



**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**ESTUDIO DE METANOGENÉISIS Y DESNITRIFICACIÓN  
SIMULTÁNEA EN UN REACTOR DE LECHO  
EXPANDIDO DE LODOS ANAEROBIOS GRANULARES  
(EGSB)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA**

**PRESENTA:**

**GUADALUPE LÓPEZ AVILÉS**

**HERMOSILLO, SONORA**

**DICIEMBRE DE 2012.**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

**Guadalupe López Avilés**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

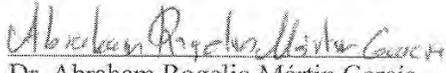
10/12/12  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia  
Presidente

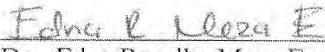
10/12/12  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Onofre Monge Amaya  
Secretario

10/12/12  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Abraham Rogelio Martín García  
Vocal

10/12/12  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Edna Rosalba Meza Escalante  
Sinodal Externo

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

## **AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO**

Diciembre de 2012.

Por la presente se hace constar que la estudiante Guadalupe López Avilés ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.



**DR. FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA**  
**COORDINADOR**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA**

## RESUMEN

Efluentes de diversas industrias, como las procesadoras de productos marinos contienen altos niveles de materia carbonada y nitrógeno. Una alternativa de tratamiento es combinar la digestión anaerobia y el proceso de reducción de nitrato en un solo reactor. El objetivo de este trabajo fue estudiar los procesos simultáneos de metanogénesis y desnitrificación en un reactor de lecho expandido de lodos anaerobios granulares (EGSB). Las pruebas en lote se realizaron para conocer las actividades metanogénicas y desnitrificantes de los lodos anaerobios, para lo cual se utilizaron botellas serológicas de 120 mL adicionadas con 2 g/L de biomasa a una temperatura de incubación de 30 °C. Posteriormente los estudios en continuo se llevaron a cabo en un reactor de 3 L con un flujo de alimentación de 3 L/d, velocidades ascensionales de 3 a 7 m/h y temperatura de 30 °C. Se estudiaron diferentes relaciones C/N en sistemas en lote y en continuo, donde se mantuvo constante la fuente de carbono y se varió el nitrógeno. Los ensayos en lote demostraron la degradación simultánea de la materia carbonada y de nitrógeno, con actividades de 0.21 gDQO-CH<sub>4</sub>/gSSV·d y 0.33 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/gSSV·d respectivamente. Además se obtuvo una concentración inhibitoria de la actividad metanogénica de 0.75 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. En los estudios en continuo la remoción de la materia carbonada se mantuvo por arriba del 90 %, durante los 177 días del experimento. Para el caso del nitrógeno, la remoción fue superior al 90 %, cuando el carbono se mantuvo en concentraciones superiores a la estequiométrica (C/N>1), mientras que, en la relación C/N de 1, la eliminación de nitrato fue del 60 %, causando la acumulación de nitrito. Por otro lado, el aumento en la concentración de nitrato causó un cambio en la distribución de la biomasa, provocando una disminución de tamaño de los gránulos anaerobios. En conclusión, las altas remociones de nitrato y materia carbonada obtenidas en este estudio demuestran la factibilidad de utilizar reactores de alta tasa (EGSB) para el tratamiento de aguas residuales como las de industrias pesqueras.

## ABSTRACT

Effluents of industries such as seafood processing contain high levels of nitrogen and organic matter. An alternative for the wastewater treatment is to combine the anaerobic digestion and the nitrate reduction process in a single reactor. The aim of this work was to study the simultaneous methanogenesis and denitrification in an expanded granular sludge bed reactor (EGSB). First, batch tests were carried out to obtain methanogenic and denitrifying activities by using serological bottles of 120 mL added with 2 g/L of biomass and an incubation temperature of 30 ° C. During the continuous studies, a 3 L reactor was used with a feed flow of 3 L/d, upflow velocities from 3 to 7 m/h and temperature of 30 °C. Different C/N ratios were studied in batch and continuous systems, by keeping a constant carbon source. Batch tests demonstrated the simultaneous degradation of the organic matter and nitrogen, with activities of 0.21 gDQO-CH<sub>4</sub>/gSSV·d and 0.33 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/gSSV·d respectively. Besides, the methanogenic activity presented an inhibitory concentration of 0.75 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L. In the continuous studies the removal of organic matter remained above 90% throughout the 177 days of the experiment. Nitrogen removals were over 90%, when C/N ratios were greater than the stoichiometric (C/N>1), whereas in the ratio C/N=1 nitrogen removal was 60%, causing the accumulation of nitrite. On the other hand, the increase of nitrate concentration changed the biomass distribution, which caused a decrease in the size of the anaerobic granules. In conclusion, the high nitrate and organic matter removals obtained in this study demonstrate the feasibility of using high rate reactors (EGSB) for fisheries wastewater treatment.

## **DEDICATORIA**

Con mucho cariño a mis padres  
Antonio López Grijalva y Guadalupe Avilés Moreno.

## TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS .....	xii
GLOSARIO DE TÉRMINOS .....	xiii
AGRADECIMIENTOS .....	xiv
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1    Introducción .....	1
1.2    Objetivos .....	3
1.2.1    Objetivo general.....	3
1.2.2    Objetivos particulares .....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1    Métodos de Tratamiento de Aguas Residuales .....	4
2.2    Digestión Anaerobia.....	6
2.2.1    Hidrólisis y acidogénesis .....	7
2.2.2    Acetogénesis .....	9
2.2.3    Metanogénesis .....	9
2.3    Eliminación de Nitrógeno de las Aguas Residuales .....	13
2.3.1    Ciclo del nitrógeno.....	14
2.3.2    Métodos fisicoquímicos para eliminar nitrógeno .....	16
2.3.3    Métodos biológicos para eliminar nitrógeno .....	16
2.3.4    Desnitrificación.....	17
2.4    Interacción de Metanogénesis y Desnitrificación Simultánea. ....	20
2.5    Tipos de Reactores Empleados en el Tratamiento de Aguas Residuales.....	25
2.5.1    Biorreactores de alta tasa .....	26
2.5.2    Reactor EGSB.....	28

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1 Estudios en Lote.....	30
3.1.1 Actividad metanogénica específica (AME).....	30
3.1.2 Actividad desnitrificante específica (ADE).....	34
3.2 Estudios en Continuo .....	35
3.2.1 Reactor EGSB.....	35
3.2.2 Arranque y aclimatación a condiciones metanogénicas .....	35
3.2.3 Proceso simultáneo de metanogénesis y desnitrificación en el reactor .....	37
3.3 Métodos Analíticos .....	41
3.3.1 Medición del pH .....	41
3.3.2 Relación de alcalinidad.....	41
3.3.3 Demanda química de oxígeno (DQO) .....	41
3.3.4 Determinación de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) .....	42
3.3.5 Determinación de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ).....	42
3.3.6 Sólidos suspendidos.....	42
3.3.7 Determinación de biogás .....	43
3.3.8 Granulometría .....	44
3.4 Procesamiento de Datos Experimentales .....	45
3.4.1 Balance de materia del reactor EGSB.....	45
3.4.2 Balance de DQO .....	46
3.4.3 Eficiencia de remoción de DQO.....	47
3.4.4 Eficiencia de remoción de nitrógeno .....	47
3.4.5 Parámetros operacionales del reactor .....	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
4.1 Estudios en Lote.....	49
4.1.1 Efecto de la relación C/N en la actividad metanogénica específica .....	49
4.1.2 Actividad desnitrificante específica.....	53
4.1.3 Efecto de la relación C/N en los gránulos anaerobios .....	59
4.2 Estudios en Continuo .....	61

4.2.1	Arranque y aclimatación del reactor a condiciones metanogénicas .....	61
4.2.2	Proceso simultáneo de metanogénesis y desnitrificación en el reactor EGSB .....	66
4.2.3	Balance de materia del reactor .....	71
4.2.4	Competencia entre bacterias metanogénicas y desnitrificantes en el proceso en continuo .....	73
4.2.5	Efecto de la relación C/N en los gránulos del reactor EGSB .....	76
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	78
5.1	Conclusiones .....	78
5.2	Recomendaciones .....	79
ANEXOS	.....	80
Anexo A.	Curva de calibración para determinar DQO .....	80
Anexo B.	Curva de calibración para la técnica de nitrato .....	81
Anexo C.	Curva de calibración para la medición de nitrito .....	82
Anexo D.	Tablas de los resultados de la actividad metanogénica específica (AME) .	83
Anexo E.	Tablas de resultados de la actividad desnitrificante específica (ADE) .....	84
Anexo F.	Imágenes de la experimentación .....	85
BIBLIOGRAFÍA	.....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Proceso de la degradación anaerobia de la materia orgánica.....	8
2. Ciclo del nitrógeno .....	15
3. Etapas de la desnitrificación y enzimas involucradas .....	19
4. Proceso de la degradación anaerobia de la materia orgánica y el proceso de la reducción de nitrato simultáneamente . .....	21
5. Medición de biogás por desplazamiento de una solución de NaOH .....	32
6. Diseño experimental del reactor EGSB . .....	36
7. Diagrama del procedimiento para la etapa de metanogénesis y desnitrificación simultánea para el sistema en continuo.....	39
8. Producción de metano a diferentes relaciones C/N en los ensayos por lote.....	50
9. Efecto de la concentración de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en la actividad metanogénica específica experimental y teóricamente en los ensayos por lote. ....	51
10. Consumo de nitrato con diferentes relaciones C/N en las pruebas en lote.....	54
11. Efecto de la concentración de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) sobre la actividad desnitrificante específica. ....	55
12. Ecuación de Monod linealizada para el consumo de nitrato . ....	57
13. Producción de nitrito en las pruebas de desnitrificación por lote.....	58
14. Efecto de la relación C/N sobre los gránulos anaerobios en estudios en lote.....	60
15. Eficiencia de remoción de DQO en el reactor EGSB. ....	62
16. Relación de alcalinidad y pH del efluente en la etapa I de activación de lodo y etapa II de aclimatación metanogénica del reactor. ....	64
17. Producción de biogás en el reactor EGSB. Etapa I de activación de lodo y etapa II de aclimatación metanogénica. ....	65
18. Remoción de materia carbonada en el reactor EGSB en el proceso de desnitrificación y metanogénesis simultánea a diferentes relaciones C/N. ....	67

