentos se han añadido 5 mg/l de nitrito como sustrato de las bacterias nitritoxidantes ajustando previamente el pH del fango a los valores que se muestran en la Tabla 47. Esta concentración de nitrito añadida permite que las bacterias nitritoxidantes alcancen su velocidad máxima, y ha sido obtenida de los resultados de los experimentos previos para la determinación de la  $K_{NO_2}$ . La Figura 78 muestra los puntos experimentales obtenidos en cada uno de los ensayos (ver los resultados de cada ensayo en la Figura 79). Estos experimentos se llevaron a cabo en la fase en que el reactor BABE no se encontraba operativo, pero vistos los resultados de otras constantes cabe esperar que tampoco exista un cambio significativo en este caso.

Ensayo	pH
1	6,20
2	6,49
3	6,82
4	7,22
5	7,54
6	7,83
7	8,31
8	8,72
9	9,22
10	9,95

Tabla 47. Valores de pH a los que se llevaron a cabo los experimentos.

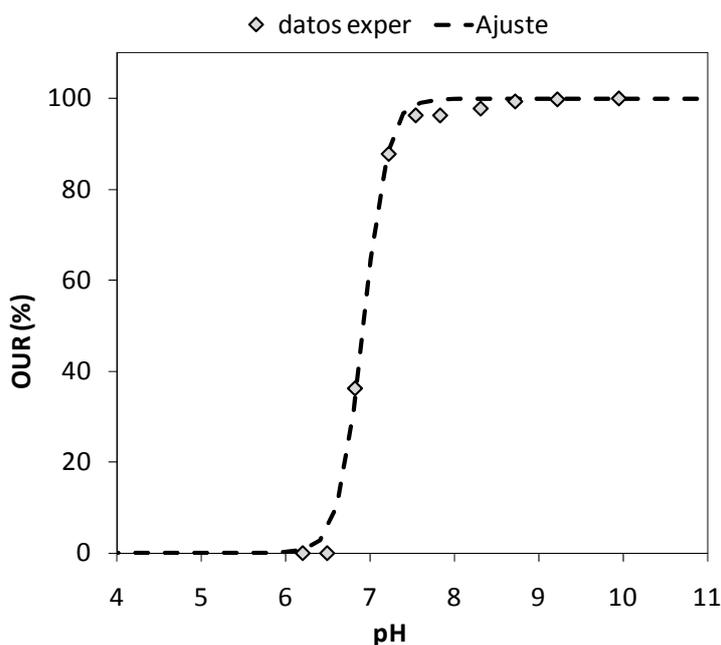


Figura 78. Efecto del pH en la actividad de las bacterias nitritoxidantes presentes en la planta piloto.

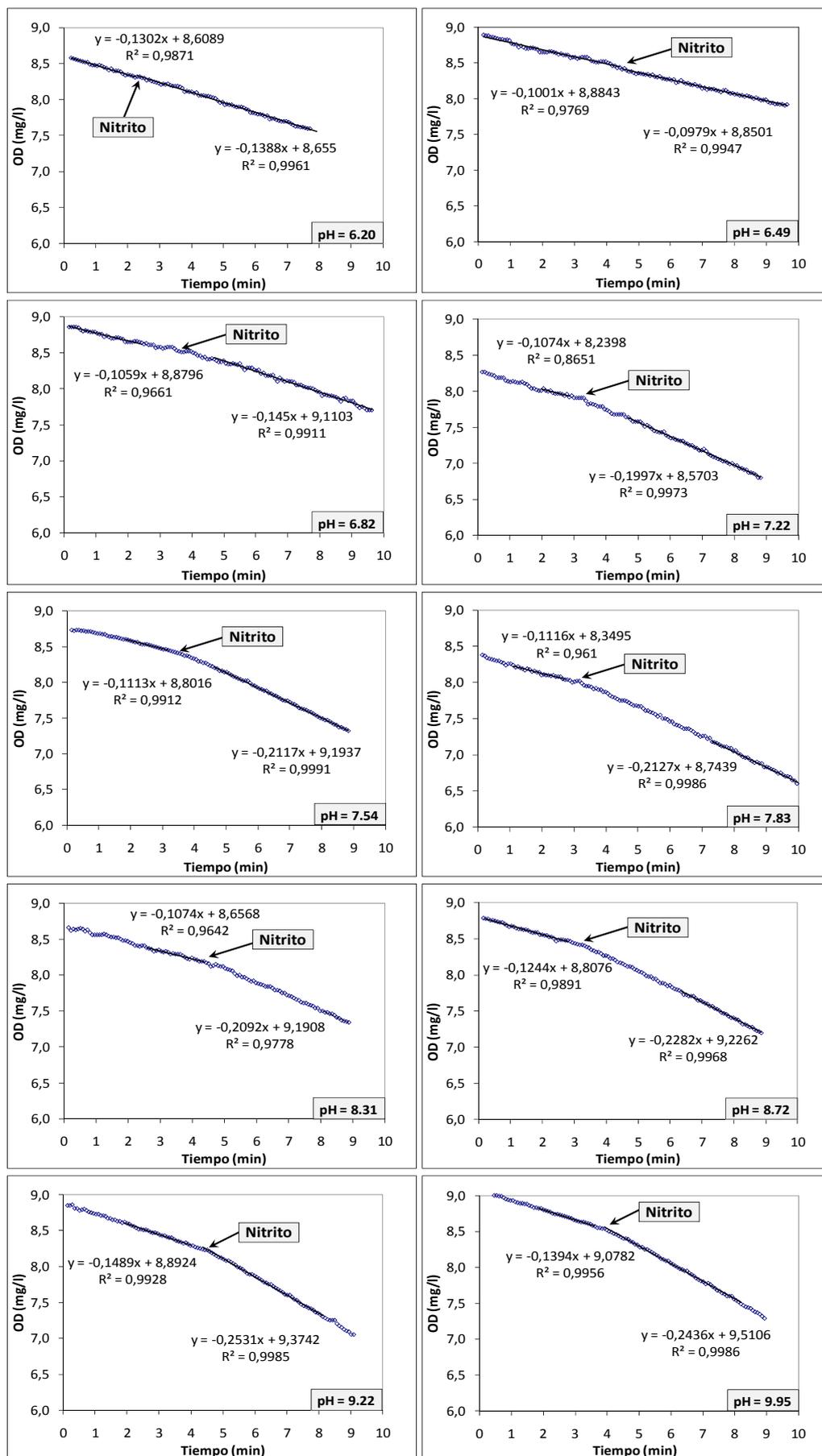


Figura 79. Ensayos para la determinación de las constantes de inhibición del pH para las NOB.

Dado que la función típica de inhibición no podía reproducir el cambio tan brusco de actividad observado en la gráfica, la función de pH utilizada en el ajuste ha sido la misma que la utilizada en la calibración de las constantes del pH del reactor SHARON. Como se puede observar en la Figura 78 en este caso solamente se ha podido ajustar la primera parte de la función del pH ya que con los datos experimentales obtenidos no se ha detectado el efecto de inhibición de la actividad por valores de pH altos. En base a estos resultados se ha modificado la función de pH del modelo de crecimiento de las bacterias nitróxicas, quedando como se muestra en la Ec.- 105.

$$I_{pH} = \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \quad \text{Ec.- 105}$$

Con el ajuste de esta función a los datos experimentales se han determinado las constantes  $A_H = 6.9$  y  $K_H = 6.91$ . Hay dos aspectos importantes que destacan de los resultados obtenidos:

- ✓ La actividad de las bacterias nitróxicas desciende de forma drástica si el pH es inferior a un valor aproximado de 7.10. Este aspecto ya se observó cuando se realizaron los experimentos para la determinación de la constante  $K_{NO_2}$  (apartado 6.2.2.1, página 227), ya que como se comentó, al intentar realizar ensayos a 6.5 de pH no se registró ninguna actividad de las bacterias.
- ✓ Las bacterias nitróxicas no se ven inhibidas por un valor de pH muy elevado, ya que a un pH de casi 10, estas aún se encuentran en su actividad máxima.

Comparado con los resultados de bibliografía lo más llamativo de esta gráfica es el pH tan elevado al que las bacterias siguen activas. Según los estudios previos consultados, a estos valores de pH, las bacterias nitróxicas deberían estar completamente inhibidas (en la bibliografía consultada se ha encontrado un valor máximo de  $K_{IH}$  de 9.5 (Jones *et al.*, 2007), por lo que a este pH las bacterias deberían de encontrarse ya al 50 % de su actividad máxima).

#### **6.2.2.5 Rendimiento celular de las bacterias nitróxicas ( $Y_{NO}$ ).**

La determinación del rendimiento de las bacterias nitróxicas se llevó a cabo con fango de la planta piloto con y sin reactor BABE en el esquema de operación. En cada una de las determinaciones se realizaron 2 adiciones de aproximadamente 10 mg/l de nitrato, y se registró la velocidad de consumo de oxígeno hasta que el sustrato fue completamente consumido (la OUR vuelve a valor registrado en condiciones endógenas). Para la inhibición

de las bacterias amonioxidantes se añadió 15 mg/l de ATU antes de comenzar las adiciones de nitrito.

La Figura 80 muestra la evolución de la OUR en los experimentos tras cada una de las adiciones realizadas. Determinando el área bajo la curva entre el instante de la adición del nitrito y el punto en que la OUR vuelve a descender (el nitrito se ha agotado) se obtiene el oxígeno consumido para la oxidación de los 10 mg/l de nitrito. Con los datos de oxígeno y nitrito consumidos, y aplicando la ecuación Ec.- 106 se obtiene la constante de rendimiento de nitritoxidantes ( $Y_{NO}$ ) para cada una de las adiciones de nitrito.

$$Y_{NO} = \frac{1.14 \cdot NO_2^- \text{ cons} - O_2 \text{ cons}}{NO_2^- \text{ cons}} \quad \text{Ec.- 106}$$

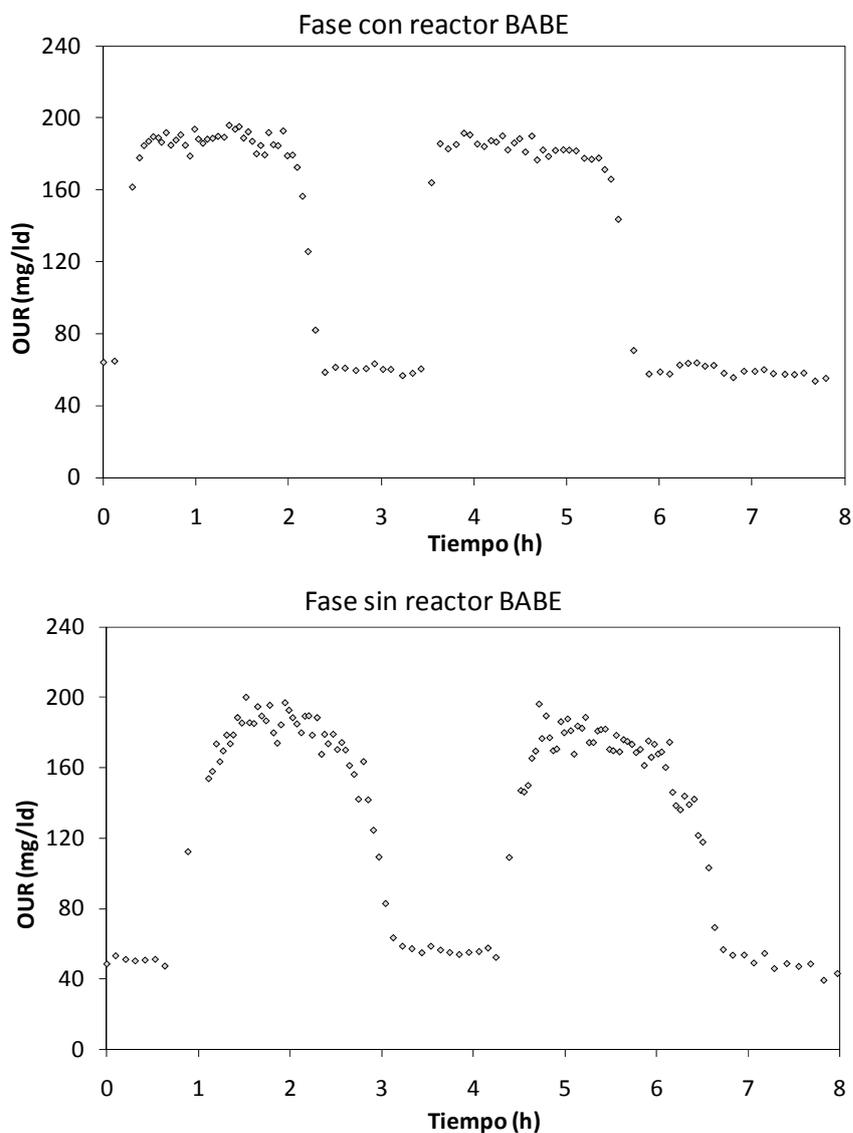


Figura 80. Evolución de la OUR en ensayos para la determinación de la  $Y_{NO}$  de la planta piloto.

Fase	Adición	Nitrito añadido (mg N-NO <sub>2</sub> /l)	Oxígeno consumido (mg O <sub>2</sub> /l)	Y <sub>NO</sub> (g DQO/g N-NO <sub>2</sub> )
Con BABE	1ª adición	10.19	10.96	0.065
	2ª adición	10.72	11.44	0.073
Sin BABE	1ª adición	10.14	10.97	0.058
	2ª adición	10.41	11.04	0.079

Tabla 48. Concentración de nitrito añadido en cada ensayo y valor de Y<sub>NO</sub> determinado.

En la Tabla 48 se puede ver que se obtiene un valor medio del rendimiento de 0.069 g DQO/g NO<sub>2</sub>. Este valor obtenido es ligeramente superior a los propuestos por la mayoría de los estudios consultados (0.042 de Wiesmann, 1994; 0.03 de Volcke *et al.*, 2006), pero hay autores que proponen valores similares (como Moussa *et al.*, 2005 que determina un valor de 0.06 g DQO/g N) e incluso superiores (Jones *et al.*, 2007 proponen una Y<sub>NO</sub> de 0.09 g DQO/g N). Estas variaciones de la constante pueden ser debidas a diferentes relaciones S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> empleadas en los ensayos, como se comentó en el apartado de determinación de la Y para bacterias amonioxidantes presentes en el reactor SHARON (apartado 6.1.6, página 206).

#### 6.2.2.6 Tasa máxima de crecimiento de las bacterias nitritoxidantes (μ<sub>NO</sub>).

Para la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias nitritoxidantes presentes en la planta piloto se usaron los resultados de los ajustes realizados en la determinación de las constantes K<sub>HNO<sub>2</sub></sub> y K<sub>IHNO<sub>2</sub></sub> para dichas bacterias (apartado 6.2.2.1, página 227). En los ajustes de estos experimentos se obtenía una constante K en la que se incluían las funciones que se muestran en la ecuación Ec.- 107. A partir de esta ecuación se determina el valor de la tasa de crecimiento de las bacterias nitritoxidantes (Ec.- 108).

$$K = \mu_{NO}^{max} \cdot X_{NO} \cdot \frac{1.14 - Y_{NO}}{Y_{NO}} \cdot \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + K_{O_2}} \quad \text{Ec.- 107}$$

↓

$$\mu_{NO}^{max} = K \cdot \frac{Y_{NO}}{X_{NO} \cdot (1.14 - Y_{NO})} \cdot \frac{S_{O_2} + K_{O_2}}{S_{O_2}} \quad \text{Ec.- 108}$$

En esta última expresión se conocen las constantes K<sub>O<sub>2</sub></sub> y Y<sub>NO</sub>, determinadas en apartados anteriores. Únicamente fue necesario determinar la concentración de bacterias (X<sub>NO</sub>) mediante el método de Borrás L. (2008), explicado en el apartado de la determinación de la tasa de crecimiento de las AOB presentes en el reactor SHARON. En este caso hay que tener en cuenta la concentración de materia inerte particulada (X<sub>I0</sub>) en el agua de entrada de la

planta para restarla a la  $DQO_{SUS}$  medida y obtener así la DQO correspondiente a la biomasa (viable + no viable) como se muestra en la siguiente expresión:

$$\underbrace{\%X_H + \%X_{NH} + \%X_{NO} + \%X_{PAO}}_{\text{Biomasa viable}} + \underbrace{\%X_I}_{\text{No viable}} = \underbrace{DQO_{SUS} - X_{I0} \cdot \frac{TRC}{TRH}}_{\text{DQO de biomasa}} = 100\% \quad \text{Ec.- 109}$$

Sabiendo que la concentración de  $X_{I0}$  es 29 mg DQO/l y que mediante la técnica de viabilidad celular se determinó un 21 % de biomasa no viable se tiene:

$$\begin{aligned} \overbrace{\%X_H + \%X_{NH} + \%X_{NO} + \%X_{PAO}}^{79\%} + 21\% &= DQO_{SUS} - 29 \cdot \frac{TRC}{TRH} \\ DQO_{Viable} &= 0.79 \cdot \left( DQO_{SUS} - 29 \cdot \frac{TRC}{TRH} \right) \\ DQO_{No\ Viable} &= 0.21 \cdot \left( DQO_{SUS} - 29 \cdot \frac{TRC}{TRH} \right) \\ X_{NO} &= \%X_{NO} \cdot DQO_{Viable} \cdot \underbrace{0.91}_{EUB/DAPI} \end{aligned}$$

Calibración	$DQO_{SUS}$ mg DQO/l	% $X_{NO}$	$X_{NO}$ mg DQO/l	$\mu_{NO}^{max}$ $d^{-1}$
Etapa con BABE	1586.0	8 ± 2 %	62.03	<b>0.24</b>
Etapa sin BABE	1455.0	2 ± 1 %	14.84	<b>0.42</b>

Tabla 49. Parámetros obtenidos en la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias NOB presentes en la planta piloto.

En la Tabla 49 se muestran los valores de las velocidades de crecimiento de las bacterias nitróxidas ( $\mu_{NO}$ ) determinadas en ambas calibraciones de la planta piloto. Como se puede ver en dicha tabla, la velocidad de crecimiento de las bacterias fue casi el doble cuando la planta operaba sin el reactor BABE. Ya que en ambas etapas en el sistema se eliminaba todo el nitrógeno amoniacal que entraba, esta gran diferencia entre las velocidades de una etapa a otra puede ser debida a dos aspectos:

- ◇ Por un lado el reactor BABE hacía que el TRC para las bacterias fuera diferente. Al eliminar el reactor BABE del esquema de operación de la planta las bacterias se vieron perjudicadas (en la Tabla 50 se observa un descenso del 8 al 2 % de bacterias nitróxidas en la planta, y del 8 al 6 % en bacterias amonioxidas), ya que fueron sometidas a una disminución del TRC de 7 a 6.2 d. Además, el reactor BABE suponía un volumen de la planta en el que la temperatura era 10 °C mayor que en el

resto de reactores, y ello favorecía también el crecimiento de las bacterias. Por lo tanto, el descenso de TRC y  $T^a$  pudo llevar a las bacterias a una adaptación incrementando su velocidad de crecimiento para poder desarrollarse y llevar a cabo el proceso de nitrificación.

- ◇ Por otra parte además de un descenso en las poblaciones de las bacterias autótrofas nitrificantes se observó un cambio en la composición de las poblaciones, ya que hubo especies que desaparecieron de la planta cuando se eliminó el reactor BABE. En la Tabla 50 se puede ver que las bacterias amonioxidantes de las especies *Nitrosomonas europaea*, *eutropha*, *halophila* y *Nitrosospira* no se encontraban presentes en las muestras de fango de la segunda calibración, mientras que de las dos especies de nitritoxidantes detectadas en la primera calibración, *Nitrobacter* desapareció cuando se eliminó el reactor BABE. Al eliminar el reactor BABE de la planta se reduce el TRC y, con esto, aquellas especies con una menor tasa de crecimiento se ven más afectadas que aquellas que tienen un crecimiento más rápido. Por lo tanto, el cambio en las poblaciones puede provocar un cambio en la tasa de crecimiento global determinada.

	Planta piloto	
	Con BABE	Sin BABE
<b>% AOB</b>	8 ± 2 %	6 ± 1 %
<b>% <i>Nitrosomonas europaea, eutropha, halophila</i></b>	1 ± 1 %	0 %
<b>% <i>Nitrosomonas oligotropha</i></b>	6 ± 1 %	4 ± 1 %
<b>% <i>Nitrosococcus mobilis</i></b>	1 ± 1 %	1 ± 1 %
<b>% <i>Nitrosospira spp.</i></b>	1 ± 1 %	0 %
<b>% NOB</b>	8 ± 2 %	2 ± 1 %
<b>% <i>Nitrobacter</i></b>	2 ± 1 %	0 %
<b>% <i>Nitrospirae</i></b>	6 ± 1 %	2 ± 1 %

Tabla 50. Cambios en la población de bacterias AOB y NOB en la planta piloto.

### 6.2.3 Determinación de parámetros de las bacterias amonioxidantes.

#### 6.2.3.1 Constantes de semisaturación e inhibición del amoníaco ( $K_{NH_3}/K_{INH_3}$ ).

Con el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.2.1 (página 169) se ha realizado, para la determinación de las constantes  $K_{NH_3}$  y  $K_{INH_3}$  incluidas en el modelo desarrollado, un total de 9 experimentos obteniéndose en cada uno la evolución de la OUR a medida que se aumenta la concentración de sustrato. En estos ensayos se ha realizado un barrido de concentraciones de amonio desde 0.1 hasta 10 mg/l de TAN. Antes de la adición del amonio se añadieron 3 mg/l de nitrito, necesarios para que las bacterias nitritoxidantes alcancen su actividad máxima.