19.	Eficiencia de remoción de nitrógeno en el reactor durante las relaciones C/N 10, 7, 4, 3, 2 y 1.....	70
20.	Representación esquemática del balance de masa en el reactor para cada una de las relaciones C/N.....	72
21.	Competencia entre bacterias metanogénicas y desnitrificantes. ....	75
22.	Granulometría del lodo anaerobio realizado al inicio y al final del proceso de metanogénesis y desnitrificación simultánea.....	77
23.	Curva estándar de la demanda química de oxígeno. ....	80
24.	Curva estándar de la determinación de nitratos. ....	81
25.	Curva estándar de la determinación de nitritos. ....	82
26.	Botellas serológicas de las pruebas en lote.....	85
27.	Cinética metanogénica. ....	85
28.	Determinación de nitratos y nitritos por colorimetría.....	86
29.	Determinación de sólidos suspendidos volátiles. ....	86
30.	Reactor EGSB utilizado para las pruebas en continuo. ....	87

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Métodos de tratamiento según el contaminante en el agua residual. ....	5
2. Reacciones involucradas en cada una de las etapas de la digestión anaerobia. ....	12
3. Reacciones que ocurren en la metanogénesis y desnitrificación simultánea. ....	24
4. Antecedentes de sistemas con desnitrificación y metanogénesis simultánea. ....	27
5. Medio mineral para pruebas en lote. ....	31
6. Medio mineral para pruebas en continuo. ....	38
7. Medio mineral desnitrificante para pruebas en continuo. ....	40
8. Solución amortiguadora de fosfatos. ....	44
9. Condiciones de operación del reactor EGSB en la etapa de metanogénesis y desnitrificación simultánea. ....	68
10. Obtención de los parámetros del balance de sustrato en el reactor EGSB. ....	74
11. Curva estándar de la demanda química de oxígeno (DQO). ....	80
12. Curva estándar de nitrato. ....	81
13. Curva estándar de nitrito. ....	82
14. Valores de la AME obtenidos experimental y teóricamente. ....	83
15. Constantes obtenidas mediante la herramienta de cálculo de Solver en Excel. ....	83
16. Valores de la ADE experimental y del modelo de Monod. ....	84
17. Constantes obtenidas mediante la linealización del modelo de Monod. ....	84

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

### Símbolo

ADE	Actividad Desnitrificante Específica
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
AME	Actividad Metanogénica Específica
BD	Bacterias desnitrificantes
BM	Bacterias metanogénicas
C/N	Relación carbono/nitrógeno
D	Diámetro
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EGSB	Reactor de lecho expandido de lodos anaerobios granulares (Expanded Granular Sluged Bed)
F	Flujo de Alimentación
$\text{NH}_4^+$	Amonio
$\text{NO}_2^-$	Nitrito
$\text{NO}_3^-$	Nitrato
SF	Sólidos Fijos
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
ST	Sólidos Totales
TRH	Tiempo de Residencia Hidráulica
V	Volumen del Reactor
VCN	Velocidad de Carga de Nitrato
VCO	Velocidad de Carga Orgánica
$\alpha$	Relación de Alcalinidades

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme esperanza en los momentos difíciles.

A mis padres quienes han estado conmigo en todo momento, por su amor, amistad, apoyo y consejos. A ellos que me motivan a seguir adelante.

A mi director de tesis, el Dr. Fco. Javier Almendariz Tapia por sus acertados aportes, apoyo, comprensión, tiempo y paciencia, por compartir sus experiencias y sobre todo por su amistad.

A mi comité tutorial, la Dra. Onofre Monge, Dr. Abraham Martin, la Dra. Edna Meza, así como a la Dra. María Teresa Certucha, por sus valiosas sugerencias a este trabajo, sus consejos, su gran apoyo y amistad.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de biorremediación, Glenda, Karla, Gonzalo, por su apoyo, compañía y convivencia dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos por ayudarme a crecer y madurar como persona y por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles.

A la Universidad de Sonora y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo otorgado a través de la beca.

A mi familia y a todas aquellas personas que de cierta manera, colaboraron o me apoyaron en la realización de esta investigación.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 1.1 Introducción

El contaminante inorgánico más común identificado en agua es el nitrógeno, por lo que parte importante llega a los diferentes cuerpos de agua en forma de amonio, nitrato y nitrito, debido al aumento en las actividades agrícolas e industriales, creando problemas de toxicidad para los organismos acuáticos, además de cambios ambientales y problemas de salud (Cervantes, 2000).

Existen diversas industrias como la de explosivos, fertilizantes, celofán y producción de metales que desechan sus aguas con gran cantidad de este contaminante. En el procesamiento de alimentos, especialmente las industrias pesqueras, sus aguas residuales contienen altas concentraciones de nitrato como resultado de la digestión de las proteínas. Efluentes que se tienen que tratar para cumplir con las normas actuales de descarga de dicho parámetro (NOM-001-SEMARNAT-1993) y así eliminar toda contaminación que pueda ser nociva para los seres humanos, la flora y la fauna (Tugtas y col., 2009).

Existen métodos fisicoquímicos y biológicos para la eliminación de nitrógeno del agua. Los primeros no resuelven el problema, ya que trasladan el contaminante de un ambiente a otro. Los procesos biológicos, como la nitrificación y la desnitrificación, han constituido la forma más efectiva, sostenible y económicamente factible de eliminación de nitrógeno de las aguas, siempre y cuando exista suficiente cantidad de donadores de electrones (materia carbonada) para la desnitrificación biológica (Halling y col., 1993).