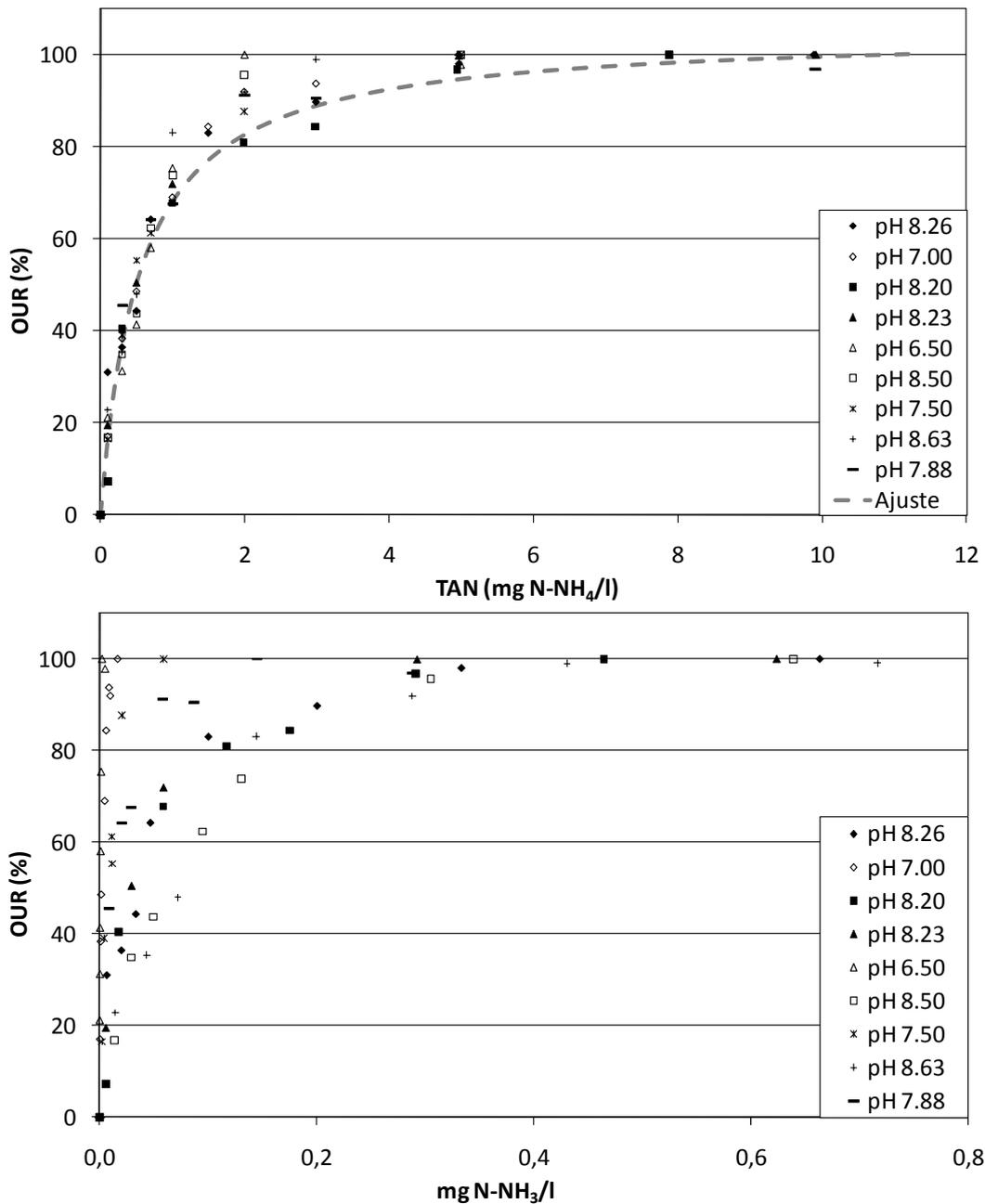
En la Tabla 51 se muestran las concentraciones de amonio empleadas y el pH en cada uno de los experimentos. Además, también se indica qué experimentos fueron realizados cuando el reactor BABE se encontraba en funcionamiento y cuáles cuando dicho reactor se eliminó del esquema de operación de la planta piloto. Se han realizado experimentos en un rango amplio de valores de pH para poder obtener un valor adecuado de las constantes y a la vez determinar si el modelo debe incluir el sustrato en forma de amonio o de amoníaco para reproducir mejor los resultados experimentales.

		Experimento								
		Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5	Nº 6	Nº 7	Nº 8	Nº 9
Etapa →		Con reactor BABE				Sin reactor BABE				
pH →		8.26	7.00	8.20	8.23	6.5	8.50	7.50	8.63	7.88
Concentración de TAN (mg/l N-NH <sub>4</sub> )	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.30
	0.30	0.30	0.30	0.50	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.70
	0.50	0.50	0.99	1.00	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	1.00
	0.70	1.00	1.98	4.97	0.70	0.70	0.70	1.00	1.00	2.00
	1.49	1.49	2.97	9.91	1.01	1.00	1.99	2.00	2.99	2.99
	2.99	1.99	4.94		2.02	1.99	4.99	2.99	4.98	4.98
	4.97	2.99	7.88		4.99	4.99		4.97	9.90	9.90
	9.88	4.97						9.90		

Tabla 51. Concentraciones de amonio evaluadas en cada una de los ensayos y pH al que fueron llevados a cabo los experimentos.

La Figura 81 muestra los resultados de estos experimentos. Se ha representado la velocidad de consumo de oxígeno normalizada respecto al valor máximo de cada uno de los experimentos frente a las concentraciones de TAN y de amoníaco. De estas dos gráficas se puede concluir que el modelo reproduce adecuadamente los resultados experimentales si se considera el TAN como sustrato en la ecuación del modelo, y no el NH<sub>3</sub> como se había supuesto inicialmente en el desarrollo del modelo. Como se observa en la Figura 81 inferior, para un mismo valor de concentración de NH<sub>3</sub> las bacterias presentan un amplio rango de actividad. Sin embargo, en la representación de OUR en función de TAN (Figura 81 superior) todas las gráficas, independientemente del pH, siguen una misma tendencia que ha sido ajustada con el modelo (Ec.- 110) obteniéndose una constante de semisaturación  $K_{NH4} = 0.54$  mg N-NH<sub>4</sub>/l. Este valor se encuentra dentro del rango de valores determinados por Kaelin *et al.*, 2009 ( $K_{NH4} = 0.14$  mg N-NH<sub>4</sub>/l) y Jones *et al.*, 2007 (0.7 mg N-NH<sub>4</sub>/l) en plantas piloto.

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{S_{NH4}}{S_{NH4} + K_{NH4}} \quad \text{Ec.- 110}$$



**Figura 81. Actividad de las bacterias amonioxidantes expresada en porcentaje de OUR máxima frente a la concentración de TAN (superior) y la concentración de NH<sub>3</sub> (inferior).**

Las concentraciones de amonio a las que se ha trabajado en estos experimentos no fueron muy altas porque se supuso que la inhibición por salinidad provocaría un efecto inhibitorio antes de que se pudiese observar una inhibición de las bacterias por el NH<sub>3</sub>. Como se determinó en el apartado 6.2.2.2 (página 230), para la determinación de la  $K_{INH_3}$  de las bacterias nitrificantes, se necesitan concentraciones de TAN por encima de 400 mg/l para detectar una inhibición de la actividad de las bacterias autótrofas nitrificantes presentes en la planta piloto. Estas concentraciones tan elevadas no son normales en una planta de tratamiento de aguas residuales, por lo tanto, este término de inhibición por amoníaco o por salinidad se puede despreciar del modelo en este caso.

### 6.2.3.2 Constante de inhibición del ácido nitroso ( $K_{IHNO_2}$ ).

Para determinar si existe inhibición de las bacterias amonioxidantes por ácido nitroso se realizaron una serie de experimentos siguiendo los pasos enumerados en el apartado 5.2.2.2.2 (página 170). En la primera adición se añadieron los 3 mg/l de nitrito establecidos para alcanzar la máxima velocidad de las bacterias nitritoxidantes y posteriormente se añadieron 2 mg/l de amonio como sustrato de las bacterias amonioxidantes junto con una concentración de nitrito variable en cada ensayo (barrido de 0 a 40 mg/l de TNO<sub>2</sub>). La Tabla 52 muestra las concentraciones de nitrito a las que se expuso a la biomasa en cada uno de los ensayos. Las concentraciones que aparecen en la tabla son el resultado de sumar el nitrito de ambas adiciones. Como se puede ver en dicha tabla se llevaron a cabo experimentos a pH muy diferente (pH 7 y 8) para, en caso de que se observe inhibición, poder determinar el compuesto que está realmente inhibiendo a las bacterias.

		Experimento	
		Nº 1	Nº 2
pH →		7.00	8.00
Concentración de TNO <sub>2</sub> (mg/l N-NO <sub>2</sub> )		3.00	3.00
		5.05	3.51
		8.12	5.05
		13.19	8.12
		23.19	13.19
		42.60	23.19
			42.60

**Tabla 52. Concentraciones de nitrito evaluadas en cada una de los ensayos y pH al que fueron llevados a cabo los experimentos.**

Los resultados de ambas curvas de inhibición por nitrito a los dos valores de pH evaluados se pueden ver en la Figura 82. La OUR, normalizada respecto a la OUR máxima medida, se ha representado frente a la concentración de ácido nitroso y la concentración de nitrito total. Comparando ambas representaciones se puede concluir que el ácido nitroso es el inhibidor real del proceso de oxidación de amonio, ya que las dos gráficas mostradas en la Figura 82 superior son prácticamente coincidentes. Sin embargo, en la gráfica de OUR frente a TNO<sub>2</sub> cada uno de los experimentos sigue una tendencia diferente. Apuntar que en los ensayos se alcanzó solo hasta una concentración máxima de 43 mg/l de TNO<sub>2</sub>, ya que en la práctica es una concentración considerablemente alta para un sistema de fangos activados.

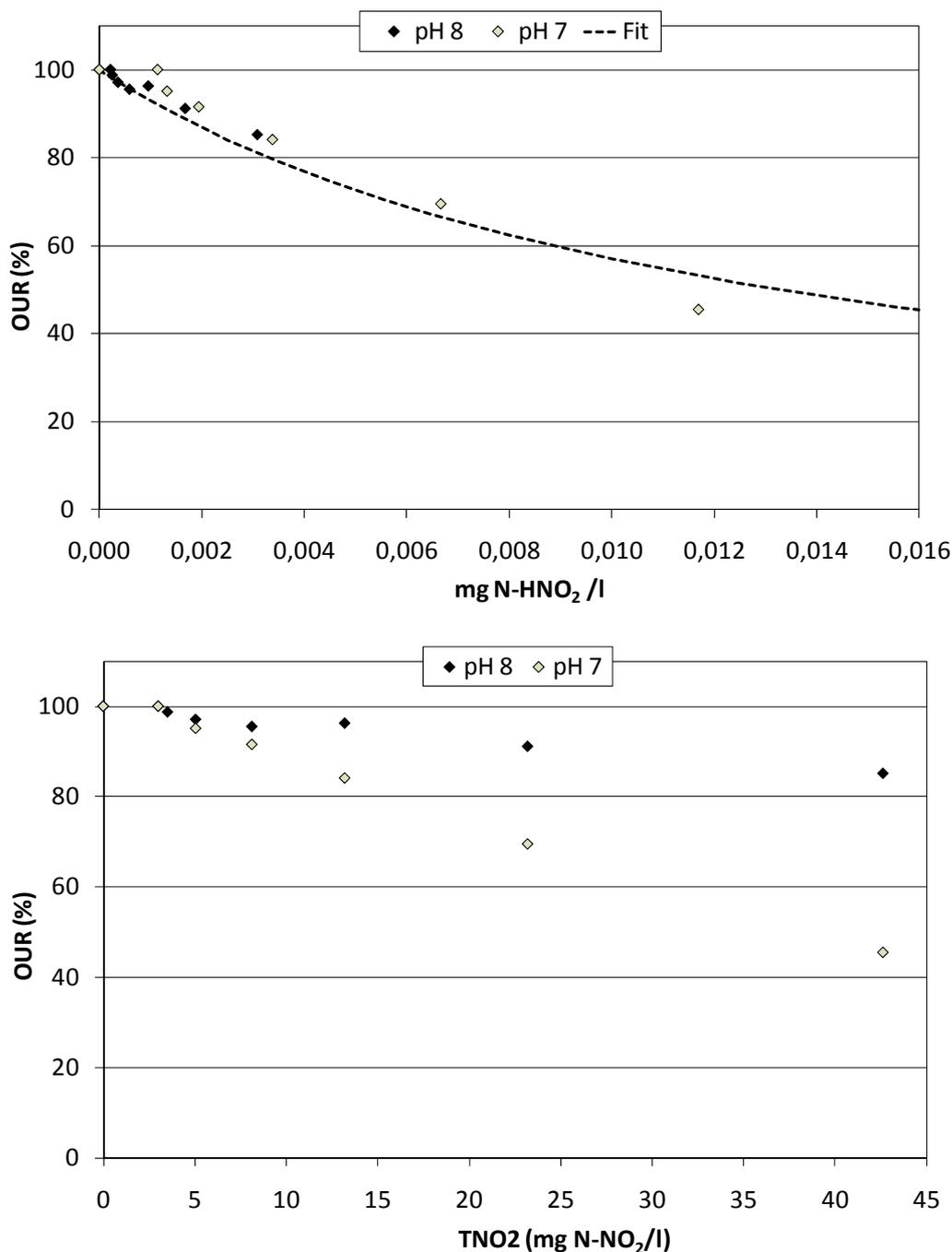


Figura 82. Actividad de las bacterias amonioxidantes expresada como OUR (%) frente a la concentración de HNO<sub>2</sub> (superior) y de TNO<sub>2</sub> (inferior).

Se ha ajustado la función de inhibición por ácido nitroso del modelo desarrollado (Ec.- 111) a los datos experimentales para determinar la constante de inhibición  $K_{I,HNO_2}$  (Figura 82, superior), obteniéndose un valor de 0.013 mg N-HNO<sub>2</sub>/l.

$$OUR_{cal} = K \cdot \frac{K_{I,HNO_2}}{S_{HNO_2} + K_{I,HNO_2}} \quad \text{Ec.- 111}$$

Este valor, aunque es menor que los recopilados en la bibliografía, indica que se necesitan concentraciones considerables de nitrito (o pH lo suficientemente bajo) para que las concentraciones de ácido nitroso en el medio lleguen a inhibir a las bacterias amonioxidantes.

La inhibición de la nitrificación por ácido nitroso está mucho menos estudiada que la inhibición por amoníaco, seguramente porque es difícil alcanzar concentraciones de nitrito que provoquen inhibición. Los sistemas de depuración biológica trabajan habitualmente a pH superior a 7.0, lo que supone que se tengan que alcanzar elevadas concentraciones de nitrito para que el equilibrio se desplace hacia la formación de ácido nitroso. La inhibición por ácido nitroso de las bacterias es un proceso que numerosos autores no contemplan, aunque no se puede descartar cuando se alcanzan elevadas concentraciones de nitrito en el sistema. Por lo tanto, en sistemas donde no existe acumulación de nitrito no existirá inhibición por ácido nitroso y este término de inhibición puede ser despreciado en el modelo de oxidación del amonio (Moussa *et al.*, 2005, Kaelin *et al.*, 2009; Sin y Vanrolleghem, 2006, entre otros, no consideran la inhibición de las bacterias por el ácido nitroso en sus modelos ya que asumen que no se alcanzan concentraciones capaces de inhibir a las bacterias).

### **6.2.3.3 Constante de semisaturación del oxígeno ( $K_{O_2}$ ).**

Para la calibración de la constante  $K_{O_2}$  se llevaron a cabo, al igual que para las bacterias nitritoxidantes, dos determinaciones siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.2.3 (página 171), una durante la fase en que el reactor BABE se encontraba operativo y otra cuando se eliminó este reactor del esquema de la planta piloto. De hecho, los ensayos para determinar esta constante de bacterias amonioxidantes se realizaron al mismo tiempo que los ensayos para determinar la constante  $K_{O_2}$  de las bacterias nitritoxidantes (apartado 6.2.2.3, página 232) y así poder utilizar en el cálculo de ambas constantes los resultados del experimento en el que se añade solamente nitrito (este experimento se debe realizar tanto en la determinación de la  $K_{O_2}$  de nitritoxidantes como de amonioxidantes). En el experimento para medir el consumo de oxígeno por nitritoxidantes y amonioxidantes, descrito en la metodología de calibración, se añadieron al mismo tiempo 5 mg/l de  $NO_2$  y 15 mg/l de  $NH_4$  para proporcionar sustrato suficiente a ambos grupos de bacterias.

La Figura 83 muestra la evolución de la concentración de OD con el tiempo obtenida en los ensayos. En el primer ensayo con adición de nitrito se observa el consumo de oxígeno debido a la actividad endógena y al crecimiento de las bacterias nitritoxidantes. En el ensayo

con adición de amonio y nitrito se mide conjuntamente la actividad endógena y el consumo debido al desarrollo de las bacterias nitrificantes y amonioxidantes.

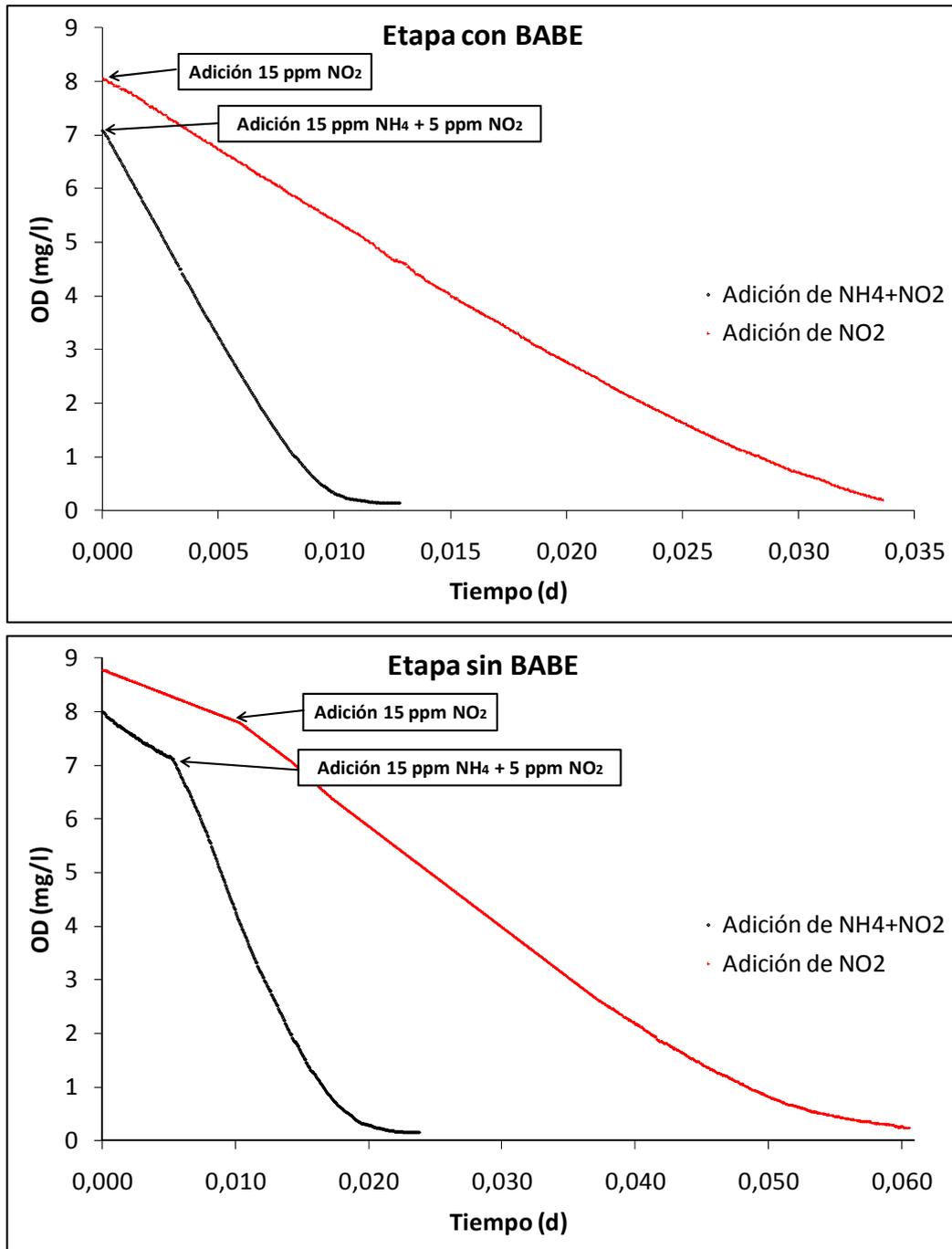


Figura 83. Resultados experimentales de los ensayos para la determinación de la  $K_{O_2}$  de las bacterias amonioxidantes de la planta piloto.

Como se ha descrito en el apartado 6.2.2.3 (página 232), a partir de estos datos se lleva a cabo el ajuste al OD experimental del ensayo con adición de amonio y nitrito empleando la Ec.- 112. En esta función de ajuste hay un término que corresponde al consumo de oxígeno por parte de las bacterias amonioxidantes (del que se obtiene la  $K_{O_2}$ ) y otro término que

representa la actividad endógena junto con el consumo de oxígeno de las bacterias nitrificantes. En la Figura 84 se puede ver los ajustes obtenidos en los dos ensayos realizados.

$$S_{O_2}^{t+\Delta t} = S_{O_2}^t - K \cdot \frac{S_{O_2}^t}{K_{O_2} + S_{O_2}^t} \cdot \Delta t - f^{end+nit}(O_2) \cdot \Delta t \quad \text{Ec.- 112}$$

En este ajuste la  $f^{end+nit}(O_2)$  se corresponde con la pendiente en cada intervalo de tiempo calculada a partir de la gráfica del experimento con adición únicamente de nitrato.

Los datos experimentales han sido ajustados adecuadamente por la función descrita obteniéndose un valor medio de las dos determinaciones de  $K_{O_2} = 0.52 \pm 0.04$  mg O<sub>2</sub>/l. Esta constante de semisaturación es menor que el valor determinado para las bacterias nitrificantes, lo que indica que las bacterias nitrificantes son más sensibles a las bajas concentraciones de oxígeno que las amonificantes, conclusión obtenida en la mayoría de los estudios revisados (Okabe *et al.*, 1999; Schramm *et al.*, 2000; Guisasola *et al.*, 2005; Ciudad *et al.*, 2006; Mertoglu *et al.*, 2006). Sin embargo, en la bibliografía consultada, también se han encontrado estudios en los que se determinó una constante de afinidad menor para las bacterias nitrificantes que para las amonificantes (Hellinga *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2004). El valor de  $K_{O_2}$  obtenido en esta calibración para las bacterias amonificantes es similar al valor propuesto en los modelos ASM ( $K_{O_2} = 0.4$  mg/l, Henze *et al.*, 2000).

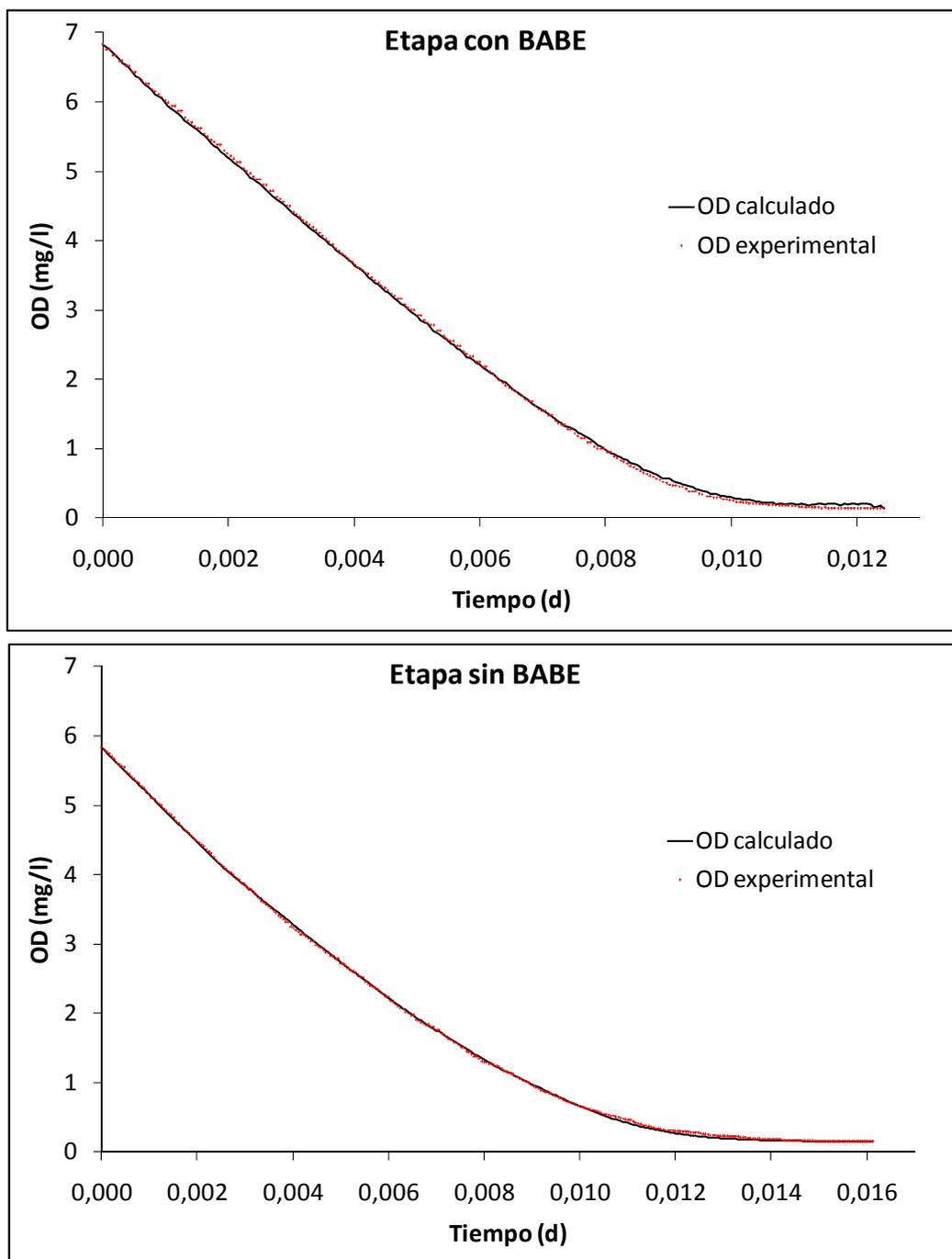


Figura 84. Resultados del ajuste para la determinación de la constante  $K_{O_2}$  de bacterias amonioxidantes en planta piloto.

#### 6.2.3.4 Constantes de inhibición del pH ( $K_H/K_{IH}$ ).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.2.4 (página 172) se ha obtenido la variación de OUR con el pH para las bacterias amonioxidantes realizando un total de 10 experimentos a diferentes valores de pH. En estos experimentos se han añadido 3 mg/l de nitrito como sustrato de las bacterias nitritoxidantes en la primera adición y 6 mg/l de

amonio en la segunda adición para el crecimiento de las bacterias amonioxidantes. Antes de empezar cada ensayo se ajustó el pH del fango a los valores que se muestran en la Tabla 53.

La Figura 85 muestra los resultados obtenidos en los ensayos realizados (ver resultados de cada ensayo en la Figura 86), que en conjunto permiten ver el efecto del pH en la actividad de las bacterias amonioxidantes. También se puede ver en la Figura 85 el resultado del ajuste de la función de inhibición por pH propuesta en el modelo (Ec.- 113). El modelo reproduce correctamente los resultados experimentales y con dicho ajuste se han obtenido las siguientes constantes de inhibición por pH:  $K_H = 6.05$ ,  $A_H = 2.64$ ,  $K_{IH} = 9.98$  y  $A_{IH} = 2.74$ .

$$I_{pH} = \frac{1}{1 + \exp(A_H(K_H - S_H))} \cdot \frac{1}{1 + \exp(A_{IH}(S_H - K_{IH}))} \cdot \frac{1}{f(pH_{opt})} \quad \text{Ec.- 113}$$

Ensayo	pH
1	6,21
2	6,52
3	6,82
4	7,23
5	7,53
6	7,81
7	8,19
8	8,53
9	8,82
10	9,69

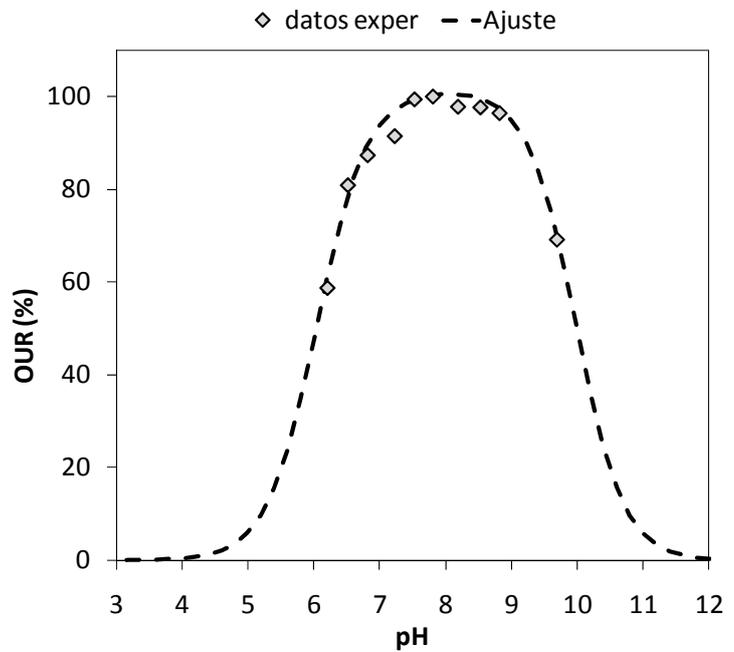


Tabla 53. Valores de pH a los que se llevaron a cabo los experimentos.

Figura 85. Efecto del pH en la actividad de las bacterias amonioxidantes presentes en la planta piloto.

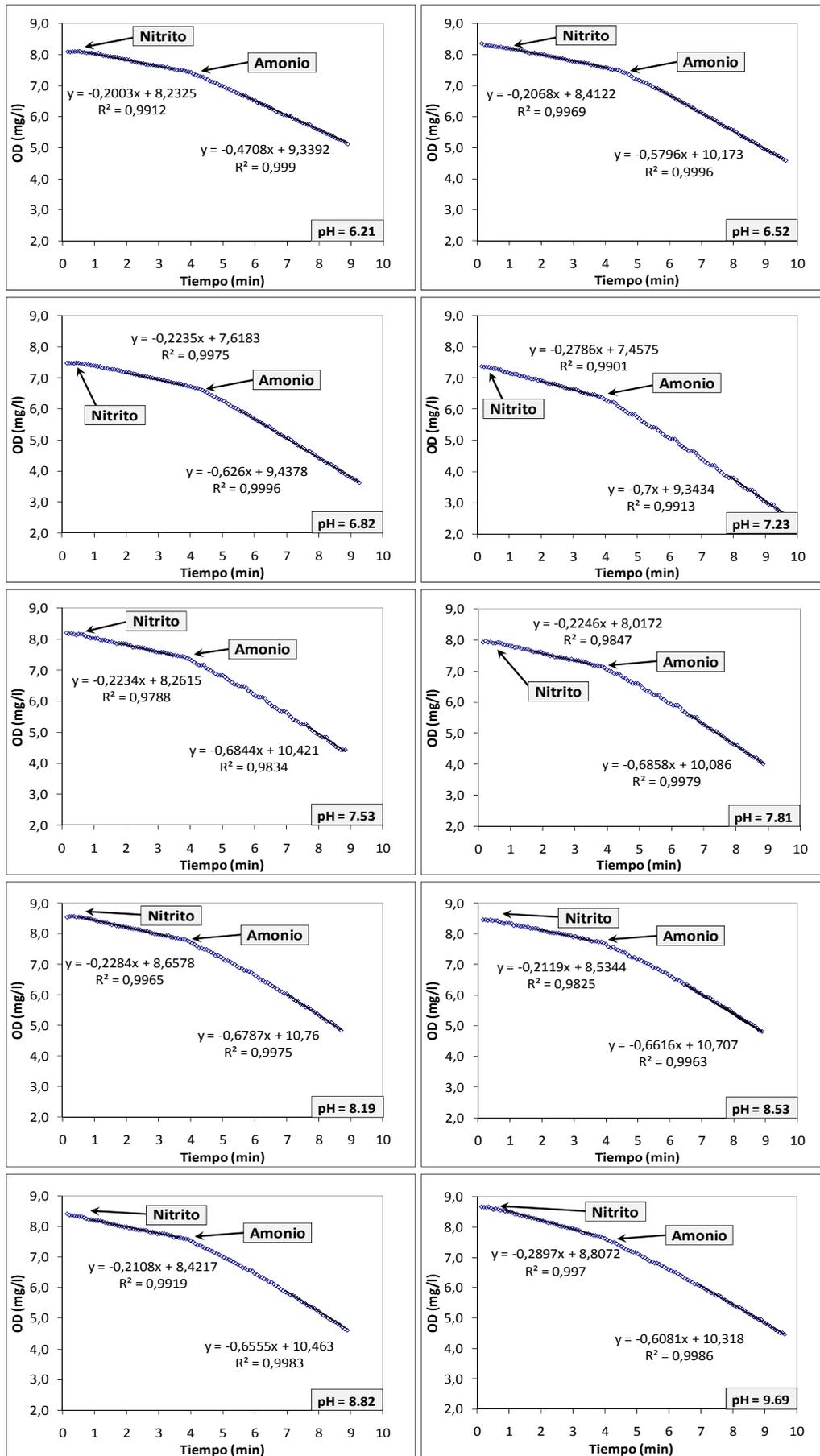


Figura 86. Ensayos para la determinación de las constantes de inhibición del pH para las AOB.

De los resultados obtenidos conviene destacar los siguientes aspectos:

- ✓ Las bacterias amonioxidantes tienen un amplio rango de pH en el que mantienen su actividad por encima del 50 % (desde 6.05 hasta 9.98). Para obtener una actividad por encima del 80 % el rango de valores sigue siendo muy amplio (6.5-9.5). La mayoría de los datos de bibliografía proponen rangos de pH óptimos algo menores, pero existen autores que determinan valores similares de constantes de pH a los obtenidos en este estudio (Jones *et al.*, 2007 determinaron un rango de pH óptimo entre 5.5 y 9.5).
- ✓ Al comparar los resultados obtenidos para las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes se puede ver que las bacterias nitritoxidantes mantenían su actividad máxima a un pH más alto que las bacterias amonioxidantes, pero sin embargo, a valores bajos de pH la tolerancia es mucho menor en las bacterias nitritoxidantes y el descenso de actividad es mucho más acusado con la bajada del pH.

#### **6.2.3.5 Rendimiento celular de las bacterias amonioxidantes ( $Y_{NH}$ ).**

Para la determinación del rendimiento celular de las bacterias amonioxidantes se realizaron dos experimentos siguiendo la metodología del apartado 5.2.2.2.5 (página 172), cada uno de ellos en una fase diferente de operación de la planta piloto (con reactor BABE y sin éste). En la primera de las determinaciones de la constante estequiométrica se añadieron al fango en condiciones endógenas 30 mg/l de amonio y se registró la velocidad de consumo de oxígeno hasta que el sustrato fue consumido. En el segundo experimento el procedimiento fue el mismo, pero se añadió la mitad de sustrato para examinar el valor del rendimiento celular en condiciones diferentes.

Con los ensayos descritos se determinó el rendimiento celular global de las bacterias autótrofas en el proceso de oxidación del amonio. Restando a este dato el rendimiento de las bacterias nitritoxidantes obtenido en el apartado 6.2.2.5 (página 238) se obtuvo el rendimiento celular de las bacterias amonioxidantes ( $Y_{NH}$ ) (ver ecuación Ec.- 114). La Figura 87 muestra los registros de cada uno de los ensayos realizados. En las gráficas se puede ver que la duración del primero de los experimentos fue mayor que la del segundo ensayo debido a que se empleó el doble de amonio en la adición. La OUR medida en los ensayos se corresponde con la suma de la OUR debida a la oxidación del amonio y la OUR asociada al consumo del nitrito por parte de las nitritoxidantes. Como se puede ver en la Figura 87 inferior, en el experimento en que se adicionó 15 mg/l de amonio se puede observar dos etapas diferentes que se corresponde con las dos etapas del proceso de nitrificación

(Guisasola *et al.*, 2005). Esto se debe a que llega un punto en que se ha agotado el amonio y las bacterias amonioxidantes dejan de consumir oxígeno. Sin embargo, las bacterias nitritoxidantes siguen disponiendo de nitrito y, por tanto, continua el consumo de oxígeno por parte de estas. Esto se puede atribuir a que las bacterias nitritoxidantes tienen una menor constante de afinidad por su sustrato y/o una menor tasa de crecimiento. En el experimento realizado cuando se operaba la planta con reactor BABE no se observa este segundo “escalón” probablemente porque la diferencia entre tasas de crecimiento de las bacterias era menor en esta calibración (la diferencia entre  $\mu_{NO}$  y  $\mu_{NH}$  era de  $0.35 \text{ d}^{-1}$ , mientras que en la segunda calibración, sin reactor BABE, era de  $0.46 \text{ d}^{-1}$ ).

$$Y_{NH} = \frac{4.57 \cdot NH_4^+ \text{ cons} - O_2 \text{ cons}}{NH_4^+ \text{ cons} + i_{NBM} \cdot O_2 \text{ cons}} - Y_{NO} \quad \text{Ec.- 114}$$

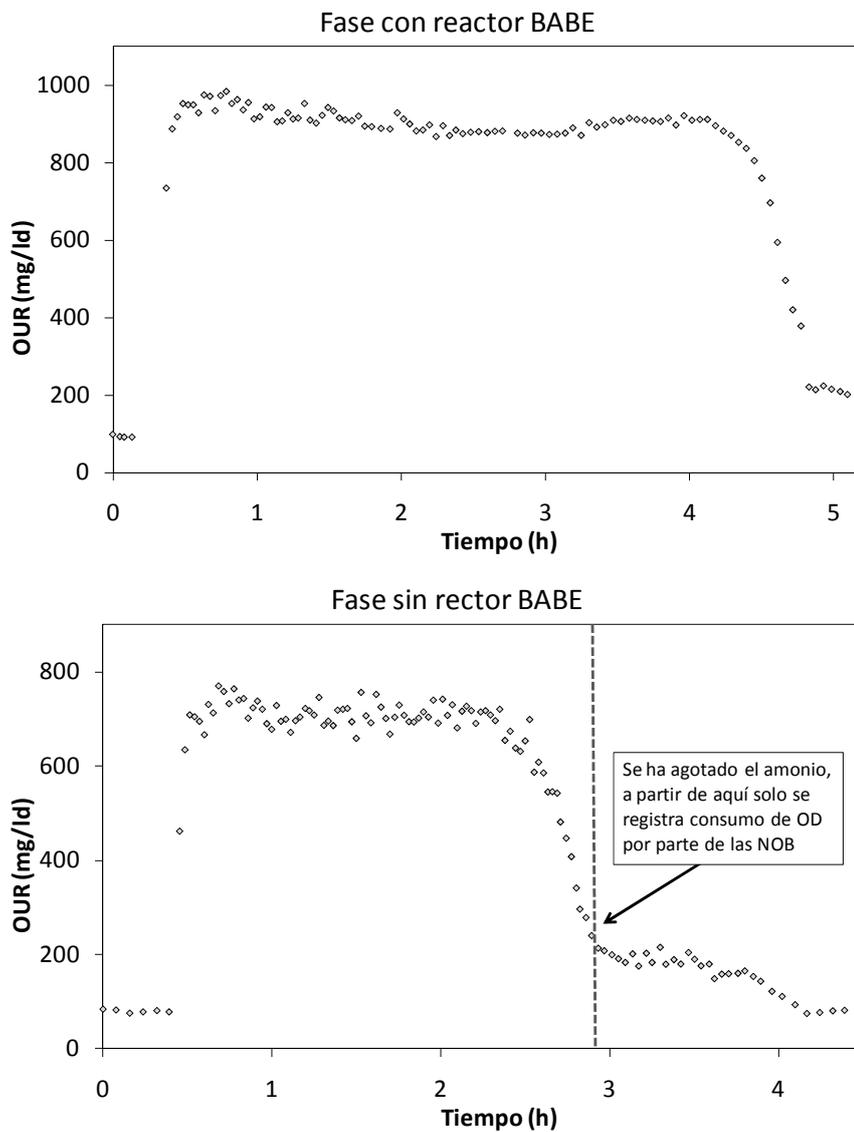


Figura 87. Evolución de la OUR en ensayos para la determinación de la  $Y_{AUT}$  de la planta piloto.

En la Tabla 54 se pueden ver los valores del rendimiento obtenidos en cada uno de los experimentos realizados. La constante  $Y_{AUT}$  determinada con estos experimentos es similar al valor del rendimiento definido normalmente para las bacterias autótrofas (Wiesmann, 1994; EPA, 1993; Henze *et al.*, 2000), y a partir de esta se ha obtenido un valor medio de  $Y_{NH} = 0.167$  g DQO/g  $NH_4$ . Este valor se encuentra dentro del rango de valores establecido a partir de la bibliografía (0.11-0.27 g DQO/g  $NH_4$ ).

Fase	Amonio añadido (mg N-NH <sub>4</sub> /l)	Oxígeno consumido (mg O <sub>2</sub> /l)	$Y_{AUT}$ (g DQO/g N-NH <sub>4</sub> )	$Y_{NH}$ (g DQO/g N-NH <sub>4</sub> )
Con BABE	31.39	128.60	0.226	0.157
Sin BABE	15.47	64.78	0.256	0.188

Tabla 54. Concentración de amonio añadido en cada ensayo y valor de  $Y_{NH}$  determinado.

### 6.2.3.6 Tasa máxima de crecimiento de las bacterias amonioxidantes ( $\mu_{NH}$ ).

Para la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias amonioxidantes de la planta piloto se usaron los resultados de los ajustes obtenidos en el apartado 6.2.3.1 (página 242) para la determinación de las constantes  $K_{NH_3}$  y  $K_{INH_3}$  del modelo. La forma de determinar este parámetro fue la misma que la descrita para las bacterias nitritoxidantes y los resultados se muestran en la Tabla 55. Como se puede ver en dicha tabla la velocidad de crecimiento de las bacterias amonioxidantes aumentó de forma análoga a las bacterias nitritoxidantes cuando se eliminó el reactor BABE del esquema. Las causas de este incremento pueden ser las que se comentaron en el caso de las bacterias nitritoxidantes: un cambio en la población bacteriana (ver en la Tabla 50 como cambia la población de AOB al eliminar el reactor BABE) y una adaptación de las bacterias ante condiciones una reducción del TRC (de 7 a 6.2 d). En la bibliografía consultada se ha observado una gran variabilidad en los valores de este parámetro, probablemente debida a las características de operación en cada uno de los sistemas examinados, y con ello, al desarrollo de especies diferentes y aclimatadas a condiciones diferentes.