Al igual que el nitrógeno, la materia carbonada también se considera un contaminante, y la forma más convencional de tratarla es por métodos biológicos. Existen diversos tratamientos biológicos, pero el anaerobio es ampliamente utilizado en el tratamiento de

aguas residuales por ser menos costoso. El tratamiento anaerobio se caracteriza por la producción de biogás, formado por metano y dióxido de carbono y es susceptible de ser utilizado como combustible para la generación de energía (Tugtas y col., 2009).

Una alternativa para tratar los efluentes industriales con altos niveles de nitrato pero con insuficiente cantidad de donadores de electrones para la desnitrificación biológica, es combinar la digestión anaerobia y el proceso de reducción de nitrato (desnitrificación) en un solo reactor, esto resolvería el problema de la insuficiencia de donadores de electrones y permitiría la conversión de materia carbonada a energía (Tugtas y col., 2009).

Recientes investigaciones han demostrado que es posible mantener ambos procesos en un solo reactor, principalmente en el reactor de lecho expandido de lodos anaerobios granulares (EGSB), en el cual se puede remover la materia carbonada y el nitrato de manera simultánea. Actualmente se estudió el tratamiento biológico de efluentes generados en el aprovechamiento de los residuos de camarón y jaiba con un sistema integrado aerobio/anaerobio, donde se observó el proceso simultáneo y además fue posible reducir la cantidad de nitrato y materia orgánica (Plascencia, 2010) en un reactor EGSB acoplado a un reactor nitrificante, sin embargo, no se ha estudiado a profundidad el efecto de la composición del influente de este tipo de procesos en un sólo reactor para el tratamiento de aguas residuales con éstos contaminantes.

Por tal motivo, surgió la necesidad de investigar las condiciones óptimas de la relación carbono-nitrógeno (C/N) necesaria en el reactor EGSB para la remoción efectiva de nitrato y materia carbonada. Con esto se podría reducir de manera significativa el impacto ambiental negativo que tendrían estos efluentes al ser liberados sin un tratamiento previo.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

Estudiar los procesos simultáneos de metanogénesis y desnitrificación en un reactor de lecho expandido de lodos anaerobios granulares (EGSB).

### **1.2.2 Objetivos particulares**

- Estudiar la cinética de la relación carbono-nitrógeno (C/N) en las actividades metanogénicas y desnitrificantes de los lodos anaerobios en ensayos por lote.
- Arrancar y aclimatar el reactor EGSB a condiciones metanogénicas.
- Evaluar la relación C/N en el funcionamiento del reactor de lecho expandido de lodos anaerobios granulares.

## CAPÍTULO 2

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### **2.1 Métodos de Tratamiento de Aguas Residuales**

Dependiendo de las características del efluente y las regulaciones medioambientales se pueden considerar tres fases de tratamiento de las aguas residuales. El tratamiento primario involucra la separación del material insoluble y los sólidos suspendidos, neutralización y estabilización de la temperatura a través de métodos físicos o químicos o una combinación de ambos. La segunda fase, o el tratamiento secundario, involucran los métodos más complejos y normalmente requiere de tratamiento biológico para la remoción de la materia orgánica. El tratamiento terciario remueve compuestos selectivamente para obtener un efluente relativamente limpio (River y col., 1998).

Para la selección de un método de tratamiento de aguas residuales se deben tomar en cuenta las características de los efluentes, como: tipo y concentración de contaminantes, caudal, variación de caudal y condiciones climáticas. En la Tabla 1 se presentan algunos métodos de tratamiento según el contaminante. Esta información permite el diseño de la estrategia de manejo de efluentes que puede involucrar una reducción en la carga de contaminantes, reutilización de los desechos o escoger la mejor alternativa para tratar el efluente.

Los tratamientos biológicos constituyen una serie de procesos importantes de tratamiento que tienen en común la utilización de microorganismos (entre las que destacan las bacterias) para llevar a cabo la eliminación de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes. La aplicación tradicional consiste en la eliminación de materia orgánica biodegradable, tanto soluble como coloidal, así como la eliminación de compuestos que contienen elementos nutrientes (nitrógeno, fósforo). En la mayor parte de los casos, la materia orgánica constituye la fuente de energía y de carbono que necesitan los microorganismos para su crecimiento (Andalib y col., 2011).

**Tabla 1.** Métodos de tratamiento según el contaminante en el agua residual.

<b>Constituyente</b>	<b>Sistema de tratamiento</b>
Sólidos suspendidos	Filtración
	Flotación
	Sedimentación
	Tamizado y dilaceración
Compuestos orgánicos biodegradable	Proceso de lodos activados
	Lagunas
	Sistemas fisico-químicos
Compuestos orgánicos volátiles	Procesos naturales
	Arrastre por aire
	Tratamiento de gases
Patógenos	Adsorción con carbón activado
	Cloración
	Ozonización
Nitrógeno	Radiación UV
	Nitrificación-Desnitrificación
	Arrastre de amoníaco
	Intercambio iónico
Fósforo	Cloración al punto de quiebre
	Adición de sales metálicas
	Remoción biológica de fósforo
Materia orgánica refractaria	Remoción bioquímica de fósforo
	Coagulación con cal sedimentación
	Adsorción en carbón
Metales pesados	Ozonización terciaria
	Precipitación química
	Intercambio iónico

*Fuente: Crites y Tchobanoglous, 2000.*

Además, también es necesaria la presencia de nutrientes, que contengan los elementos esenciales para el crecimiento, especialmente los compuestos que contengan nitrógeno y fósforo. Puede ser del tipo anaeróbico y aeróbico o una combinación de ambos.