Calibración	DQO <sub>SUS</sub> mg DQO/l	% $X_{NH}$	$X_{NH}$ mg DQO/l	$\mu_{NH}^{max}$ $d^{-1}$
Etapa con BABE	1586.0	8 ± 2 %	62.03	<b>0.59</b>
Etapa sin BABE	1455.0	6 ± 1 %	44.51	<b>0.88</b>

Tabla 55. Parámetros obtenidos en la determinación de la tasa máxima de crecimiento de las bacterias AOB presentes en la planta piloto.

### 6.3 Análisis comparativo de los parámetros calibrados en los sistemas estudiados.

Para acabar con la discusión de resultados de las calibraciones, en este apartado, se van a comparar los parámetros de las bacterias amonioxidantes presentes en los sistemas de operación estudiados. Solo se comparan los resultados obtenidos para las bacterias amonioxidantes porque, como se ha comentado ya en varias ocasiones, son estas las que se desarrollan tanto en el reactor SHARON como en la planta piloto. En Tabla 56 se resumen todos los valores de los parámetros determinados para las bacterias amonioxidantes presentes en el reactor SHARON y en la planta piloto.

Función	Reactor SHARON	Planta piloto	
		Con BABE	Sin BABE
a. Afinidad e inhibición por sustrato	$K_{NH_3} = 0.32 \text{ mg N-NH}_3/\text{l}$	$K_{NH_4} = 0.54 \text{ mg N-NH}_4/\text{l}$	
b. Inhibición por salinidad	$K_M = 0.3 \text{ mol/l}$ y $n = 3$	No determinada	
c. Inhibición por ácido nitroso	$K_{I,HNO_2} = 1.32 \text{ mg N-HNO}_2/\text{l}$	$K_{I,HNO_2} = 0.013 \text{ mg N-HNO}_2/\text{l}$	
d. Afinidad por el oxígeno disuelto	$K_{O_2} = 1.45 \text{ mg OD/l}$	$K_{O_2} = 0.52 \text{ mg OD/l}$	
e. Inhibición por el pH del medio	$K_H = 5.70\text{-}6.40$ $A_H = 1$ $K_{IH} = 8.20\text{-}8.55$ $A_{IH} = 3$	$K_H = 6.05$ $A_H = 2.64$ $K_{IH} = 9.98$ $A_{IH} = 2.74$	
f. Rendimiento celular	$Y_{NH} = 0.37\text{-}0.53 \text{ g DQO/g N-NH}_4$	$Y_{NH} = 0.17 \text{ g DQO/g N-NH}_4$	
g. Velocidad máxima de crecimiento	$\mu_{NH} = 2.87 \pm 0.08 \text{ d}^{-1} (30 \text{ }^\circ\text{C})$	$\mu_{NH} = 0.59 \text{ d}^{-1} (20 \text{ }^\circ\text{C})$	$\mu_{NH} = 0.88 \text{ d}^{-1} (20 \text{ }^\circ\text{C})$

Tabla 56. Parámetros de las bacterias amonioxidantes presentes en los sistemas de operación estudiados.

#### Afinidad e inhibición por el sustrato.

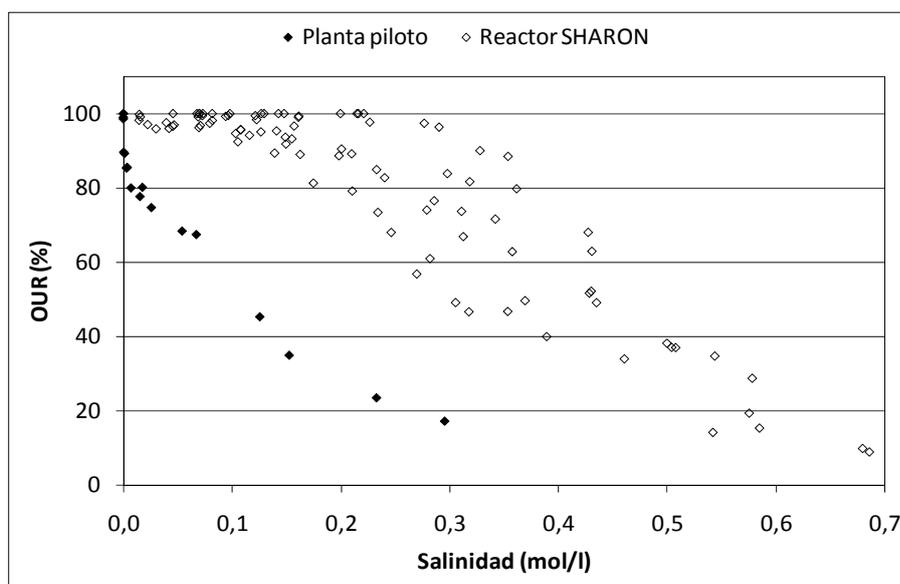
Los aspectos a destacar en cuanto a la afinidad e inhibición por el sustrato de las bacterias amonioxidantes son:

- ✓ El modelo debe incluir el sustrato en forma de TAN o de amoníaco para reproducir mejor los resultados experimentales que se obtienen según el medio en el que se desarrollan las bacterias. En el caso de la calibración del reactor SHARON a escala de laboratorio, los resultados obtenidos se ajustaron con una función de Monod en la que se incluyó el sustrato de las bacterias como amoníaco y con una constante de  $0.32 \text{ mg N-NH}_3/\text{l}$ . En cambio, los resultados de la calibración con el fango de la planta piloto se reproducían mejor si la función del sustrato consideraba éste como la concentración de TAN, obteniéndose en el ajuste una constante de  $0.54 \text{ mg N-NH}_4/\text{l}$ .
- ✓ No se observó inhibición por el amoníaco porque a altas concentraciones se determinó que tenía lugar una inhibición por la salinidad del medio antes de poder detectar una inhibición por sustrato. Por lo tanto el término de inhibición por  $\text{NH}_3$  se puede despreciar del proceso de crecimiento de las bacterias amonioxidantes.

**Inhibición por la salinidad.**

En los experimentos realizados se observó que en ambos sistemas la inhibición por salinidad tiene lugar antes que el sustrato pueda llegar a inhibir a las bacterias amonioxidantes y por ello se modificó el modelo incluyendo una función de inhibición por salinidad en los sistemas donde ésta pueda llegar a ser importante. Sólo se ha determinado la constante de esta nueva función de inhibición para el caso del fango procedente del reactor SHARON, ya que en este tipo de sistemas se alcanzan concentraciones tan altas como para poder inhibir la actividad bacteriana. Según esta constante se necesita una salinidad de 0.3 mol/l para inhibir la actividad en un 50 %.

Aunque no se determinó la constante de inhibición por salinidad en la planta piloto sí que se realizaron experimentos para confirmar la inhibición de las bacterias al incrementar la concentración de  $\text{NH}_4$ . Con estos ensayos se observó un fuerte efecto de inhibición a concentraciones a las cuales las bacterias amonioxidantes en el SHARON están a su máxima actividad. La Figura 88 muestra los resultados obtenidos en los experimentos realizados para determinar el efecto de la salinidad tanto en el reactor SHARON como en la planta piloto. Esta gran diferencia en la inhibición por salinidad, aunque puede ser debida en parte a una aclimatación de las bacterias, los resultados de FISH permiten concluir que es más probable que tal diferencia sea debida a un cambio de la población bacteriana en el reactor SHARON. Las bacterias presentes en un reactor SHARON están sometidas a altas concentraciones de amonio y nitrito, por ello, soportan mayores rangos de salinidad que las bacterias de un sistema de fangos activados donde la concentración de sales no llega a ser tan alta.



**Figura 88. OUR frente a salinidad en los experimentos realizados con fango procedente del reactor SHARON y de la planta piloto.**

### **Inhibición por el ácido nitroso.**

Tanto en el reactor SHARON como en la planta piloto se observó que la inhibición es debida a la forma no ionizada de este compuesto. Sin embargo las bacterias presentes en el reactor SHARON soportan mayores concentraciones de ácido nitroso que las que se han desarrollado en la planta piloto. Este resultado es probablemente debido a diferentes poblaciones de bacterias en cada uno de los sistemas. Las bacterias presentes en el reactor SHARON toleran las altas concentraciones de nitrito características de este reactor, mientras que en la planta piloto, la concentración de nitrito es nula. En la Figura 89 se puede ver claramente la diferencia entre la inhibición de las bacterias por ácido nitroso que tiene lugar en la planta piloto y en el reactor SHARON. Así por ejemplo, a una concentración de  $\text{HNO}_2$  de aproximadamente  $0.3 \text{ mg N-HNO}_2/\text{l}$  las bacterias amonioxidantes presentes en la planta piloto están ya casi inhibidas por completo mientras que las bacterias del SHARON se encuentran a un 80 % de su actividad máxima.

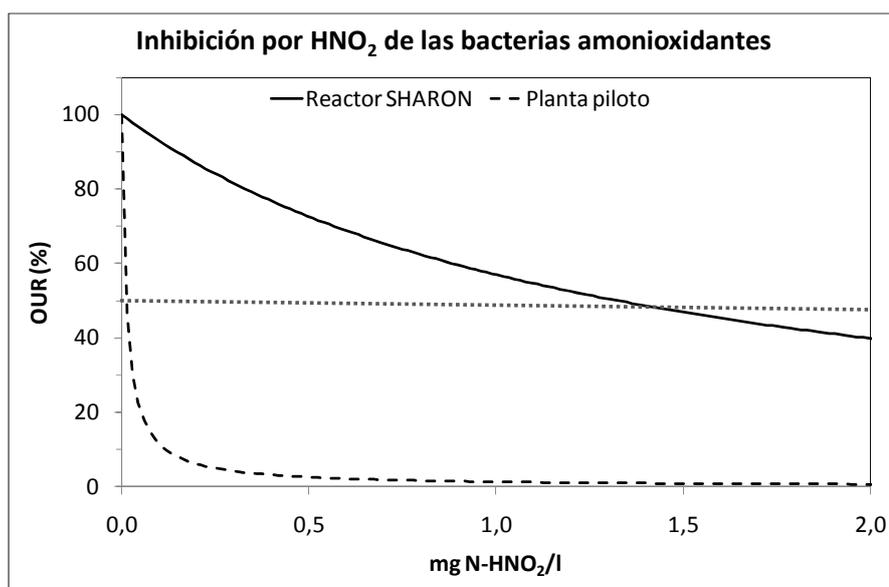


Figura 89. Comparación de funciones de inhibición de las b. amonioxidantes por  $\text{HNO}_2$  determinadas para el reactor SHARON y la planta piloto.

### **Afinidad por el oxígeno disuelto.**

En este estudio se ha evaluado la influencia de la concentración de oxígeno disuelto en el medio en el crecimiento de las bacterias amonioxidantes. A la vista de los valores de las constantes de semisaturación del oxígeno se puede decir que las bacterias presentes en la planta piloto no necesitan una concentración de OD tan alta para su desarrollo como la de las bacterias del reactor SHARON (ver en Figura 90 comparación de curvas Monod obtenidas para cada uno de los sistemas).

Los experimentos realizados en el reactor SHARON confirman la importancia de un buen sistema de aireación en este tipo de reactores para evitar una inhibición del proceso de nitrificación parcial por falta de oxígeno disuelto. El valor de la constante de semisaturación indica que la concentración de oxígeno disuelto debe ser bastante alta para el correcto desarrollo del proceso de nitrificación parcial. Como se ha comentado en el caso de la salinidad, esta diferencia en la afinidad por el oxígeno disuelto puede ser atribuida a que en los sistemas estudiados se desarrollan poblaciones de amonioxidantes diferentes y además las propias bacterias sufren un proceso de aclimatación a las diferentes condiciones en las que se encontraba en el reactor SHARON y en la planta piloto.

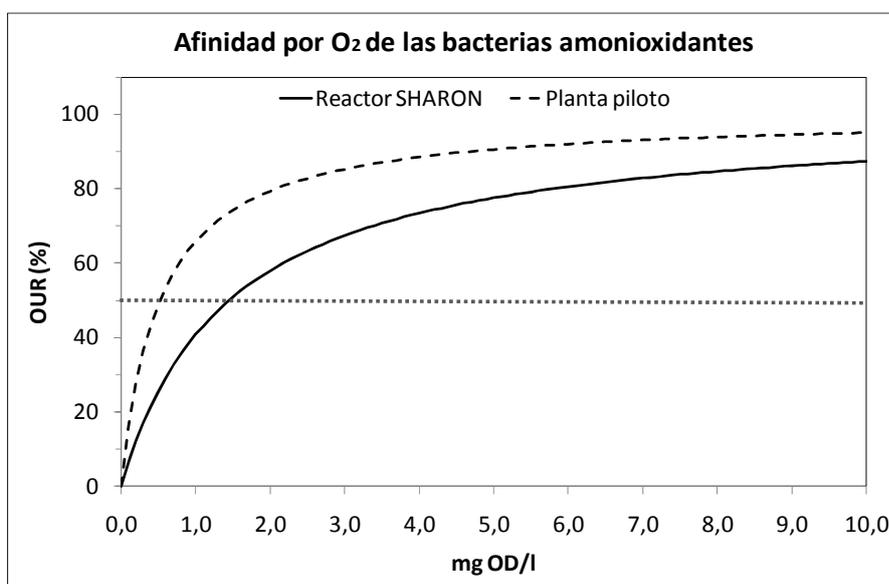


Figura 90. Comparación de funciones de Monod del OD de las b. amonioxidantes determinadas para el reactor SHARON y la planta piloto.

### ***Inhibición por el pH del medio.***

La Figura 91 muestra las funciones de inhibición determinadas en la calibración de la planta piloto y del reactor SHARON (en este caso se ha representado las dos funciones obtenidas agrupando los experimentos en dos diferentes grupos, realizados en distintas etapas de la operación del reactor). Como ya se comentó en el apartado 6.1.4 (página 194) las bacterias amonioxidantes presentes en el reactor SHARON tenían unas constantes de inhibición por pH diferentes según el momento en el que se realizó el ensayo de calibración, y más concretamente, según el pH del reactor SHARON en ese momento. Esto llevó a concluir que las bacterias se aclimataron a las condiciones en las que se encontraban y el rango de pH óptimo se modificó de acuerdo a esta aclimatación.

Si se comparan las funciones de pH del reactor SHARON y de la planta piloto, se puede observar que:

- ✓ El rango óptimo de pH de las bacterias es más amplio en la planta piloto. La actividad de las bacterias amonioxidantes se mantiene por encima del 80 % entre un pH aproximado de 6.5 y de 9.5, mientras que en el SHARON el intervalo de pH con esta misma actividad es menor en los dos casos.
- ✓ El pH óptimo es menor en el reactor SHARON que en la planta piloto.
- ✓ A valores de pH bajos la actividad de las bacterias amonioxidantes de la planta piloto se ve mucho más afectada que las bacterias presentes en el reactor SHARON. Así, a un pH de 6.0 (que es un valor típico del reactor SHARON), las bacterias presentes en la planta piloto ya se encuentran al 50 % de su actividad mientras que las del reactor SHARON mantienen su actividad a casi el 80 % de la máxima.
- ✓ En cambio a valores de pH altos las bacterias amonioxidantes del reactor SHARON presentan un descenso brusco de la actividad. Como se puede ver en la Figura 91 a un pH de 8.5 las bacterias de la planta piloto se encuentran a su máxima actividad, mientras que las bacterias del reactor SHARON han sufrido un descenso considerable de la actividad.

Estos resultados concuerdan con lo esperado ya que el pH medio en la planta es más alto (por encima de 7.0) que el que se medía en el reactor SHARON (6.0-6.5), y por ello, las bacterias amonioxidantes de la planta piloto tienen unas constantes de inhibición por pH mayores que las del reactor SHARON.

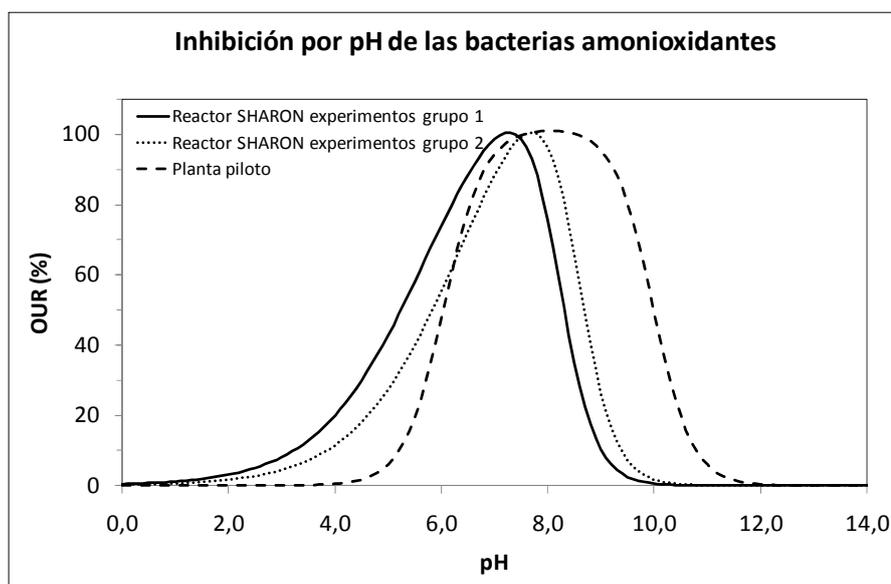


Figura 91. Comparación de funciones de inhibición de las b. amonioxidantes por pH determinadas para el reactor SHARON y la planta piloto.

**Rendimiento celular de las bacterias.**

Como se puede ver en la Tabla 56 los rendimientos en cada sistema son muy diferentes. En el apartado 6.1.6 (página 206) ya se comentó que la causa probable de la variación del rendimiento celular de las bacterias es una diferencia en la relación sustrato/organismos en el momento de realizar el ensayo de calibración. En la Figura 92 se muestran todos los valores de  $Y_{NH}$  obtenidos en la calibración de las bacterias amonioxidantes del reactor SHARON y de la planta piloto, y la relación  $S_0/X_0$  en cada una de las determinaciones. Se observa que existe una relación clara entre la  $Y_{NH}$  y  $S_0/X_0$ , ya que todos los puntos de la gráfica siguen una tendencia ascendente a medida que aumenta el valor de la relación  $S_0/X_0$ .

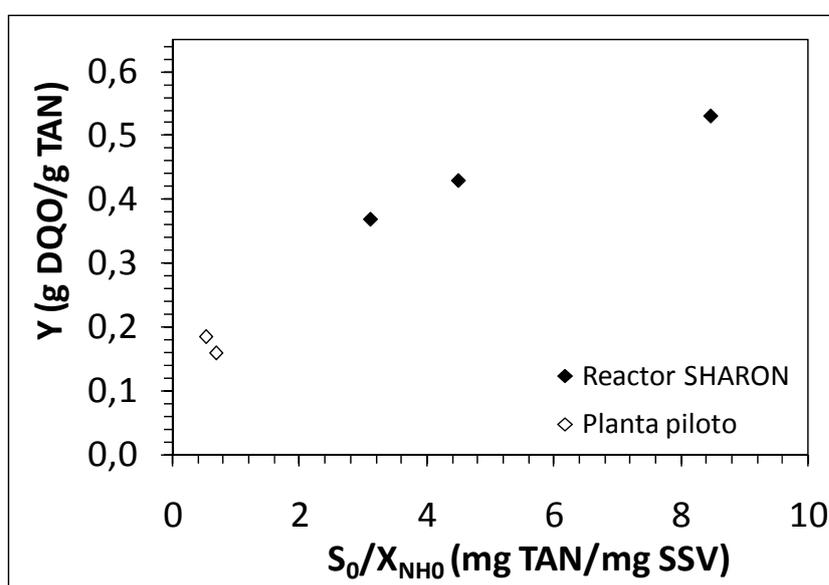


Figura 92. Variación del rendimiento celular en función de la relación  $S_0/X_0$  en los ensayos del reactor SHARON y de la planta piloto.

**Velocidad máxima de crecimiento.**

Por último, si se comparan las tasas de crecimiento de las bacterias presentes en cada uno de los sistemas se observa una diferencia importante. Sin embargo hay que tener en cuenta que las temperaturas de operación en cada caso son también muy diferentes, lo que influye en todos los procesos cinéticos. Si se calcula cual sería la tasa de crecimiento de las bacterias presentes en un reactor SHARON a 20 °C mediante la ecuación modificada de Ratkowsky se obtiene una  $\mu^{\max} = 0.95 \text{ d}^{-1}$ . Este valor es similar al determinado en una de las calibraciones de la planta piloto. Por otro lado se determinó que en la planta piloto se produjo un cambio significativo de esta constante cuando se eliminó el reactor BABE del esquema de operación. Por lo tanto se puede decir que las bacterias amonioxidantes presentan un amplio rango de velocidades adaptados a las condiciones del sistema en que se desarrollan.

### **Análisis de la población bacteriana.**

En cuanto al estudio de las bacterias presentes en cada uno de los sistemas hay que destacar que en la calibración del reactor SHARON se obtuvieron valores de los parámetros muy diferentes a los recopilados de la bibliografía para un proceso de fangos activados. Esto planteó no solo determinar la cantidad total de bacterias amonioxidantes o nitritoxidantes utilizando una sonda genérica, sino utilizar sondas específicas para observar si se desarrollaban especies diferentes.

El seguimiento de la población bacteriana a lo largo de toda la fase de operación del reactor SHARON y la planta piloto ha llevado a concluir que todas las diferencias de las constantes discutidas en los párrafos superiores son debidas a las diferentes especies de bacterias amonioxidantes presentes en cada sistema. En la Tabla 57 se puede ver los porcentajes de bacterias amonioxidantes obtenidos mediante análisis de FISH realizado en el fango del reactor SHARON y de la planta piloto.

	SHARON	Planta piloto	
		Con BABE	Sin BABE
<b>% AMONIOXIDANTES</b>	97 ± 1 %	8 ± 2 %	6 ± 1 %
<b>% <i>Nitrosomonas europaea, eutropha, halophila</i></b>	97 ± 1 %	1 ± 1 %	0 %
<b>% <i>Nitrosomonas oligotropha</i></b>	0 %	6 ± 1 %	4 ± 1 %
<b>% <i>Nitrosococcus mobilis</i></b>	0 %	1 ± 1 %	1 ± 1 %
<b>% <i>Nitrospira spp.</i></b>	0 %	1 ± 1 %	0 %

**Tabla 57. Resultados de análisis de FISH llevado a cabo en los dos sistemas estudiados.**

De acuerdo con los análisis de FISH, las *Nitrosomonas europaea* y *Nitrosomonas eutropha* (sonda Nse 1472) son las únicas especies presentes en el reactor SHARON (97 ± 1 % del total de bacterias). Estas bacterias raramente fueron detectadas en las muestras del fango de la planta piloto, en el que *Nitrosomonas oligotropha* (sonda Nmo 218) fue la especie de amonioxidantes predominante (6 ± 1 % del total de bacterias). Otras especies de amonioxidantes como *Nitrospira spp.* (sonda Nsv 443) y *Nitrosococcus mobilis* (sonda Nmv) también se detectaron en el fango de la planta piloto, pero en concentraciones mínimas. Como el reactor SHARON fue inoculado con fango de la planta piloto, está claro que se produjo un cambio en la población microbiana durante la operación del reactor. Un cambio similar de población fue descrito por Fux (2003) durante la puesta en marcha de un reactor SHARON inoculado con fango activado.

Según Dytczak *et al.* (2008) la operación de un SBR en condiciones aerobias o con alternancia de etapas aeróbica/anóxica varía la tasa de nitrificación, afectando a las poblaciones microbianas. Las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes involucradas en el proceso de

nitrificación son autótrofas aerobias y por tanto se deberían desarrollar mejor en un reactor operado continuamente en condiciones aerobias. Sin embargo, en el sistema operado con alternancia de etapas se obtuvo una tasa de nitrificación mayor a la esperada. En este estudio se determinó que las diferencias en las tasas de nitrificación fueron causadas por el desarrollo de los distintos géneros de amonioxidantes y nitritoxidantes en los dos reactores, en lugar de un impacto directo de las diferentes condiciones ambientales sobre las bacterias. Existen varias publicaciones en las que se han estudiado las poblaciones desarrolladas en diferentes sistemas de operación y se ha obtenido resultados similares (Schramm *et al.*, 2000; Gieseke *et al.*, 2001; Okabe *et al.*, 1999; Okabe *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006).

Diferentes condiciones ambientales durante el funcionamiento a largo plazo del SBR dieron como resultado la selección de las diferentes poblaciones de bacterias, independientemente del inóculo inicial de biomasa empleado. El desarrollo de especies específicas afecta a las tasas de nitrificación a través de una combinación de la cinética enzimática, las tasas de crecimiento y muerte. Por ello las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes se pueden clasificar en especies *r-strategists* y *k-strategists* (Schramm *et al.*, 1999).

En base a las afinidades por el sustrato y la velocidad de crecimiento máxima determinadas, *Nitrosomonas europaea* y *Nitrosomonas eutropha* se han clasificado como especies *r-strategists*, mientras que *Nitrosomonas oligotropha* es considerada como *k-strategists* (Schramm *et al.*, 1999). Los *r-strategists* se caracterizan por tener una afinidad baja por el sustrato (constantes de semisaturación por el sustrato altas), pero una velocidad de crecimiento alta en medios con altas concentraciones de sustrato, mientras que las especies *k-strategists* tienen una alta afinidad por el sustrato (constantes de semisaturación por el sustrato bajas) y una tasa de respuesta relativamente baja en altas concentraciones de sustrato, lo que les aporta una mayor resistencia en medios con escasez de sustrato. Por lo tanto, los fangos procedentes de sistemas de tratamiento de corrientes con alta carga de nitrógeno amoniacal (como un reactor SHARON) poseen una población diferente de bacterias (tanto amonioxidantes como nitritoxidantes) a la de los fangos activados de las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDARs). Los primeros sistemas presentan altas concentraciones de sustrato que favorecen a las especies *r-strategists* (*N. europaea*, *Nitrobacter*) con unas constantes semisaturación de amoníaco y nitrito altas. Las especies *k-strategists* (*N. oligotropha*, *Nitrospira*) son dominantes en estaciones depuradoras de aguas residuales, debido a sus constantes de semisaturación bajas (Manser, 2005).

#### **6.4 Potenciales aplicaciones del modelo desarrollado y las metodologías de calibración propuestas.**

Una de las herramientas más interesantes de las que se dispone en la actualidad para analizar y predecir el comportamiento de un sistema biológico es el desarrollo de un modelo matemático para la simulación de éste. Son muchas las razones que justifican el auge de la modelación matemática, pero hay que destacar, en primer lugar, el mejor conocimiento de los procesos biológicos, y en segundo lugar, el espectacular avance de los ordenadores y el software matemático.

Como ya se ha comentado, la nitrificación es un proceso que tiene lugar en dos etapas, en la que el amonio es oxidado a nitrito y luego el nitrito es oxidado a nitrato. Las dos reacciones de oxidación son llevadas a cabo por dos grupos de bacterias diferentes (bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes). En el presente trabajo se han obtenido las expresiones cinéticas que permiten la modelación de las velocidades específicas de crecimiento y lisis de la biomasa responsable del proceso de nitrificación en los sistemas de tratamiento biológico. Además se detallan dos metodologías de calibración de los parámetros del modelo, desarrolladas para un reactor SHARON a escala de laboratorio y una planta piloto de fangos activados. La aplicación de dichas metodologías permite conocer las características de las poblaciones de bacterias de AOB y NOB presentes en estos sistemas.

Los modelos en los que se considera el proceso de nitrificación como una única etapa eran aceptables cuando se modelaba un sistema general de tratamiento de aguas residuales, ya que el nitrito raramente llegaba a acumularse, pues éste es fácilmente oxidado a nitrato. Sin embargo, hay situaciones en las que este compuesto intermedio del proceso de nitrificación puede llegar a acumularse en el sistema y alcanzar concentraciones considerables (cuando la capacidad de nitrificación de la planta es insuficiente o no funciona correctamente). Además, los nuevos procesos avanzados de eliminación de nitrógeno, como el proceso SHARON, requieren la modelación detallada del proceso de nitrificación, ya que son procesos basados en la ventaja de las bacterias amonioxidantes sobre las bacterias nitritoxidantes. Un modelo del proceso de nitrificación en dos etapas permite una comprensión más profunda de cómo intervienen ambos sustratos, amonio y nitrito, en cada una de las etapas del proceso global.

El desarrollo de modelos de nitrificación en dos etapas es esencial para la resolución de problemas de acumulación de nitrito en plantas de tratamiento, el desarrollo y control de nuevos procesos de eliminación de nitrógeno amoniacal, para su aplicación en sistemas de tratamiento de aguas residuales industriales y aguas residuales con baja relación C:N,... Las

simulaciones de cualquier sistema, una vez se dispone de un modelo de nitrificación adecuado, permiten predecir la respuesta de dicho sistema ante situaciones diferentes y, por tanto, sus resultados son muy útiles a la hora de diseñar una estrategia de operación.

El modelo desarrollado en este trabajo de investigación junto con las metodologías de calibración propuestas permite, en primer lugar, comparar las características de las poblaciones de bacterias amonioxidantes que se desarrollan en dos sistemas biológicos muy diferentes desde el punto de vista operacional. Esta información permite la simulación y optimización del funcionamiento de dichos sistemas mediante el control de diferentes características de operación (pH, concentración de OD, TRC,...).

Por otro lado, la aplicación de la metodología de calibración propuesta para un proceso de fangos activados permite obtener por separado las características de las bacterias amonioxidantes y de las bacterias nitritoxidantes en cualquier sistema biológico: afinidad por el oxígeno, afinidad por el sustrato, velocidad de crecimiento, efecto del pH,...

Conociendo las características de ambos grupos de bacterias presentes en el sistema de tratamiento evaluado es posible comparar y seleccionar condiciones que favorezcan el desarrollo de las bacterias que interesan en cada caso (ya que poseen diferentes valores de constante cinéticas:  $K_{O_2}$ ,  $K_H$ ,  $K_{IH}$ ,  $\mu$ ,...). La aplicación de la metodología de calibración al caso concreto de la planta piloto ha mostrado que las principales diferencias entre las bacterias amonioxidantes y nitritoxidantes presentes en este sistema son:

- ✓ Mayor afinidad por el oxígeno de las bacterias amonioxidantes.
  - $K_{O_2}$  (AOB) =  $0.52 \pm 0.04$  mg  $O_2/l$
  - $K_{O_2}$  (NOB) =  $0.67 \pm 0.02$  mg  $O_2/l$
- ✓ Mayor velocidad de crecimiento de las bacterias amonioxidantes.
  - $\mu^{max}$  (AOB) = 0.59-0.88  $d^{-1}$
  - $\mu^{max}$  (NOB) = 0.24-0.42  $d^{-1}$
- ✓ Mayor tolerancia a valores de pH bajos de las bacterias amonioxidantes.
  - Para AOB  $\rightarrow K_H = 6.05$  y  $A_H = 2.64$
  - Para NOB  $\rightarrow K_H = 6.91$  y  $A_H = 6.9$
- ✓ Mayor tolerancia a valores de pH altos de las bacterias nitritoxidantes.
  - Para AOB  $\rightarrow K_{IH} = 9.98$  y  $A_{IH} = 2.74$
  - Para NOB  $\rightarrow$  No se observó inhibición a pH de casi 10.

Los resultados de la planta piloto previsiblemente no serán muy diferentes en una planta de fangos activados a gran escala. Por lo tanto, conociendo estas características, en caso de que se produjera una acumulación de nitrito en un proceso de fangos activados global habría que actuar sobre uno o más de los siguientes aspectos:

- Elevar la concentración de OD.
- Elevar el TRC.
- Elevar el pH del medio.

Aunque los resultados obtenidos en la calibración de la planta piloto han permitido obtener unas características generales para cualquier proceso global de fangos activados, la calibración de los parámetros para cada caso en concreto permitiría cuantificar las acciones a llevar a cabo. De esta forma la calibración del modelo permite determinar la/s causa/s del problema de acumulación de nitrito, y solucionarlo favoreciendo el crecimiento de las bacterias nitritoxidantes. La integración de este modelo de nitrificación en un modelo global con todas las bacterias (como el BNRM1) es un punto importante del trabajo de investigación ya que permite cuantificar las acciones llevadas a cabo y observar el efecto de éstas sobre el resto de bacterias.

El modelo también es útil en el caso de querer excluir las bacterias nitritoxidantes del sistema para llevar a cabo el proceso de eliminación de nitrógeno a partir de nitrito, con el consiguiente ahorro de costes de aireación y materia orgánica. El modelo global permite cuantificar cuales serían las características de operación más adecuadas para lograr este objetivo y observar al mismo tiempo como se modifica la actividad del resto de bacterias. En el caso de un proceso de fangos activados, las acciones para poder llevar a cabo la eliminación de las bacterias nitritoxidantes del sistema serian las contrarias a las arriba mencionadas: descender la concentración de OD, el TRC y/o el valor de pH.

C  
A  
P  
I  
T  
U  
L  
O  
7

***Conclusiones.***



## **7 Conclusiones.**

Las conclusiones más relevantes que se pueden extraer de este trabajo de tesis son:

### ***Desarrollo del modelo y metodologías de calibración.***

1. Se ha definido un modelo que describe la eliminación de nitrógeno vía nitrito. Este modelo considera los procesos de crecimiento y lisis de las bacterias AOB y NOB, implicadas en el proceso de nitrificación. En el modelo se incluyen también los procesos de equilibrio químico de los sustratos de las bacterias ( $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ ,  $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ ) y los procesos físicos de desabsorción del  $\text{NH}_3$  y del  $\text{CO}_2$ . Una vez definido, el modelo ha sido incorporado al modelo general BNRM1 e implementado en el programa DESASS desarrollado por el grupo de investigación CALAGUA para una simulación más completa de los procesos que tienen lugar en una EDAR.
2. Se han desarrollado dos metodologías de calibración del modelo para un reactor SHARON a escala de laboratorio y una planta piloto de fangos activados. Se propone una metodología de calibración adaptada a cada uno de los sistemas evaluados ya que son procesos de eliminación de nitrógeno con características muy diferentes. En el primer caso, la calibración permite obtener solamente los valores de los parámetros cinéticos y estequiométricos de las bacterias AOB, ya que son las únicas bacterias presentes en el reactor SHARON. La calibración desarrollada para la planta piloto permite determinar los parámetros de las bacterias AOB y NOB de manera independiente, teniendo en cuenta también que existen otros grupos de bacterias presentes en este tipo de sistemas.

### ***Calibración de bacterias del reactor SHARON.***

3. En el proceso de calibración de las bacterias AOB presentes en el reactor SHARON se observó en primer lugar que se obtiene una predicción adecuada de los resultados experimentales si se considera el amoníaco como sustrato de las bacterias, en lugar del amonio. En el ajuste se determinó una  $K_{\text{NH}_3}=0.32$  mg/l, valor que indica una baja afinidad por el sustrato. También se verificó que existe inhibición por ácido nitroso si la concentración de este es suficiente, ya que para una concentración de 1.32 mg N- $\text{HNO}_2$ /l la actividad de las bacterias desciende al 50 %. Este valor de la constante muestra que las bacterias AOB tienen mucha resistencia al ácido nitroso, dado que se necesitaría una elevada concentración de nitrito para alcanzar la concentración de  $\text{HNO}_2$  indicada por la constante. Por otro lado, los

resultados de la calibración mostraron que la salinidad del medio comienza a ejercer un efecto negativo sobre las bacterias antes de que se pueda apreciar una inhibición por amonio/amoniaco, con lo que se tuvo que modificar el modelo para incluir un término de inhibición por salinidad y eliminar la función de inhibición por sustrato, propuesta en el modelo inicial.

4. Durante las experiencias realizadas para la calibración de los parámetros del modelo se observó que la inhibición por pH en estas bacterias era más acusada a pH altos que a pH bajos, lo que llevó a modificar la función de inhibición por pH. La nueva función propuesta consiste en el producto de dos funciones sigmoideas que permiten ajustar de forma asimétrica la inhibición por pH a ambos lados del pH óptimo. Esta función asimétrica proporcionó mejores predicciones del modelo. Con el ajuste de esta función de pH a los datos experimentales se observó que los ensayos realizados se debían organizar en dos grupos con diferentes valores de las constantes de pH ( $K_H=6.40$ ,  $K_{IH}=8.55$  el primer grupo, y  $K_H=5.70$ ,  $K_{IH}=8.20$  en el segundo). La única diferencia entre estos dos conjuntos de experimentos era el pH medio en el reactor SHARON del que se extraían las muestras en el momento de los ensayos (cuando se realizaron los primeros ensayos el pH medio era de 6.60 y en el caso del segundo grupo el pH era de 6.18). Este resultado llevó a concluir que las constantes de inhibición por el pH van determinadas en cada caso por las condiciones ambientales en las que se desarrollan las bacterias, ya que son capaces de adaptar su pH óptimo a las condiciones en las que crecen.

5. En los ajustes realizados para determinar el efecto de la temperatura se observó que los datos experimentales se reproducen adecuadamente con la ecuación de Arrhenius, pero solamente hasta una temperatura de 30 °C. A partir de aquí la ecuación de Arrhenius no puede representar el cambio que sufre la velocidad de crecimiento de las bacterias AOB como consecuencia de las elevadas temperaturas. En cambio, el modelo modificado de Ratkowsky, aunque no tiene un sentido físico, reproduce mejor los resultados experimentales en todo el rango de temperaturas evaluadas.

6. En la determinación del rendimiento celular de las bacterias se obtuvieron valores muy elevados comparados con los descritos por la bibliografía. Se puede asumir que estas diferencias pueden deberse a la forma en que se ha realizado el ensayo respirométrico, ya que la relación  $S_0/X_0$  es muy alta en todos los experimentos realizados en este estudio. Estos ensayos se llevaron a cabo a las mismas condiciones a las que operaba el reactor SHARON ya que estas son las condiciones en las que interesaba obtener la Y para que fuese representativa de dicho sistema. Por lo tanto, a la hora de determinar el valor de la

constante de rendimiento celular es muy importante determinar las condiciones en las que se realiza los ensayos respirométricos.

7. El método de cuantificación bacteriana desarrollado por Borrás L. (2008) permite determinar la concentración de bacterias AOB en el reactor medida en mg de DQO por litro. Al disponer de datos de  $\mu^{\max} \cdot X_{\text{NH}}$ , obtenidos en ensayos anteriores de la calibración, se pudo obtener la tasa máxima de crecimiento de las bacterias presentes en el reactor SHARON ( $\mu^{\max} = 2.87 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$  para una temperatura de 30 °C).

8. Las simulaciones de los reactores SHARON han permitido, en primer lugar, la determinación de la tasa de lisis de las bacterias mediante la simulación del estado estacionario del reactor SHARON R<sub>1</sub>. Por otro lado, se ha validado el modelo calibrado mediante la simulación del estado estacionario de las diferentes etapas evaluadas en el reactor SHARON R<sub>2</sub>. Con estas simulaciones se ha comprobado la adecuada capacidad del modelo de predecir el comportamiento de las bacterias AOB en un reactor SHARON. En la fase de operación del reactor SHARON R<sub>2</sub> se obtuvo que, para que las bacterias AOB lleven a cabo el proceso de nitrificación parcial, necesitan un TRC entre 1.56 y 1.75 d si la temperatura es de 30 °C. Si la temperatura se incrementa a 35 °C el TRC mínimo desciende a 1.40 – 1.52 d. Los resultados de la simulaciones mostraron que el modelo predice resultados similares, ya que, para 30 °C se requiere un TRC superior a 1.7 d mientras que para 35 °C el TRC debe ser mayor de 1.3 d.

#### ***Calibración de bacterias de la planta piloto.***

9. Para poder medir el consumo de oxígeno de las bacterias AOB y NOB de forma independiente se examinaron dos métodos: uso de un inhibidor específico de la actividad de cada grupo de bacterias y el método de adiciones sucesivas de nitrito y amonio propuesto por Moussa *et al.* (2003). Dado que el segundo método proporcionó resultados más favorables se decidió emplear éste para la calibración de los parámetros de las bacterias.

10. En la calibración de las constantes de semisaturación e inhibición por el HNO<sub>2</sub> y el NH<sub>3</sub> de las bacterias NOB presentes en la planta piloto se obtuvo:

- El modelo reproduce adecuadamente los resultados experimentales si se incluye la concentración de TNO<sub>2</sub>, en lugar del HNO<sub>2</sub>, en la ecuación del proceso de crecimiento de las bacterias. Se obtuvo una  $K_{\text{NO}_2} = 0.26 \text{ mg N-NO}_2/\text{l}$ .

- No se observa inhibición de las bacterias por  $\text{HNO}_2$  hasta concentraciones de 10 mg/l de nitrito a pH 7, concentración considerablemente alta para un sistema convencional de tratamiento. Por ello, esta inhibición se puede despreciar cuando la concentración de nitrito en el sistema es muy baja.
- Aunque no se han realizado los experimentos necesarios para determinar la inhibición de las NOB por amoníaco, se llevaron a cabo un par de ensayos para ver el efecto de las elevadas concentraciones de TAN en las bacterias AOB y NOB en conjunto. Con estos se comprobó que, para un pH de 7.0, se necesitan concentraciones por encima de 400 mg N- $\text{NH}_4$ /l para poder inhibir a las bacterias. Estos valores de TAN no son habituales en un sistema de fangos activados y, además, es probable que la inhibición sea debida a la salinidad y no a la concentración de amonio, por ello, la inhibición por  $\text{NH}_3$  puede ser despreciada en este caso tanto en bacterias AOB como NOB.

**11.** En la calibración de las constantes de semisaturación e inhibición por el  $\text{NH}_3$  y el  $\text{HNO}_2$  de las bacterias AOB presentes en la planta piloto se obtuvo:

- El modelo reproduce adecuadamente los resultados experimentales si se incluye la concentración de TAN, en lugar del  $\text{NH}_3$ , en el modelo, determinándose una constante  $K_{\text{NH}_4}$  de 0.54 mg N- $\text{NH}_4$ /l. Esta constante indica que las bacterias AOB de la planta piloto tienen una alta afinidad por el sustrato, al contrario que lo obtenido para las bacterias AOB del reactor SHARON.
- Como se ha comentado para las bacterias NOB, se necesitan concentraciones excesivas de TAN para observar inhibición de las bacterias, por lo que este término de inhibición es despreciable.
- En cuanto a la inhibición por  $\text{HNO}_2$  se determinó una constante  $K_{\text{HNO}_2}=0.013$  mg N- $\text{HNO}_2$ /l. Para alcanzar esta concentración de  $\text{HNO}_2$  se requieren concentraciones de nitrito muy altas y/o pH muy bajo; así por ejemplo, para un pH de 7 y una  $T^a$  de 20 °C se requieren 50 mg N- $\text{NO}_2$ /l. Estas circunstancias no se suelen dar en un tratamiento convencional de aguas residuales y, por ello, en la mayoría de los casos este tipo de inhibición también se desprecia.

**12.** En la determinación de la constante de afinidad por el oxígeno para las bacterias AOB y NOB se ha obtenido que esta constante de semisaturación es menor para las bacterias AOB ( $K_{\text{O}_2} = 0.52 \pm 0.04$  mg  $\text{O}_2$ /l) que el valor determinado para las bacterias NOB ( $K_{\text{O}_2} = 0.67 \pm 0.02$  mg  $\text{O}_2$ /l), lo que indica que las bacterias NOB son más sensibles a las bajas concentración de oxígeno que las bacterias AOB.