El tratamiento anaerobio es un proceso biológico ampliamente utilizado en el tratamiento de aguas residuales. Cuando éstas tienen una alta carga orgánica con concentraciones superiores a 3 g/L, se presenta como única alternativa frente al que sería un costoso tratamiento aerobio, debido al suministro de oxígeno, el cual es proporcional a la concentración del efluente. El tratamiento anaerobio se caracteriza por la producción de biogás, formado fundamentalmente por metano (60-80%) y dióxido de carbono (40-20%) y es susceptible de ser utilizado como combustible para la generación de energía térmica y/o eléctrica. Además, solo una pequeña parte de la materia orgánica tratada (5-10%) se utiliza para formar nuevas bacterias frente al 50-70% de un proceso aerobio (Cheremisinoff, 1996).

Los procesos anaeróbicos como la metanogénesis, desnitrificación y la sulfato reducción que se utilizan principalmente para el tratamiento de los desechos orgánicos de alta carga, han recibido una atención considerable en los últimos diez años (McCarty, 2001).

## **2.2 Digestión Anaerobia**

La digestión anaerobia es un proceso natural en el que una variedad de diferentes especies a partir de dos reinos biológicos totalmente diferentes, bacterias y arqueas, trabajan juntas para convertir los residuos orgánicos, a través de productos intermediarios, a gas metano (McCarty, 2001).

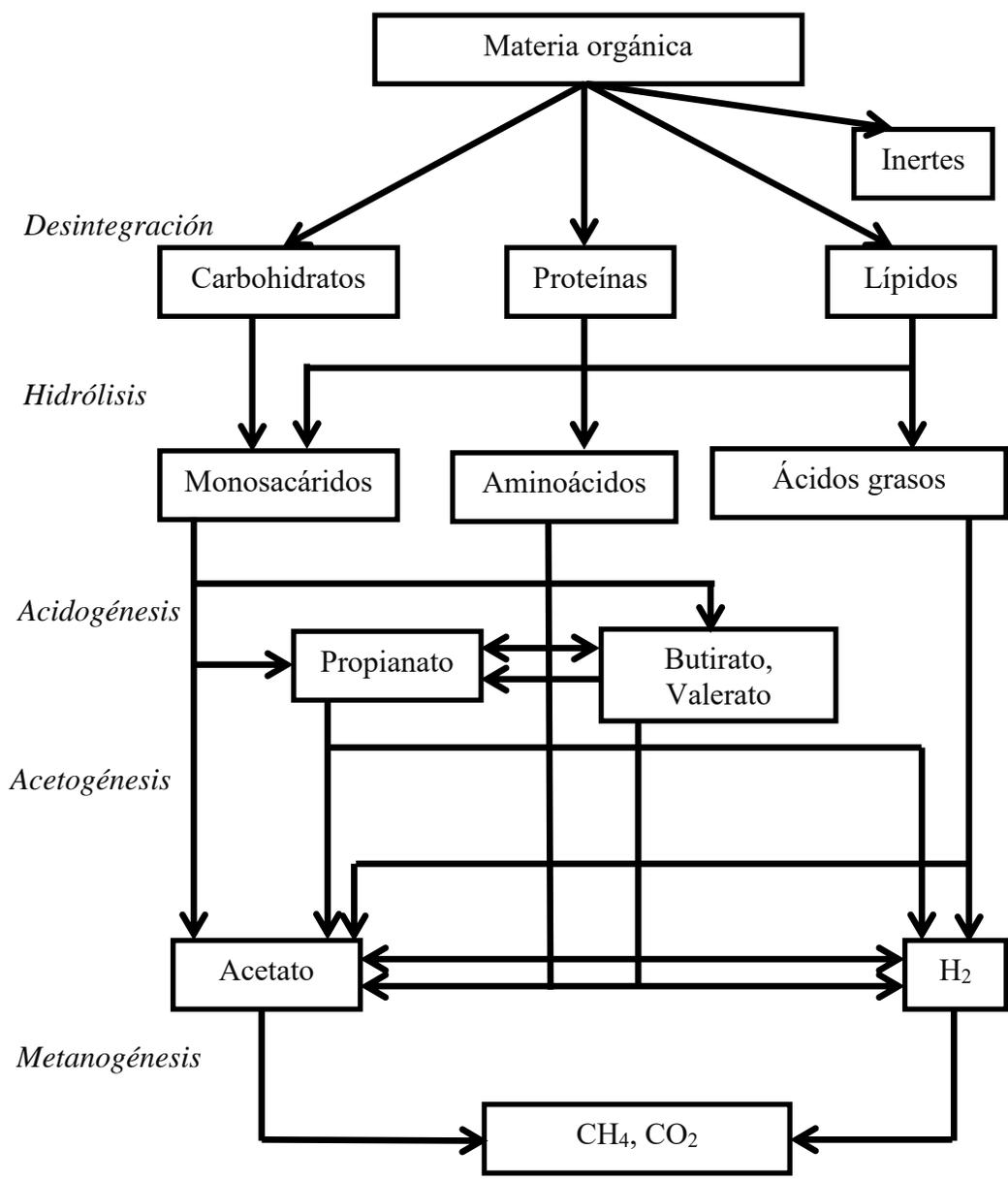
Los consorcios de microorganismos involucrados en la conversión global de la materia orgánica compleja a los compuestos de un solo carbono ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ), comienzan con las bacterias que hidrolizan la materia orgánica compleja (carbohidratos, proteínas y grasas) en monómeros simples, tales como carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos.