**13.** En los ensayos para la determinación del efecto del pH sobre la actividad de las bacterias se observó que, al igual que para el caso del reactor SHARON, fue necesario el empleo de una función sigmoïdal para reproducir correctamente los resultados experimentales:

- Para el caso de las bacterias NOB se observó que su actividad desciende de forma drástica si el pH es inferior de un valor aproximado de 7.10 y que no se ven inhibidas por un valor de pH muy elevado, ya que a un valor de casi 10, éstas aún se encuentran en su actividad máxima. Por lo tanto, en el modelo se consideró el efecto del pH como una única función sigmoïdal que representa la inhibición por valores de pH bajos.
- Para las bacterias AOB hay que destacar que tienen un amplio rango de pH en el que mantienen su actividad por encima del 80 % (desde 6.5 hasta 9.5). Comparando con las bacterias NOB, las bacterias AOB toleran mejor valores de pH bajos, pero en cambio, sí que presentan inhibición por pH altos. Por ello, en este caso la función de inhibición por pH es el producto de dos funciones sigmoïdales para considerar la inhibición tanto a valores de pH altos como bajos.

**14.** Al igual que para la calibración del reactor SHARON, el método de cuantificación de Borrás L. (2008) permitió determinar la concentración de cada grupo de bacterias en las muestras de fango analizadas y a partir de aquí obtener el valor de la tasa máxima de crecimiento de cada una. En la determinación de la tasa de crecimiento de las bacterias AOB y NOB se observó un cambio de este parámetro cinético cuando se eliminó el reactor BABE de la planta piloto. Ambos grupos de bacterias experimentaron un incremento de su velocidad máxima de crecimiento debido, probablemente, a que la eliminación de este reactor supuso un descenso considerable del TRC (y de la  $T^a$ , al menos mientras se encontraban en este reactor) lo que llevó a un cambio en la población bacteriana de ambos grupos de bacterias. El seguimiento mediante FISH en las etapas con y sin reactor BABE permitió observar que:

- Las bacterias AOB pasaron de un 8% a un 6% respecto del total de bacterias. Cuando se eliminó el reactor BABE desaparecieron del sistema las *Nitrosomonas eutropha*, *europaea*, *halophila* y *Nitrosospira* spp.
- Las bacterias NOB descendieron de un 8 a un 2 % desapareciendo una de las dos especies existentes inicialmente (*Nitrobacter*).

### **Análisis comparativo de las bacterias AOB en los dos sistemas.**

**15.** En los dos sistemas estudiados se desarrollan las bacterias AOB responsables de la primera etapa del proceso de nitrificación. En la calibración de los parámetros de estas bacterias se han obtenido valores diferentes entre los que hay que destacar:

- En cuanto al sustrato empleado por las bacterias, el modelo reproduce mejor los datos experimentales si en el reactor SHARON se incluye el amoníaco en la función de afinidad, mientras que en el caso de la planta piloto la inclusión del sustrato en forma de TAN proporciona un mejor ajuste de los datos experimentales.
- Las bacterias presentes en la planta piloto tienen una mayor afinidad por la concentración de oxígeno disuelto.
- Las bacterias del reactor SHARON presentan una mayor resistencia a elevadas concentraciones de ácido nitroso y de sales.
- La amplitud del rango óptimo de pH para el desarrollo de las bacterias AOB es considerablemente mayor en la planta piloto, sin embargo, las bacterias del reactor SHARON pueden desarrollarse en ambientes con un pH menor.
- La velocidad de crecimiento es mayor en las bacterias presentes en el reactor SHARON porque es un sistema con una mayor temperatura. En las bacterias de la planta piloto, aparte de obtenerse valores inferiores, se observa un cambio en su tasa de crecimiento debido a la eliminación del reactor BABE del esquema de operación.

Estos cambios en las constantes del modelo son atribuidos a un cambio de población amonioxidante de un sistema de operación a otro. En el reactor SHARON se desarrollaban únicamente *Nitrosomonas europaea*, *eutropha*, *halophila*, mientras que en la planta piloto la especie predominante era *Nitrosomonas oligotropha*. Son especies diferentes y por tanto poseen parámetros diferentes.



***Anexos.***



## **Anexo I. Software de simulación DESASS.**

### **✎ Descripción.**

El programa DESASS (*Design and Simulation of Activated Sludge Systems*) se diseñó con el objeto de desarrollar una herramienta informática que facilitara el diseño de los sistemas de fangos activados para la eliminación biológica de nutrientes (Ferrer *et al.*, 2008).

En general, puede decirse que el programa DESASS es un simulador de EDARs diseñado y optimizado para la investigación de los procesos de fangos activados, para la evaluación de sistemas de fangos activados, para la operación de entrenamiento de personal y para propósitos educativos, con un particular énfasis en la velocidad de cálculo, presentación gráfica y fácil manejo.

DESASS presenta un entorno de trabajo de fácil uso y permite evaluar sistemas de fangos activados, pudiéndose representar desde sistemas tan sencillos como la eliminación de materia orgánica, hasta procesos más complejos en los que se incluye la eliminación biológica de nitrógeno y fósforo, fermentación de fango primario y digestión de fangos (aerobia/anaerobia).

### **✎ Modelos utilizados.**

El modelo implementado en el programa considera la práctica totalidad de los procesos físicos, químicos y biológicos que tienen lugar en las EDARs.

- **Modelo biológico.** Actualmente, el programa DESASS tiene implementado un algoritmo de modelación matemática basado el modelo BNRM1 (*Biological Nutrient Removal Model No.1*, Seco *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a su flexibilidad en la incorporación de procesos, al programa se le puede incluir cualquier modelo biológico que se desee. Esta característica se ha facilitado mediante la utilización en el programa del formato de notación matricial propuesto por el grupo de trabajo de la IWA para los procesos biológicos. Para incluir en el programa DESASS un modelo biológico distinto del BNRM1, se debe modificar el código definiendo los componentes del modelo, y fijando, para cada uno de los procesos, los coeficientes estequiométricos de los componentes que participan en dicho proceso y la expresión cinética del mismo.

Puesto que el modelo desarrollado en la presente tesis también utiliza la notación matricial se modificó el código implementando dicho modelo en el *software* DESASS. Además, se ha incluido en el programa el diseño de dos nuevas operaciones unitarias: el reactor SHARON y el reactor BABE.

• **Modelo de sedimentación.** Para representar los procesos de sedimentación y espesado del fango, DESASS tiene implementado un modelo de sedimentación basado en el modelo de Takács (1991) para la velocidad de sedimentación y modificado por un factor de compresión para tener en cuenta el proceso de compactación que se produce en el fondo de los decantadores y espesadores (Ribes, 2004). Se trata de un modelo unidimensional basado en la teoría del flujo que junto con el modelo biológico permite simular el comportamiento dinámico de los sistemas de fangos activados incluyendo el tanque de aireación y el decantador secundario. El modelo del decantador incluye las zonas de clarificación, sedimentación y compresión del fango, de forma que se pueden obtener no sólo las concentraciones de sólidos en el efluente y en la recirculación de fangos, sino también el perfil de concentraciones, mediante la división del decantador en capas horizontales. De esta manera, es posible conocer la posición del manto de fangos en cada momento y la capacidad de almacenamiento de fangos del decantador.

Para poder modelar los procesos biológicos que se producen en los decantadores se ha utilizado la misma estructura de cálculo que en los reactores de fangos activados, considerando las capas del decantador como una serie de reactores. La inclusión de este modelo en DESASS permite la simulación de los procesos de desnitrificación que con frecuencia tienen lugar en los decantadores secundarios.

### **Características.**

Las principales características del software DESASS son:

- ✓ Simula una gran variedad de configuraciones de plantas permitiendo fijar los volúmenes, caudales y concentraciones que van desde plantas de experimentación (piloto), hasta plantas de gran tamaño.
- ✓ Permite la simulación dinámica de variaciones de cargas (variación de carga diaria, eliminación de lodos en exceso, relaciones de recirculación), así como la introducción de condiciones iniciales de los elementos en régimen transitorio.

- ✓ Consideración simultánea de varios sistemas de fangos activados en serie o en paralelo, obteniéndose una mayor flexibilización en las configuraciones de sistemas de fangos activados.
- ✓ Posibilidad de simular los procesos de sedimentación en los decantadores y espesadores, además de los procesos biológicos que se pueden producir en ellos.
- ✓ Diseño de los sistemas de aireación, mediante tres tipos de maquinarias (Difusores, Turbinas, Venturi).
- ✓ Contiene un módulo de control de las concentraciones de oxígeno, amonio y nitrato en sistemas de fangos activados basado en lógica difusa.
- ✓ Comparación inmediata de resultados para condiciones de verano e invierno, en régimen estacionario.
- ✓ Incluye un programa auxiliar para la actualización de la base de datos de la maquinaria.
- ✓ Permite representar gráficamente tanto en régimen estacionario como en régimen transitorio, la evolución de las variables del modelo en cada elemento.
- ✓ Permite exportar los resultados obtenidos a una hoja de cálculo Excel para facilitar su uso en la elaboración de informes.
- ✓ Rapidez en el cálculo numérico, tanto para régimen transitorio como estacionario.

La ventana principal del programa incluye la barra de menús, una barra de herramientas desde donde se pueden realizar todas las funciones generales del programa, y la ventana de trabajo, donde se construye el diagrama de flujo de la planta. En la Figura 93 se muestra la pantalla de diseño del *software* de simulación DESASS, con un ejemplo ilustrativo.

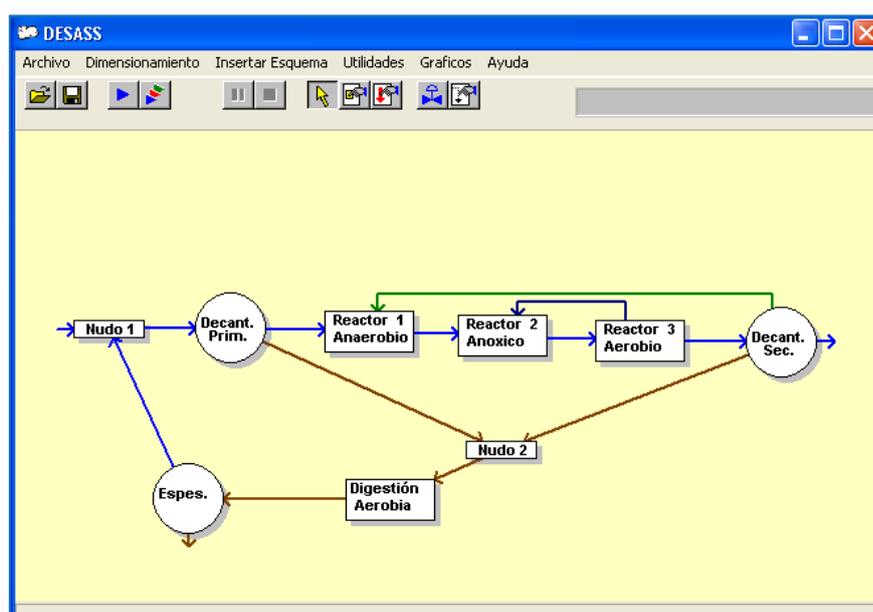


Figura 93. Pantalla del simulador DESASS. Ejemplo de esquema de operación.

## **Aplicaciones.**

El programa DESASS se ha desarrollado de modo que se permita el cálculo tanto de las condiciones estacionarias (*Diseño*) como de condiciones transitorias (*Simulación*). Además, es una herramienta muy útil para el diseño de estrategias de control.

- **Diseño.** DESASS permite el cálculo del estado estacionario para las condiciones de invierno y de verano simultáneamente, ofreciendo así una fácil comparación entre cada una de las estaciones. En régimen estacionario el programa desarrolla una solución basándose en las condiciones medias establecidas en planta, tales como calidad del agua de entrada, caudales de recirculación interna y de lodos, y demás.

- **Simulación.** En régimen transitorio el usuario simulará la evolución de la planta teniendo en cuenta la variación diaria en la entrada. También se puede realizar una simulación con entrada constante para ver cómo evoluciona el sistema frente a alguna modificación en las condiciones de operación.

También es posible establecer en condiciones de simulación la opción de incluir una variación temporal de los caudales de recirculación y de purga del fango de los decantadores. Esto permite probar distintas estrategias de operación frente a la entrada de puntas de carga y de caudal diarias, o frente a perturbaciones puntuales como puede ser el caso de un día de lluvia abundante.

Además, el programa tiene implementado un algoritmo de control de la aireación mediante lógica Fuzzy que permite diseñar y probar el controlador por simulación.

- **Aplicaciones de control.** DESASS permite diseñar estrategias para controlar el oxígeno disuelto, el amonio y el nitrato. Una característica muy importante es que los algoritmos de control se pueden implementar en una planta real sin más que sustituir los datos que actualmente se obtienen del modelo por las señales enviadas por los aparatos de medida. Dado que es posible simular lo que sucede en estado transitorio DESASS también permite optimizar la explotación de sistemas de fangos activados en funcionamiento.

Algunas posibilidades de optimización son:

- ◇ Disminuir la concentración de oxígeno en periodos de baja carga (concentraciones de amonio bajas).
- ◇ Disminuir la recirculación interna en periodos de baja carga para evitar una excesiva concentración de nitratos en el tanque anóxico.
- ◇ Establecer los valores de purga y de recirculación adecuados para mantener la concentración deseada de sólidos suspendidos, etc.



---

---

***Referencias y bibliografía.***

---

---



## Referencias y Bibliografía.

### A

- Aamand J., Ahl T., Spieck E. (1996). Monoclonal antibodies recognizing nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter hamburgensis*, *N. winogradskyi*, and *N. vulgaris*. *Applied of Environmental Microbiology*. 62, 2352- 2355.
- Allison J.D., Brown D.S., Novo-Gradac K.J. (1991). MINTEQA2/PRODEFA2, A Geochemical Assessment Model for Environmental Systems: Version 3.0. EPA/600/3-91/021, USEPA, Washington, D.C.
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., 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, American Water Works Association and Water Environment Federation. (2005). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 21st Ed., Washington D.C.
- Anderson, J. H. (1965). Studies on the formation of nitrogenous gas from hydroxylamine by *Nitrosomonas*. *Biochim. Biophys. Acta*, 97, 337-339.
- Anderson, I. C., and Levine, J. S. (1986). Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifiers, denitrifiers, and nitrate respirers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3525-3533.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M. y Burkholder, J.M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries*. 25, 704-726.
- Anthonisen, A.C., Loehr R.C., Prakasan T.B.S., Srineth E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Water Pollution Control Federation*. 48 (5), 835-852.

### B

- Baetens, D. (2001). *Enhanced Biological Phosphorus Removal: Modelling and experimental design*. Tesis doctoral. Universidad de Gante, Países Bajos.
- Baker, L.A., Herlihy, A.T., Kaufmann, P.R., Eilers, J.M. (1991). Acidic lakes and streams in the United States: the role of acidic deposition. *Science*. 252, 1151-1154.
- Baker PS, Dold PL. (1997). General model for biological nutrient removal activated sludge systems: model presentation. *Water Environment Research*, 69 (5), 969-984.
- Balmelle B. (1992). Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. *Water Science and Technology*. 26, 1018–1025.
- Balmér, P. (2004). Phosphorus recovery - an overview of potentials and possibilities. *Water Science and Technology*, 49(10), 185-190.
- Bano N, Hollibaugh JT. (2000). Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing bacteria of the b subdivision of the class Proteobacteria in the Arctic Ocean. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 1960–1969.
- Bartosch, S., Wolgast, I., Spieck, E., Bock, E. (1999). Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. *Applied of Environmental Microbiology*. 65, 4126- 4133.
- Bartosch, S., Hartwig, C., Spieck, E., Bock, E. (2002). Immunological detection of *Nitrospira*-like bacteria in various soils. *Microbiol. Ecol.*, 43, 26-33.
- Batstone, D. J.; Keller, P.; Angelidaki, I.; Kalyuzhnyi, S. V.; Pavlostathis, S. G.; Rozzi, A.; Sanders, W. T. M.; Siegrist, H; Vavilin, V. A. (2002). *Anaerobic Digestion Model No. 1*, IWA Scientific and Technical Report No. 13, IWA, London.

- Baumann B, Snozzi M, Zehnder AJB, van der Meer JR. (1996). Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *Journal of Bacteriology*. 178, 4367–4374.
- Bazin MJ, Cox DJ, Scott RI. (1982). Nitrification in a column reactor: limitations transient behavior and effect of growth on a solid substrate. *Soil Biol. Biochem.* 14, 477-487.
- Beccari M, Marani E, Ramadori R, Tandoi V. (1983). Kinetic of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 55, 58–64.
- Belser, L. W., and Schmidt, E. L. (1978). Serological diversity within a terrestrial ammonia-oxidizing population. *Applied of Environmental Microbiology*. 36, 589-593.
- Belser, L. W. (1979). Population ecology of nitrifying bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 16, 309-333.
- Belser L.W., Mays E.L. (1980). Specific Inhibition of Nitrite Oxidation by Chlorate and Its Use in Assessing Nitrification in Soils and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 39 (3), 505-510.
- Belser L.W., Schmidt E.L. (1981). Inhibitory Effect of Nitrapyrin on Three Genera of Ammonia- Oxidizing Nitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*. 41 (3), 819-821.
- Bernet N, Sanchez O, Cesbron D, Steyer PD, Delgenes JP. (2005). Modelling and control of nitrite accumulation in a nitrifying biofilm reactor. *Biochemical Engineering Journal*. 24 (2), 173-183.
- Bock, E. (1976). Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. II. Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch. Microbiol.* 108, 305-312.
- Bock, E., Koops, H.-P., Harms, H., and Ahlers, B. (1991). The biochemistry of nitrifying organism. In J. M. Shively, and L. L. Barton (Eds.), *Variation in autotrophic life*. London, UK: Academic Press. 171-200.
- Bock, E., Schmidt, I., Stüven, R., and Zart, D. (1995). Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonia or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 163, 16-20.
- Bock, E., and Wagner, M. (2001). Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. In E. Stackebrandt (Ed.), *The Prokaryotes vol 3* (online). New York, NY: Springer-Verlag.
- Boer, W., Klein, W., Gunnewiek, P. J. A., Veenhuis, M., Bock, E., Laanbroek, H. J. (1991). Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria. *Applied of Environmental Microbiology*. 57, 3600-3604.
- Boer, W., Kowalchuk, G. A. (2001). Nitrification in acid soils: Micro-organisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 853-866.
- 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.
- Boursier H., Beline F., Paul E. (2005). Piggery wastewater characterization for biological nitrogen removal process design. *Bioresource Technol.* 96, 351– 358.
- Brett, S., Guy, J., Morse, G.K., Lester, J.N. (1997). *Phosphorus removal and recovery technologies*. London Selper Publications.
- Brock, T. (1994). *Biology of microorganisms*. 7th Edition. Editorial Prentice-Hall International.
- Broda E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* 17, 491-493.
- Brouwer M, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. (1996). One reactor system for ammonium removal via nitrite. STOWA report 96-01. STOWA, Utrecht.
- Browner H, Klapwijk A., Keesman KJ. (1998). Identification of activated sludge and wastewater characteristics using respirometric batch-experiments. *Water Research*. 32, 124-1254.
- 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.
- Bruijn PD. *et al.* (1995). Growth of *Nitrosomonas europaea* on Hydroxylamine. *FEMS Microbiology letters*. 125, 179-184.

**C**

- Camargo, J.A., Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*. 32, 831-849.
- Campos JL, Mosquera-Corral A., Sanchez M., Mendez R, Lema JM. (2002). Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Research*. 36 (10), 2555-2560.
- Carrera J. (2000). Eliminación biológica de nitrógeno en un efluente con alta carga. Estudio de los parámetros del proceso y diseño de una depuradora industrial. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Chang J., Chudoba P., Capdeville B. (1993). Determination of the maintenance requirements of activated sludge. *Water Science and Technology*. 28, 139-142.
- Choi E., Klapwijk B., Mels A., Browner H. (2006). Evaluation of wastewater characterization methods. *Water Science and Technology*. 52, 61-68.
- Chorus, I. (editor) (2001). *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Springer, Berlin.
- 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 Biochemistry*. 41, 1764-1772.
- Clark, C., Schmidt, E. L. (1966). Effect of mixed culture of *Nitrosomonas europaea* stimulated by uptake and utilization of pyruvate. *Journal of Bacteriology*. 91, 367-373.
- 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. *Water Science and Technology*. 3008-3016.
- Costello, D. J.; Greenfield, P. F.; Lee, P. L. (1991). Dynamic modelling of a single-stage high rate anaerobic reactor- I. Model derivation. *Water Research*. 25, (7), 847-858.

**D**

- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol*. 22, 434-444.
- Degrange, V., Bardin, R. (1995). Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Applied of Environmental Microbiology*. 61, 2093-2098.
- Denecke M., Liebig T. (2003). Effect of carbon dioxide on nitrification rates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 25 (4), 249-253.
- Diab, S., Shilo, M. (1988a). Effect of adhesion to particles on the survival and activity of *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp. *Arch. Microbiol*. 150, 387-393.
- Diab, S., Shilo, M. (1988b). Effect of light on the activity and survival of *Nitrosomonas* sp. And *Nitrobacter* sp. isolates from fish ponds. *Isr. J. Aquaculture Bamidgeh* 40 (2), 50-56.
- Dincer AR, Kargi F. (1999). Salt inhibition of nitrification and denitrification in saline wastewater. *Environmental Technology*. 20, 1147-1153.
- Dochain, D., Vanrolleghem, P.A., (2001). *Dynamical Modelling and Estimation in Wastewater Treatment Processes*. IWA Publishing, London, UK.
- Dosta Parras J. (2007). Operation and model description of advanced biological nitrogen removal treatments of highly ammonium loaded wastewaters. Departament D'Enginyeria Química. Universitat de Barcelona.
- Dytczak, M.A., Londry, K.L., Oleszkiewicz, J.A. (2008). Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates. *Water Research*. 42, 2320-2328.

## **E**

- EEA. (2005). Source apportionment of nitrogen and phosphorus inputs into the aquatic environment. Environmental Assessment Report No 7. European Environment Agency, Copenhagen.
- Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P. J. J., Siegrist, H., Van der Meer, J. R., and 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.
- Ekama G.A., Dold P.L., Marais G.vR. (1986) Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge. *Wat Sci Technol*. 18, 91-114.
- Environmental Protection Agency, EPA. (1993). Manual Nitrogen Control. EPA/625/R-93/010.311.

## **F**

- Ferrer, J., Seco, A. (2003). *Tratamientos biológicos de aguas residuales*. Editorial UPV. Valencia, España.
- Ferrer J., Seco A., Serralta J., Ribes J., Manga J., Asensi E., Morenilla J.J., Llavador F. (2008). DESASS: a software tool for designing, simulating and optimising WWTPs. *Environmental Modelling and Software*, 23, 19–26.
- Fwetrell, L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environ. Health Perspect*. 112, 1371-1374.
- Fiencke C, Bock E (2004) Genera specific immunofluorescence labelling of ammonia oxidizers with polyclonal antibodies recognizing both subunits of the ammonia monooxygenase. *Microbial Ecol* 47:374–384.
- Fischnetz (2004). *On the Trail of Declining Fish Stocks*. Eawag/ SAEFL, ISBN 3-906484-32-7.
- Fuerhacker M, Bauer H, Ellinger R, Sree U, Schmid H, Zibuschka F, Puxbaum H. (2000). Approach for a novel control strategy for simultaneous nitrification and denitrification in activated sludge reactors. *Water Research*. 34(9), 2499–2506.
- 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. *Journal of Biotechnology*. 99, 295–306.
- Freitag, A., Rudert, M., Bock, E. (1987). Growth of *Nitrobacter* by dissimilatory nitrate reduction. *FEMS Microbiol. Lett*. 48, 105-109.
- Fux C. (2003). *Biological nitrogen elimination of ammonium-rich sludge digester liquids*. PhD thesis, ETH Zürich, Switzerland.

## **G**

- Gapes D., Pratt S., Yuan Z., Keller J. (2003). Online titrimetric and off-gas analysis for examining nitrification processes in wastewater treatment. *Water Research*. 37, 2678-2690.
- García PA, Fernández-Polanco F. (1996). Parámetros de operación en sistemas de eliminación de nutrientes. In: Floats, X. (Ed). *Eliminación biológica de nutrientes en aguas residuales*. 2<sup>nd</sup> course on Environmental Engineering. Paperkite Editorial, Lleida, Spain.
- Garrido JM, Van Benthum WAJ, Van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. (1997). Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng*. 53, 168-178.
- Gatti M., García-Usach F., Seco A., Ferrer J. (2010). Wastewater COD characterization: analysis of respirometric and physical-chemical methods for determining biodegradable organic matter fractions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.
- Gee, C. S., and Kim, J. S. (2004) Nitrite accumulation followed by denitrification using sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 49(5-6), 47-55.

- Gibbs, M., Schiff, J.A., (1960). Chemosynthesis: The energy relations of chemoautotrophic organisms. In: Steward, F.C. (Ed.), *Plant Physiology: A Treatise*, Vol. IB: photosynthesis and chemosynthesis. Academic Press, New York, 279–319.
- Gieseke, A., Purkhold, U., Wagner, M., Amann, R., And Schramm, A. (2001). Community structure and activity dynamics of nitrifying bacteria in a phosphateremoving biofilm. *App. Env. Microb.* 67(3), 1351–1362.
- 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 C.P.L. Jr., Daigger G.T. y Lim H.C. (1999) *Biological wastewater treatment*. 2nd Edition. Marcel Dekker.
- Ginestet P., Audic J.M., Urbain N V., Block J.C. (1998). Estimation of Nitrifying Bacterial Activities by Measuring Oxygen Uptake in the Presence of the Metabolic Inhibitors Allylthiourea and Azide. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (6), 2266-2268.
- Golovacheva, R. S. (1976). Thermophilic nitrifying bacteria from hot springs. *Microbiology*. 45, 329-331.
- Grady CPL, Gujer W, Henze M, Marais GVR, Matsuo T. (1986). A model for single-sludge wastewater treatment systems. *Water Science and Technology*. 18 (6), 47-61.
- Grau P., de Gracia M., Vanrolleghem, Ayesa E. (2007). A new plant –wide modelling methodology for WWTPs. *Water Research*. 41 (19), 4357-4372.
- Greenburg, A.E., Levin, G., Kauffman, W.G. (1955). The effect of phosphorus removal on the activated sludge process. *Sewage and industrial wastes*, 27, 277.
- Grunditz C., Dalhammar G. (2001). Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Research*. 35 (2), 433-440.
- Guisasola A., Jubany I., Baeza J.A., Carrera J., Lafuente J. (2005). Respirometric estimation of the oxygen affinity constants for biological ammonium and nitrite oxidation. *J. Chem. Technol. Biot.* 80(4): 388-396.
- Gujer W, Zehnder A.J.B. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 15 (8-9), 127-167.
- Guo HY, Zhou JT, Su J, Zhang ZY (2005) Integration of nitrification and denitrification in airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 23, 57–62.

## **H**

- Hanaki K, Wantawin C, Ohgaki S. (1990a). Effects of the activity of heterotrophs on nitrification in a suspended-growth reactor. *Water Research*. 24, 289-296.
- Hanaki K, Wantawin C, Ohgaki S. (1990b). Nitrification at low level of DO with and without organic loading in a suspended growth reactor. *Water Research*. 24, 297–302.
- Hao XD, Heijnen JJ, van Loosdrecht MCM. (2002a). Model-based evaluation of temperature and inflow variations on a partial nitrification–ANAMMOX biofilm process. *Water Research*. 36, 4839–4849.
- Hays J.T., Forbes D.J. (1974). Thiourea solutions as nitrification inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 22 (3), 468-470.
- Helio L., Balaguer MD., Colprim J. (2004). Aplicació de la tecnologia SHARON al tractament biològic d'aigües residuals d'elevat contingut amoniacal. *Scientia gerundensis*. 27 (27), 59-73.
- Hellinga C, Schellen AAJC, Mulder JW, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. (1998). The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Water Science and Technology*. 37(9), 135–142.
- Hellinga C., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1999). Model based design of a novel process for nitrogen removal from concentrated flows. *Mathematical and Computer Modeling of Dynamical Systems*. 5 (4), 351-371.

- Helmer-Madrok, C., Schmid, M., Filipov, E., Gaul, T., Hippen, A., Rosenwinkel, K. H., Seyfried, C. F., Wagner, M., and Kunst, S. (2002). Deammonification in biofilms systems: population structure and function. *Water Science and Technology*, 35(1-2), 223-231.
- Helmer C, Kunst S. (1998) .Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. *Water Science and Technology*. 37, 183–187.
- Helmer, C., Kunst, S., Juretschko, S., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (1999). Nitrogen loss in a nitrifying biofilm. *Water Science and Technology*. 39(7), 13-21.
- Helmer, C., Tromm, C., Hippen, A., Rosenwinkel, K. H., Seyfried, C. F., and Kunst, S. (2001). Single stage nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems. *Water Science and Technology*. 43(1), 311-320.
- Henze, M.; Grady, C. P. L.; Gujer, W.; Marais, G. v. R.; Matsuo, T. (1987) Activated Sludge Model No.1. IAWPRC Scientific and Technical Report No.1. IAWPRC, London. ISSN 1010-707X.
- Henze M., Gujer W., Mino T., Matsuo T., Wentzel M.C., Marais G.v.R. (1995). Activated Sludge Model No.2. IAWQ Scientific and Technical Report No.2. IAWQ, London.
- 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. *Water Science and Technology*. 39 (1), 165-182.
- Henze M, Gujer W, Mino T, van Loosdrecht MCM.(2000). *Activated Sludge Models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3*. IWA Publishing, London.
- Henze M., Harremoës P., Jansen J.C., Arvin E. (2002). *Wastewater Treatment (3rd Ed.)* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjanovic D. (2008). *Biological wastewater treatment. Principles, modelling and design*. IWA Publishing.
- 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.
- Hidaka T, Yamada H, Kawamura M, Tsuno H. (2002). Effect of dissolved oxygen conditions on nitrogen removal in continuously fed intermittent-aeration process with two tanks. *Water Science and Technology*. 45, 181–188.
- Hirns, W. D., Hastings, R. C., Head, I. M., McCarthy, A. J., Saunders, J. R., Pickup, R. W., Hall, G. H. (1995). Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of *Nitrososphaera* in the environment. *Microbiol*. 141, 2793-2800.
- Hippen, A., Rosenwinkel, K. H., Baumgarten, G., and Seyfried, C. F. (1997). Aerobic deammonification: a new experience in the treatment of wastewaters. *Water Science and Technology*. 35(10), 111-120.
- Holman JB, Wareham DG (2005) COD, ammonia and dissolved oxygen time profiles in the simultaneous nitrification/denitrification process. *Biochemical Engineering Journal*. 22, 125–133.
- Hommes, N. G., Sayavedra-Soto, L. A., Arp, D. J. (2003). Chemolithoorganotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* on fructose. *J. Bacteriol*. 185, 6809-6814.
- Hooper, A. B. (1969). Biochemical basis of obligate autotrophy of *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*. 97, 776-779.
- Hooper, A. B. (1989). Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria. In H. G. Schlegel and B. Bowien (Eds.), *Autotrophic bacteria*. Madison, WI: Science Tech Publisher. 239-281.
- Hooper, A. B., and Balny, C. (1982). Reaction of oxygen with hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas*: fast kinetics. *FEBS Lett.*, 144, 299-303.
- Hooper, A. B., and Terry, K. R. (1979). Hydroxylamine oxidoreductase of *Nitrosomonas* – production of nitric oxide from hydroxylamine. *Biochim. Biophys. Acta*, 571, 12-20.
- Hu TL, Kung KT (2000) Study of heterotrophic nitrifying bacteria from wastewater treatment systems treating acrylonitrile, butadiene and styrene resin wastewater. *Water Science and Technology*. 42 (3–4), 315–322.
- Hu L, Wang J, Wen X, Qian Y. (2005). Study on performance characteristics of SBR under limited dissolved oxygen. *Process Biochemical*. 40, 293–296.

Hulsbeek, J.J.W., Kruit, J., Roeleveld, P.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2002). A practical protocol for dynamic modeling of activated sludge systems. *Water Sci. Technol.* 45 (6), 127–136.

Hunik J.H., Meijer H.J.G., Tramper J., (1992). Kinetics of *Nitrosomonas europaea* at extreme substrate, product and salt concentrations. *Applied and Environmental Microbiology.* 37, 802–807.

Hunik JH. (1993). Engineering aspects of nitrification with immobilized cells. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.

Hunik JH, Tramper J, Wijffels RH. (1994). A strategy to scale up nitrification processes with immobilized cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Eng* 11:73–82.

Hynes R. K., Knowles R. (1983). Inhibition of chemoautotrophic nitrification by sodium chlorate and sodium chlorite: a reexamination. *Applied and Environmental Microbiology.* 45, 1178-1182.

## J

Jetten MSM, Horn SJ, van Loosdrecht MCM. (1997a). Towards a more sustainable wastewater treatment system. *Water Science and Technology.* 35, 171–179.

Jetten, M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., De Vries, S., Van Loosdrecht, M., Kuenen, J. G. (1997b). Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, 75-93.

Jetten MSM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, Udo van Dongen GJM, van de Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht MCM, Kuenen JG. (1999). The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Review.* 22, 421–437.

Jetten MSM, Schmid M, Schmidt I, Wubben M, van Dongen U, Abma W, *et al.* (2002). Improved nitrogen removal by application of new nitrogen cycle bacteria. *Review Environmental Science Biotechnology.* 1, 51–63.

Johnstone, B.H., Jones, R.D. (1988). Effects of light and CO on the survival of a marine ammonium-oxidizing bacterium during energy source deprivation. *Appl. Env. Microbiol.* 54 (12), 2890–2893.

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. *Proc. WEFTEC, San Diego.*

Juliette L.Y., Hyman M.R., Arp D.J. (1993). Inhibition of Ammonia Oxidation in *Nitrosomonas europaea* by Sulfur Compounds: Thioethers Are Oxidized to Sulfoxides by Ammonia Monooxygenase. *Applied and Environmental Microbiology.* 59 (11), 3718-3727.

Juretschko, S., G. Timmermann, M. Schmid, K.-H. Schleifer, A. Pommerening-Röser, H. P. Koops, and 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.

## K

Kaelin D., Manser R., Rieger L., Eugster J., Rottermann K., Siegrist H. (2009). Extension of ASM3 for two-step nitrification and denitrification and its calibration and validation with batch test and pilot scale data. *Water Research.* 43, 1680-1692.

Kalyuzhnyi, S., Gladchenko, M., Mulder, A., and Versprille, B. (2006). DEAMOX – New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled sulphide-driven conversion of nitrate to nitrite. *Water Research.* 40, 3637-3645.

Kampschreur MJ, van der Star WRL, Wienders HA, Mulder JW, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. (2008). Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during full-scale reject water treatment. *Water Research.* 42, 812-826.

Keller J, Subramaniam K, Gosswein J, Greenfield PF. (1997). Nutrient removal from industrial wastewater using single tank sequencing batch reactors. *Water Science and Technology.* 35, 137–144.

Khin T, Annachhatre AP. (2004). Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances.* 22, 519–532.

Kim JK, Park KJ, Cho KS, Nam S-W, Park T-J, Rakesh B. (2005). Aerobic nitrification- denitrification by heterotrophic *Bacillus* strains. *Bioresource Technology*. 96, 1897–1906.

Konuma, S., Satoh, H., Mino, T., Matsu, T. (2001). Comparison of enumeration methods of ammonia-oxidizing bacteria. *Water Science and Technology*. 43, 107-114.

Koops, H.-P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommerening-Röser, A., Stehr, G. (1991). Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.*137, 1689-1699.

Koops, H.-P., Pommerening-Röser, A. (2001). Distribution and ecophysiology of nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol. Ecol.*1255, 1-9.

Kuai, L., and Verstraete, W. (1998). Ammonium removal by oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(11), 4500-4506.

Krümmel, A., Harms, H. (1982). Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 133, 50-54.

## L

Landsberg, J.H. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish Sci.* 10, 113-390.

Langergraber, G., Rieger, L., Winkler, S., Alex, J., Wiese, J., Owerdieck, C., Ahnert, M., Simon, J., Maurer, M. (2004). A guideline for simulation studies of wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 50 (7), 131–138.

Lee H-J, J Bae JH, Cho KM. (2001). Simultaneous nitrification and denitrification in a mixed methanotrophic culture. *Biotechnology Letters*. 23, 935–941.

Li BK, Bishop P. (2004) .Micro-profiles of activated sludge floc determined using microelectrodes. *Water Research*. 38, 1248–1258.

Li, B., Irvin, S., Baker, K., (2006). The variation of nitrifying bacterial population sizes with DO and HRT in a sequencing batch reactor (SBR). In: IWA Conference Proceedings: "IWA World Water Congress and Exhibition," Beijing, 10–14.IX.2006.

Li DH, Ganczarczyk JJ. (1990). Structure of activated sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering*.11, 127–138.

Li DH, Ganczarczyk JJ. (1993). Factors affecting dispersion of activated sludge flocs. *Water Environmental Research*. 65, 258–263.

## M

Magrí A. (2007). Modelització del tractament biològic de la fracció líquida de purins orientat a l'eliminació de nitrogen. Tesis doctoral. Departament d'Enginyeria Agroforestal. Universitat de Lleida.

Magrí A., Corominas L., López H., Campos E., Balaguer M., Colprim J., Flotats X. (2007). A model for the simulation of the SHARON process: pH as a key factor. *Environmental Technology*. 28 (3), 255-265.

Magrí A., Sole-Mauri F., Colprim J., Flotats X. (2007a).Evaluation of the SHARON process (partial nitritation in a chemostat): using simulation. *Afinidad: Revista de química teórica y aplicada*.Vol. 64, Nº. 529,378-383.

Makinia J., Rosenwinkel K., Spering V. (2006). Comparison of two model concepts for simulation of nitrogen removal at a full-scale biological nutrient removal pilot plant. *Journal of Environmental Engineering*. 476-487.

Manahan, SE. (1992). *Toxicological chemistry*, 2nd edition. Lewis Publishers, Boca Raton (FL).

Manga J., Ferrer J., García-Usach F., Seco A. (2001) A modification to the Activated Sludge Model Nº 2 based on the competition between phosphorusaccumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Science and Technology*. 43, (11) 161-171.

Mansch, R., Bock, E. (1998). Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation*. 9, 47-64.

- Manser, R., Gujer, W., Siegrist, H. (2005a). Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers. *Water Research* 39 (19), 4633–4642.
- Manser R. (2005). Population dynamics and kinetics of nitrifying bacteria in membrane and conventional activated sludge plant. Thesis. SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH.
- Martiny, H., Koops, H.-P. (1982). Incorporation of organic compounds into cell protein by lithotrophic ammonia oxidizing bacteria. *Ant. van Leeuwenhoek*. 48, 327-336.
- Matin, A. (1978). Organic nutrition of chemolithotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 32, 311-318.
- Matulewich, V. A., Strom, P. F., Finstein, M. S. (1975). Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Applied of Environmental Microbiology*. 29, 265-268.
- Maurer M, Gujer W. (1998). Dynamic modelling of enhanced biological phosphorus and nitrogen removal in activated sludge systems. *Water Science and Technology*, 38 (1), 203-210.
- Maurer, M., Abramovich, D., Siegrist, H. y Gujer, W. (1999) Kinetics of biologically induced phosphorus precipitation in waste-water treatment. *Water Research*, 33 (2), 484-493.
- McCaig, A. E., Philips, C. J., Stephen, J. R., Kowalchuk, G. A., Harvey, S.M., Herbert, R. A., Embley, T. M., Prosser, J. I. (1999). Nitrogen cycling and community structure of proteobacterial beta subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. *Applied of Environmental Microbiology*. 65, 213-220.
- Mckinney RE. (1962). Mathematics of complete mixing activated sludge. *ASCE Journal of Sanitary Engineering Division*. SA3, 87-113.
- Meincke, M., Krieg, E., Bock, E., (1989). Nitroso6ibrio sp., the dominant ammonia-oxidizing bacteria in building sandstone. *Applied of Environmental Microbiology*. 55 (8), 2108–2110.
- Merkel W., Krauth K. (1999). Mass transfer of carbon dioxide in anaerobic reactors under dynamic substrate loading conditions. *Water Research*. 33 (9), 2011–2020.
- Mertoglu B., Calli B., Inanc B., I. Ozturk. (2006). Evaluation of in situ ammonia removal in an aerated landfill bioreactor, *Process. Biochem.* 41, 2359–2366.
- 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 analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied of Environmental Microbiology*. 62, 2156-2162.
- Monod J. (1942). The sludge index. *Sewage Works Journal*. 6, 119-122.
- Moosbrugger R.E., Wentzel M.C., Ekama G.A., Marais G.V.R. (1992). Simple titration procedures to determine  $\text{H}_2\text{CO}_3^*$  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.*
- Mosey, F. (1983). Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science Technology*. 15, 209-232.
- Mosquera-Corral A, González F, Campos JL and Méndez R. (2005). Partial nitrification in a SHARON reactor in the presence of salts and organic carbon compounds. *Process Biochemistry*. 40, 3109–3118.
- Moussa M.S., Lubberding H.J., Hooijmans C.M., Van Loosdrecht M.C.M., Gijzen H.J. (2003). Improved method for determination of ammonia and nitrite oxidation activities in mixed bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 217-221.
- Moussa M.S., Hooijmans C.M., Lubberding H.J., Gijzen H.J., Van Loosdrecht M.C.M. (2005). Modelling nitrification, heterotrophic growth and predation in activated sludge. *Water Research*. 39, 5080-5098.
- Moussa M.S., Sumanasekera DU, Ibrahim SH, Hooijmans C.M., Lubberding H.J., Gijzen H.J., Van Loosdrecht M.C.M. (2006). Long term effects of salt on activity, population structure and floc characterization in enriched bacterial cultures of nitrifiers. *Water Research*. 40 (7), 1377-1388.

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

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. *Water Science and Technology*. 43 (11), 127-134.

Munch EV, Lant PA, Keiler J. (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Research*. 30, 277–284.

Münch, E.v.; Keller, J.; Lant, P.; Newell, R. (1999). Mathematical modelling of prefermenters - I. Model development and verification. *Wat. Res.* 33, (12), 2757-2768.

Musvoto E. V., Wentzel, M. C., Lowenthal, R. E. Ekama, G. A. (2000). Integrated chemical-physical processes modelling-I. Development of kinetic-based model for mixed weak acid/base systems. *Water Research*. 34 (6), 1857-1867.

## **N**

Neef, A., Amann, R. I., Schlesner, H., and Schleifer, K.-H. (1998). Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA targeted probes. *Microbiology*, 144, 3257-3266.

Negri, E. D.; Mata-Álvarez, J.; Sans, C.; Cecchi, F. (1993) A mathematical model of volatile fatty acids (VFA) production in a plug-flow reactor treating the organic fraction of municipal solid waste. *Water Science Technology*. 27, (2), 201-208.

Nold, S. C., Zhou, J., Devol, A. H., Tiedje, J. M. (2000). Pacific northwest marine sediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the  $\beta$ -subdivision of the Proteobacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 4532-4535.

Noophan P., Damrongsri M. (2005). Another Alternative Approach to Biological Nitrogen Removal (Anammox). *Thai Environmental Engineering Journal*. 19 (1), 1-15.

Nowak O, Svardal K, Schweighofer P. (1995). The dynamic behaviour of the nitrifying activated sludge systems influenced by inhibiting wastewater compounds. *Water Sci Technol* 31:115–124.