Los monómeros son luego utilizados por las bacterias fermentadoras que producen ácidos orgánicos e hidrógeno molecular como productos intermedios. Los ácidos orgánicos son entonces parcialmente oxidados por otras bacterias fermentadoras productoras de hidrógeno adicional y ácido acético que luego son utilizados por metanógenos y convertidos en metano (Rittmann y McCarty, 2001). Este procedimiento de degradación se desarrolla en tres etapas y ocurre secuencialmente con la participación de 5 grupos bacterianos principales. Las etapas son las siguientes: 1) Hidrólisis y acidogénesis, 2) Acetogénesis y 3) Metanogénesis (Figura 1).

En los procesos anaerobios el 90% de la energía contenida en la materia orgánica (medida como demanda química de oxígeno, DQO), es convertida en biogás y el 10% restante es asimilado por las células. Desde el punto de vista bioquímico, la baja producción celular haría al proceso anaerobio poco eficiente; sin embargo, en la práctica esta característica es una gran ventaja dado que se evita la necesidad de tratar importantes volúmenes de la biomasa generada antes de su disposición final. En ausencia de oxígeno disuelto, la presencia de nitratos o sulfatos en el agua residual a tratar y las condiciones de operación de los biorreactores son los principales factores que determinan la ruta a seguir durante la degradación de la materia orgánica. No obstante, la vía más interesante es la metanogénesis, ya que se obtiene metano como subproducto el cual puede ser utilizado como energético (Saval y Noyola, 1992).

### **2.2.1 Hidrólisis y acidogénesis**

En esta primera etapa se inicia el fenómeno de digestión anaerobia. Las bacterias responsables de esta etapa pertenecen a diferentes grupos y pueden ser anaerobias facultativas o estrictas. Las bacterias hidrolíticas producen las enzimas que se encargan de degradar los polímeros presentes en el agua residual (carbohidratos, proteínas y lípidos) convirtiéndolos a compuestos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, alcoholes, ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos.



**Figura 1.** Proceso de la degradación anaerobia de la materia orgánica (Batstone y col., 2002).

En estos ambientes anaerobios no existe un suministro adecuado de aceptores de electrones como  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  entre otros, por lo que las bacterias acidogénicas fermentan los compuestos simples como azúcares, aminoácidos y péptidos a alcoholes, ácidos orgánicos volátiles como el ácido acético, propiónico, butírico, láctico, valérico, ácido fórmico, etc., produciendo  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  (Madigan y col., 2004; Speece, 1996). Entre los géneros representativos involucrados en la hidrólisis y acidogénesis se encuentran *Clostridium*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Butyrovibrio*, *Propionibacterium*, *Raminococcus*, *Acetovirium celuloliticus*. En esta etapa, si no se controla bien el reactor puede ocurrir una desestabilización del proceso entero, dado que en caso de una sobrecarga, la hidrólisis de la materia orgánica provoca una sobreproducción de ácidos que va a acidificar exageradamente el medio y bajar el pH hasta niveles inhibitorios (Guyot, 1990).

### 2.2.2 Acetogénesis

Los compuestos provenientes de la fermentación son transformados hasta acetato (acetogénesis),  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  por bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA), tales como *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei* y *Syntrophomonas bryantii*, donde la oxidación anaerobia de ácidos grasos de cadena larga es realizada por *S. wolfei* mediante la  $\beta$ -oxidación. A través de este mecanismo la longitud de la cadena va disminuyendo, cuando los ácidos tienen números de carbonos pares darán como producto acetato, si el número es impar resultarán en propionato y acetato; cuando existe una ramificación esta es mantenida en el ácido producido. Para que estas reacciones sean favorables se requiere que las bacterias metanógenas hidrogenófilas remuevan el  $\text{H}_2$  producido, ya que las bacterias OHPA son inhibidas por este producto. Esta relación sintrófica recibe el nombre de transferencia interespecie de hidrógeno (Saval y Noyola, 1992).

### 2.2.3 Metanogénesis

La producción biológica de metano es llevada a cabo por un grupo de *Arqueobacterias* estrictamente anaerobias, llamado metanógenos (Zinder, 2003). En ambientes

anaerobios naturales, los metanógenos catalizan la etapa terminal de la degradación de materia orgánica a  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ .

El proceso de metanogénesis es llevado a cabo por dos vías diferentes dependiendo de los sustratos. Una vía empleada es la metanogénesis hidrogenotrófica, en la cual el  $\text{CO}_2$  es reducido a metano, utilizando  $\text{H}_2$  como donador de electrones. Dentro de las bacterias involucradas en este proceso se pueden mencionar principalmente a *Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanobrevibacter sp.* La otra ruta es la metanogénesis acetoclástica donde el acetato es reducido hasta metano y bióxido de carbono; aparentemente esta reducción está limitada al género *Methanosarcina*, entre las que se encuentran *M. barkeri*, *M. mazei*, *M. thermophila*, etc., y al género *Methanosaeta* (Thauer y col., 1989).