Nowak O., Franz A., Svardal K., Muller V., Kuhn V. (1999). Parameter estimation for activated sludge models with the help of mass balances. *Water Science and Technology*. 39, (4) 113–120.

## **O**

Okabe S, Satoh H., Watanabe Y. (1999). In situ analysis of nitrifying biomass as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7), 3182–3191.

Okabe S., Kindaichi T., Ito T., Satoh H. (2004). Analysis of size distribution and areal cell density of ammonia-oxidizing bacterial microcolonies in relation to substrate microprofiles in biofilms, *Biotechnol. Bioeng.* 85 (1), 86–95.

Olsen, G. J., and Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: A key to phylogeny. *FASEB J.* 7:113–23.

Oren A. (1999). Bioenergetics aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63, 334–348.

Orhon D., Okutman D. (2003). Respirometric assessment of residual organic matter for domestic wastewaters. *Enzyme Microbiology Technology*. 32, 560-566.

## **P**

Painter HA. (1986). Nitrification in the treatment of sewage and waste waters. *Nitrification*. Ed. IRL Press. 185-211.

Pambrun V., Paul E., Sperandio M. (2006). Modelling the partial nitrification in sequencing batch reactor for biomass adapted to high ammonia concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 95 (1), 120-131.

- Paredes D., Kuschik P., Mbvette T. S. A., Stange F., Muller R. A., Koser, H.(2007). New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment - a review. *Engineering of Life Sciences*, 7(1), 13-25.
- Patureau D, Godon JJ, Dabert P, Bouchez T, Bernet N, Delgenes JP, 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.
- Peng YZ, Chen T, Tian WJ. (2003). Nitrogen removal via nitrite at normal temperature in A/O process. *J Environ Sci Health Part A Toxic-Hazard Subst Environ Eng*. 39(7), 1667–1680.
- Peng YZ, Chen Y, Peng CY, Liu M, Wang SY, Song XQ, Cui YW. (2004a). Nitrite accumulation by aeration controlled in sequencing batch reactors treating domestic wastewater. *Water Science Technology*. 50(10), 35–43.
- Peng YZ, Zhu GB, Wang SY, Yu DS, Cui YW, Meng XS. (2006). Pilot-scale studies on biological treatment of hypersaline wastewater at low temperature. *Water Science and Technology*. 52, 10–11.
- Peng YZ, Zhu GB. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73(1), 15–26.
- Perez Cañestro JO. (2004). Aplicación de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* en forma de biopelícula para la nitrificación biológica en reactores de lecho fijo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Penya-Roja J. M. (1999). Eliminació biològica de nitrogen i fòsfor em estacions depuradores. Metodologia per al calibratge dels paràmetres del procés. Tesis doctoral, Facultat de Química, Universitat de València.
- Penya-Roja J.M., Seco A., Ferrer J., Serralta J. (2002). Calibration and validation of Activated Sludge Model No. 2d for Spanish municipal wastewater. *Environmental and Technology*. 23, 849-862.
- Picioreanu C, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. (1997). Modelling of the effect of oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Water Science and Technology*. 36, 147–156.
- Pinck, C., Coeur, C., Potier, P., and Bock, E. (2001). Polyclonal antibodies recognizing the AmoB protein of ammonia oxidizers of the  $\beta$ -subclass of the class Proteobacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 67, 118-124.
- Pirsing A. (1996) Reaktionstechnische Untersuchungen und mathematische Modellierung der Nitrifikation in hochbelasteten Abwässern; Diss. TU Berlin, Reihe 15: Umwelttechnik 156, VDI Verlag Düsseldorf.
- Pochana K, Keller J (1999) Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Science and Technology*. 39(6), 61–68.
- Pollard P.C. (2006). A quantitative measure of nitrifying bacterial growth. *Water Research*. 40, 1569-1576.
- Pollice A, Tandoi V, Lestingi C (2002) Influence of aeration and sludge retention time on ammonium oxidation to nitrite and nitrate. *Water Research*. 36(10), 2541–2546.
- Pommerening-Röser A, Rath G, Koops HP. (1996). Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*. 19, 344–351.
- Posso-Blandon L. (2005). Stimulation of nitrification by carbon dioxide in lab-scale activated sludge reactors. Thesis, Department of Civil and Environmental Engineering, College of Engineering, University of South Florida.
- Prosser JI. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol*. 30, 125-177.
- Purkhold U, Pommerening-Röser A, Juretschko S, Schmid MC, Koops HP, Wagner M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 5368–5382
- Pynaert, K., Smets, B., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S. D., and Verstraete, W. (2003). Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3626-3635.

## R

- Reichert P., Borchardt D., Henze M., Rauch W., Shanahna P., Somlyódy L., Vanrolleghem PA. (2001). River Water Quality Model N°1. Scientific and Technical Report N° 12. IWA Publishing, London, UK.
- Ribes, J. (2004). Modelació de sedimentadors en plantes de tractament d'aigües residuals. Aplicació al procés de fermentació-elutriació de fangs primaris. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Valencia.
- Rieger L., Koch G., Kuhni M., Mujer W., Siegrist H. (2001). The eawag Bio-P module for activated sludge model N° 3. *Water Research*. 35, (16) 3887-3903.
- Robertson LA, van Niel EWJ, Torresmans RAM, Kuenen JG (1988) Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 2812–2818.
- Robertson LA, Kuenen JG. (1984). Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology*. 139, 347–354.
- Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., and Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 4704-4712.
- Rysgaard S, Thastum P, Dalsgaard T, Christensen PB, Sloth NP. (1999). Effects of salinity on NH<sub>4</sub><sup>+</sup> adsorption capacity, nitrification, and denitrification in Danish estuarine sediments. *Estuaries*. 22, 21–30.

## S

- Salem S, Berends DHJG, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. (2003a). Bio-Augmentation by nitrification with return sludge. *Water Research*. 37(8), 1794–1804.
- Salem S, Berends DHJG, van der Roest HF, van der Kuy RJ, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. (2003b). Full-scale application of the BABE process. IWA conference. Praha, September.
- Salem S., Moussa M.S., van Loosdrecht M.C.M. (2006). Determination of the decay rate of nitrifying bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 94(2): 252-262.
- Sanchez O, Marti MC, Aspe E, Roeckel M. (2001). Nitrification rates in a saline medium at different dissolved oxygen concentrations. *Biotechnol Lett* 23:1597–1602.
- Sanden, B., Grunditz, C., Hansson, Y., Dalhammar, G. (1994). Quantification and characterisation of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* using monoclonal antibodies. *Water Science and Technology*. 29, 1-6.
- Satoh H, Nakamura Y, Ono H, Okabe S. (2003). Effect of oxygen concentration nitrification and denitrification in single activated sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering*. 83, 604–607.
- 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.
- Schindler, D.W. (1988). Effects of acid rain on freshwater ecosystems. *Science*. 239, 149-157.
- Schmid, M., Twachtmann, M., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, K. H., Schleifer, K.-H., and Wagner, M. (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol*. 23, 93-106.
- Schmidt SK, Alexander M, Shuler ML. (1985). Predicting threshold concentrations of organic substrates for bacterial growth. *Journal of Theoretical Biology*, 114, 1-8.
- Schmidt, I., and Bock, E. (1997). Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch. Microbiol.*, 167, 106-111.
- Schmidt, I., and Bock, E. (1998). Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. *Ant. van Leeuwenhoek*, 73, 271-278.

- Schramm A., de Beer D., Gieseke A., Amann R. (1999). Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospirae* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: Quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3690–3696.
- Schramm A, de Beer D, Gieseke A, Amann R. (2000). Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environmental Microbiology*. 2, 680–686.
- Seco A., Ribes J., Serralta J., Ferrer J. (2004). Biological Nutrient Removal Model Nº 1 (BNRM1). *Water Science and Technology*. 50, (6) 69-78.
- 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., Ferrer J., Borrás J., Seco A. (2004). An extension of ASM2d including pH calculation. *Water Research*. 38 (19), 4029-4038.
- Siegrist, H., Reithaar, S., and Lais, P. (1998). Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium rich leachate without organic carbon. *Water Science and Technology*. 37(4-5), 589-591.
- Siegrist, H.; Vogt, D.; García-Heras, J.; Gujer W. (2002). Mathematical model for meso- and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. *Environ. Sci. Tech*. 36, 1113-1123.
- Sin G., Vanrolleghem P. A. (2006). Evolution of an ASM2d-like model structure due to operational changes of an SBR process. *Water Science and Technology*. 53 (12), 237-245.
- Sin G., Niville K., Bachis G., Jiang T., Nopens I., Van Hulle S., Vanrolleghem P. A. (2008). Nitrite effect on the phosphorus uptake activity of phosphate accumulating organisms (PAOs) in pilot-scale SBR and MBR reactors. *Water SA* 34, 249–260.
- Skjelkvale, B.L., Stoddard, J.L., Andersen, T. (2001). Trends in surface water acidification in Europe and North America (1989-1998). *Water Air Soil Pollut*. 130, 787-792.
- Sliekers, 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 Research*. 36, 2475-2482.
- Smith, V.H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. *Environ. Sci. Pollut. R*. 10, 126-139.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M. y Heijnen, J.J. (1994a) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 461-470.
- Smolders, G. J. F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M. C. M. y Heijnen, J. J. (1994b) Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 837-848.
- Smolders GJF. (1995). A structured metabolic model for the anaerobic and aerobic stoichiometry of the biological phosphorus removal process. *Biotechnology and Bioengineering*. 47, 277-287.
- Somville M. (1984). Use of nitrifying activity measurements for describing the effect of salinity on nitrification in the Scheldt estuary. *Applied Environmental Microbiology*. 47, 424–426.
- Spanjers H., Vanrolleghem P.A. (1995). Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Sci. Technol*. 31(2): 105-114.
- Sperandio M., Paul E. (2000) Estimation of wastewater, biodegradable COD fractions by combining respirometric experiments in various So/Xo ratios. *Wat Res*. 34, (4) 1233-1246.
- Stanley, P. M., Schmidt, E. L. (1981). Serological diversity of *Nitrobacter* spp. from soil and aquatic habitats. *Applied Environmental Microbiology*. 41, 846-849.
- Steinmüller, W., Bock, E. (1976). Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter. *Arch. Microbiol*. 108, 299-304.

Stephen JR, McCaig AE, Smith Z, Prosser JI, Embley TM. (1996). Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to  $\beta$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 62, 4147–4154.

Stephen JR, Kowalchuk GA, Bruns MAV, McCaig AE, Phillips CJ, Embley TM, Prosser JI. (1998). Analysis of  $\beta$ -subgroup proteobacterial ammonia-oxidizer populations in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analysis and hierarchical phylogenetic probing. *Applied Environmental Microbiology*. 64, 2958–2965

Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M. (1998b). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50, 589-596.

Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM. (1999a). Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied Environmental Microbiology*. 65, 3248–3250.

Strous, M., Fuerst, J., Kramer, E., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K., Webb, R., Kuenen, J. G., and Jetten, M. S. M. (1999b). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*. 400, 446-449.

Stüven, R., Vollmer, M., Bock, E. (1992). The impact of organic matter on nitric oxide formation by *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.*, 158, 439-443.

Stüven, R., and Bock, E. (2001). Nitrification and denitrification as a source for NO and NO<sub>2</sub> production in high-strength wastewater. *Water Research*. 35, 1905-1914.

Surmacz-Gorska J., Gernaey K., Demuyck C., Vanrolleghem P., Verstraete W. (1996). Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Research*. 30, 1228-1236.

Surmacz-Gorska J, Cichon A, Miksch K. (1997). Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification. *Water Science Technology*. 36(10), 73–78.

Suzuki, L., Dular, U., Kwok, S.C., (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *Journal of Bacteriology*. 120, 556–558.

Stehr, G., Böttcher, B., Dittberner, B., Rath, G., Koops, H.-P. (1995). The ammonia-oxidizing nitrifying population of the River Elbe estuary. *FEMS Microbiol. Ecol*. 17, 177-186.

## T

Takacs I, Patry GG, Nolasco D. (1991). A dynamic model of the clarification-thickening process. *Water Research*. 25 (10), 1263-1271.

Tam NFY, Wong YS, Leung G. (1992). Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrients by the nitrification denitrification process. *Water Research*. 26, 1229.

Tchobanoglous, G., F.L. Burton, and H.D. Stensel. (2003). *Metcalf & Eddy, Inc.'s Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*, 4th Edition. McGraw-Hill, Inc., New York. 1819 pp.

Temizer Oguz M. (2005). Investigation of nitrifying bacterial activities by monitoring nitrite oxidation, nitrate formation and carbon dioxide fixation during activated sludge treatment in the presence of metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 21 (1-2), 154-165.

Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., Stahl, D. A. (1994). Evolutionary relationship among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*. 176, 6623-6630.

Third, K. A., Paxman, J., Schmid, M., Strous, M., Jetten, M.S.M., Cord-Ruwisch, R. (2005a). Treatment of nitrogen-rich wastewater using partial nitrification and Anammox in the CANON process. *Water Science and Technology*, 52(4), 47-54.

Third, K. A., Paxman, J., Schmid, M., Strous, M., Jetten, M. S. M., and Cord-Ruwisch, R. (2005b). Enrichment of anammox from activated sludge and its application in the CANON process. *Microbial Ecology*. 49, 236-244.

Turk O, Mavinic DS. (1987). Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environmental Technology Letters*. 8, 419–426.

Turk O, Mavinic DS. (1989). Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Water Research*. 23(11), 1383–1388.

## V

- Vadivelu VM, Keller J, Yuan Z. (2007). Free ammonia and free nitrous acid inhibition on the anabolic and catabolic processes of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *Water Science and Technology*. 56 (7), 89-97.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1246-1251.
- Van de Graaf AA, Bruijn P, Robertson LA, Jetten MSM, Kuenen JG. (1996). Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidising micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology (UK)*. 142, 2187–2196.
- Van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M., and Kuenen, J. G. (1997). Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of <sup>15</sup>N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 143, 2415-2421.
- Van Dongen U, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM. (2001). The SHARON-ANAMMOX process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Science and Technology*. 44, 53–60.
- Van Hulle S.W.H., Volcke E.I.P., López-Teruel J., Donckels B., Van Loosdrecht M.C.M., Vanrolleghem P.A. (2004). Influence of temperature and pH on the kinetics of the SHARON nitrification process. 4<sup>th</sup> World Water Congress and Exhibition, IWA. Marrakech, Morocco. September, 19-24.
- Van Hulle S., Wyffels S., Boeckx P., Volcke E., Cleemput O., Vanrolleghem P., Verstraete W. (2004). Modeling and simulation of oxygen-limited partial nitrification in a membrane-assisted bioreactor (MBR). *Biotechnology and Bioengineering*. 86 (5), 531-542.
- Van Hulle S. (2005). Modelling, simulation and optimization of autotrophic nitrogen removal processes. Thesis, Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent.
- Van Hulle S., Van Den Broeck S., Maertens J., Villez K., Donckels B.M.R., Schelstraete G., Volcke E.I.P., Vanrolleghem P.A. (2005). Construction, start-up and operation of a continuously aerated laboratory-scale SHARON reactor in view of coupling with an Anammox reactor. *Water SA*. 31 (3), 327-334.
- 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. *Water Science and Technology*. 44 (1), 145-152.
- Van Loosdrecht M.C.M., Salem S. (2005). Biological treatment of sludge digester liquids. In: *Proceeding IWA Specialized Conference*. Krakow, Poland, September 19-21.
- Vanrolleghem, P.A., Insel, G., Petersen, B., Sin, G., De Pauw, D., Nopens, I., Weijers, S., Gernaey, K., (2003). A comprehensive model calibration procedure for activated sludge models. In: *Proceedings: WEFTEC 2003, 76<sup>th</sup> Annual Technical Exhibition and Conference*. October 11–15, 2003, Los Angeles, CA, USA.
- Verstraete, W., Philips, S. (1998). Nitrification-denitrification processes and technologies in the new context." *Environmental Pollution*. 102(S1), 717-726.
- Villaverde S, Garcia-Encina PA, Fdz-Polanco F. (1997). Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilm. *Water Research*. 31(5), 1180–1186.
- Volcke E. (2006). Modelling, analysis and control of partial nitrification in a SHARON reactor. Thesis. Department of Biotechnology. Delft University of Technology.
- Völsch, A., Nader, W. F., Geiss, H. K., Nebe, G., and Birr, C. (1990). Detection and analysis of two serotypes of ammonia-oxidizing bacteria in sewage plants by flow cytometry. *Applied Environmental Microbiology*. 140, 153-158.
- Voytek, M. A., Priscu, J. C., Ward, B. B. (1999). The distribution and relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria in lakes of the McMurdo Dry Valley, Antarctica. *Hydrobiology*. 401, 113-130.

Vredenberg L.H.J., Nielsen K., Potma A.A., Kristensen G.H., Sund C. (1997). Fluid bed biological nitrification and denitrification in high salinity wastewater. *Water Science and Technology*. 36. 93-100.

## W

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 wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*. 34 (1), 237-244.

Wagner, D., Spieck, E., Bock, E., Pfeiffer, E.-M. (2001). Microbial life in terrestrial permafrost: Methanogenesis and nitrification in gelsols as potentials for exobiological processes. In G. Horneck and C. Baumstark-Khan (Eds.), *Astrobiology - the quest for the conditions of life* (pp. 143-159). Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Ward B.B., Martino D.P., Diaz M.C., Joye S.B. (2000) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 2873-2881.

Watson, S.W. (1971). Taxonomic considerations of the family Nitrobacteraceae Buchanan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21 (3), 254-270.

Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W., Waterbury, J.B., Schlosser, U. (1986). *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: A chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch. Microbiol.* 144, 1-7.

Watson, S. W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.-P., and Hooper, A. B. (1989). Nitrifying bacteria. In J. T.

WEF, ASCE. (1992). Design of municipal wastewater treatment plants. Volume 2. Water Environment Federation, 601 Wythe Street, Alexandria.

WEF y ASCE. (1998). Design of municipal wastewater treatment plants. Volume 2. Liquid treatment processes. ASCE manuals and reports on engineering practice nº 76, WEF manual of practice nº 8, American Society of Civil Engineers and Water Environment Federation, Alexandria.

Wentzel M.C., Loewenthal R.E., Ekama G.A., Marais G.v.R. (1988). Enhanced polyphosphate organism culture in activated sludge systems. Part I: Enhanced culture development. *Water SA*. 14 (2), 81-92.

Wentzel M.C., Lotter L.H., Ekama G.A., Marais G.v.R. (1989a). Enhanced polyphosphate organism culture in activated sludge systems. Part III: Kinetic model. *Water SA*. 15, 89-102.

Wentzel M.C., Dold P.L., Ekama G.A., Marais G.v.R. (1989b). Enhanced polyphosphate organism culture in activated sludge systems. Part II: Experimental behavior. *Water SA*. 15 (2), 71-88.

Wentzel, M. C., G. A. Ekama, P. L. Dold, and G. v. R. Marais. (1990). Biological excess phosphorus removal — steady state process design. *Water SA*. 16, 1, 29-48.

Wett B., Rauch W. (2003). The role of inorganic carbon limitation in biological nitrogen removal of extremely ammonia concentrated wastewater. *Water Research*. 37, 1100-1110.

Wetzel, R.G. (2001). *Limnology*, 3rd edition. Academic Press, New York.

Wiesmann, U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Ed. Springer Berlin, New York. 51, 113-154.

Woese, C. R., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Hahn, C. M., Tanner, R. S., Krieg, N. R., Koops, H.-P., Harms, H., Stackebrandt, E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: The beta subdivision. *Syst. Applied of Microbiology*. 5, 327-336.

Woese, C. R., Weisburg, W. G., Hahn, C. M., Paster, B. J., Zablen, L. B., Lewis, B. J., Macke, T. J., Ludwig, W., Stackebrandt, E. (1985). The phylogeny of purple bacteria: The gamma subdivision. *Syst. Applied of Microbiology*. 6, 25-33.

Wood, P. M. (1988). Monooxygenase and free radical mechanisms for biological ammonia oxidation. In J. A. Cole and S. Ferguson (Eds.). *The nitrogen and sulphur cycles* (pp. 217-243). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Wyffels S, Pynaert K, Boeckx P, Verstraete W, Van Cleemput O. (2003). Identification and quantification of nitrogen removal in a rotating biological contactor by <sup>15</sup>N tracer techniques. *Water Research*. 37, 1252-1259.

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. *Water Science and Technology*. 49(5-6), 57–64.

Wyffels S, van Hulle SWH, Boeckx P, Volcke EIP, van Cleemput O, van Rollegem PA, Verstraete W. (2004b). Modelling and simulation of oxygen-limited partial nitritation in a membrane-assisted bioreactor (MBR). *Biotechnology and Bioengineering*. 86, 531–542.

## Y

Yoo H, Ann K-H, Lee H-J, Lee K-H, Kwak Y-J, Song K-G (1999) Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Water Research*. 33(1), 145–154.

## Z

Zart, D, Bock, E. (1998). High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO<sub>2</sub> or NO. *Arch. Microbiol.*, 169, 282-286.

Zhang DJ, Lu PL, Long TR, Verstraete W. (2005). The integration of methanogenesis with simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor. *Process Biochemical*. 40, 541–547.

Zheng P, Xu XL, Hu BL. (2004). *Novel Theories and Technologies of Biological Nitrogen Removal*. Science Press, Beijing.

Zhu GB, Peng YZ, Li B, Guo J, Yang Q, Wang SY. (2008). Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev Environ Contam Toxicol*. 192, 159-195.

Zilverentant A. (1999). *Process for the treatment of wastewater containing specific components e.g. ammonia*. Netherlands. DHV.

Zwietering M.H., Koos J.T., Hasenack B.E., Witt J.C., Van't Riet K. (1991). Modelling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1094-1101.