Los metanógenos requieren azufre y hierro, además de otros metales traza, tales como cobalto, níquel, zinc, tungsteno, manganeso, molibdeno, selenio, boro, que se necesitan como compuestos estimuladores para la metanogénesis. El sulfuro es también un nutriente requerido, y debe ser suministrado en concentraciones entre 0.001 y 1 mg sustrato / L con el fin de asegurar la estabilidad del proceso, el crecimiento microbiano óptimo y la producción de metano. Sin embargo, el sulfuro es también tóxico para los metanógenos, pero los niveles de inhibición dependerán de las especies metanogénicas, pH, temperatura y el tipo de sustrato utilizado (Speece, 1996).

Las bacterias metanogénicas se encuentran en ambientes de salinidad variable, de agua dulce a hipersalinos y en un amplio intervalo de temperaturas desde 2 °C a mayores de 100 °C. El pH óptimo para los metanógenos es alrededor de la neutralidad (Zinder, 2003). Sin embargo, hay metanógenos, que sobreviven en entornos extremos con valores de pH de 4 o inferiores (por ejemplo, la *Hidrogenotrófica Metanógeno Methanobacterium*) (Williams y Crawford, 1985).

Los metanógenos son estrictamente anaerobios, ya que requieren de un potencial de oxidación-reducción de por lo menos  $-0.3$  V con el fin de sobrevivir, que teóricamente corresponde a  $10.56$  moles  $O_2/L$  (Hungate, 1967).

En los digestores anaerobios, sedimentos y suelos, cerca de dos terceras partes del metano producido es a partir de acetato y el resto de  $H_2$  y  $CO_2$  (Boone, 1982; Lovley y Klug, 1982; Zinder y col., 1984).

Las bacterias metanogénicas compiten con otros tres principales grupos metabólicos por sus sustratos en hábitats naturales: bacterias sulfato reductoras, acetógenos y reductores de hierro.

La metanogénesis se lleva a cabo en ausencia de oxígeno o de otros aceptores de electrones. La adición o la presencia de otros aceptores de electrones energéticamente más favorables que el  $CO_2$ , tales como nitrato, sulfato,  $Mn^{+4}$  y  $Fe^{+3}$ , tiene como resultado una reducción de estos aceptores de electrones en lugar de la producción de metano (Klüber y Conrad, 1998).

En la Tabla 2 se presentan las principales reacciones estequiométricas involucradas en cada una de las etapas de la digestión anaerobia descritas anteriormente.

**Tabla 2.** Reacciones involucradas en cada una de las etapas de la digestión anaerobia.

Reacciones	$\Delta G$ (kJ/mol)
Hidrólisis y acidogénesis	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 4H_2 + 2H^+$	-215
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	-318.1
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 2H_2 + 3H^+$	-254.6
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2HCO_3^- + 2H^+$	-225.9
Acetogénesis	
$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + 3H_2 + H^+$	+76
$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2H_2 + H^+$	+48.1
$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow 2CH_3COO^- + 2H_2O + H^+$	-95
Metanogénesis	
$CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CO_2 + CH_4$	-36
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-131

*Fuente: Castilla, 2006.*

### **2.3 Eliminación de Nitrógeno de las Aguas Residuales**

El nitrógeno puede encontrarse en el agua en tres maneras diferentes: como gas disuelto, en combinaciones inorgánicas y en combinaciones orgánicas. El nitrato, nitrito y el ion amonio son formas inorgánicas de nitrógeno que pueden existir en numerosos estados de oxidación donde la interconversión de estos estados es predominantemente biológica.

La presencia de nitratos y nitritos en el ambiente se da de manera natural; sin embargo, las actividades humanas modifican sus concentraciones y pueden hacer que estos compuestos sean potencialmente peligrosos debido a la toxicidad que presenta para la salud humana, los organismos acuáticos, así como problemas de eutroficación de ríos y lagos (Mulder y col. 1995).

Los nitratos en el suelo y en las aguas se originan de la descomposición natural por microorganismos de materiales nitrogenados orgánicos como las proteínas de las plantas, animales y sus excretas. Las fuentes ambientales más importantes son el uso de fertilizantes nitrogenados, la disposición de excretas y de desechos municipales e industriales. Aunque el nitrito es el compuesto tóxico, debido a que se forman a partir de los nitratos, un factor determinante en la incidencia de la toxicidad es la concentración de nitratos en el agua debido a que es la forma más estable en que puede encontrarse el nitrógeno y su presencia en concentraciones no deseables (mayor a 45 mg/L) es peligrosa en los sistemas acuíferos. El principal mecanismo de toxicidad de los nitritos en los seres humanos es la oxidación del ion ferroso a ion férrico, lo que puede producir metahemoglobinemia, efectos cardiovasculares y efectos respiratorios en la salud. Es por ello que la contaminación de las aguas por nitrógeno es un tema que ha tomado suma importancia y se han desarrollado e implementado metodologías para el control de los niveles de nitrógeno (Pacheco y col., 2002).

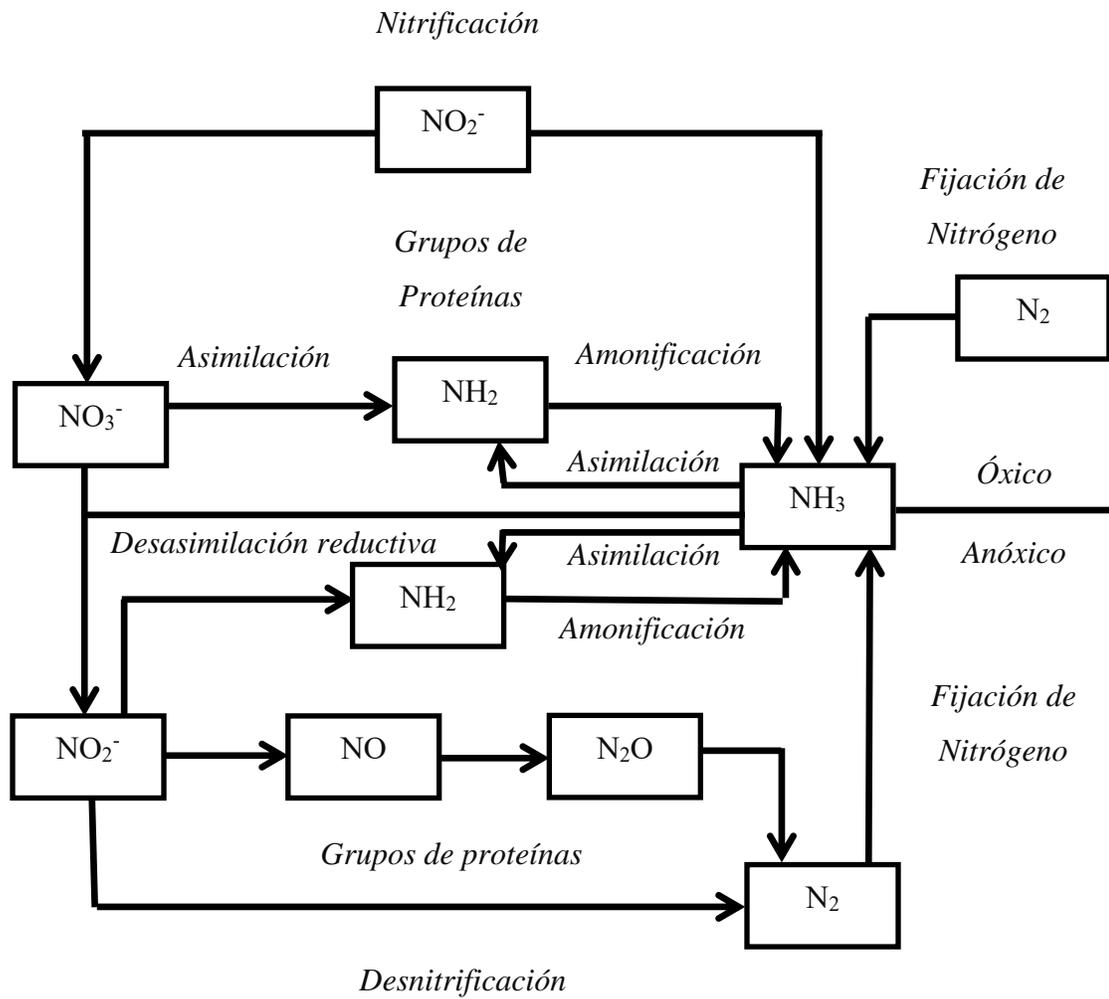
La remoción de nitrógeno puede ser llevada a cabo por métodos fisicoquímicos o biológicos, y este último es el más utilizado ya que es efectivo y de bajo costo debido a

que no se necesita la adición de reactivos para lograrlo (Cervantes y col., 2001; Khin y Annachhatre, 2004; Young-Ho, 2006).

### **2.3.1 Ciclo del nitrógeno**

En la Figura 2 se muestra el ciclo de este elemento que comienza con el proceso de fijación de nitrógeno molecular y es regresado a la atmósfera mediante el proceso de la desnitrificación. La fijación de nitrógeno molecular es realizada por procariontes aerobios y anaerobios y no tiene lugar en las eucariotas (Madigan y col., 2004). Aunque en menor grado también puede ocurrir químicamente en la atmósfera a través de descargas eléctricas o puede ser fijado industrialmente por el hombre, mediante el proceso de Haber. La fijación de nitrógeno tiene como producto la formación de amonio, compuesto nitrogenado más abundante en las aguas residuales, el cual es incorporado a la materia orgánica en forma de amina. La descomposición de la materia orgánica conduce a la formación de amonio por el proceso de amonificación. El amonio, a su vez, puede retornar a formas orgánicas o puede ser oxidado por microorganismos aerobios para formar nitrato (nitrificación). El nitrógeno en forma de nitrato, puede ser asimilado por los microorganismos o ser reducido mediante dos formas desasimilativas. Una vía ocurre mediante la reducción desasimilativa de nitrato a amonio y la otra, que es realizada por bacterias desnitrificantes, implica la reducción de nitrato hasta nitrógeno molecular, cerrando de esta forma el ciclo (Prescott y col., 1999).

Mediante este ciclo, los microorganismos establecen el equilibrio de los compuestos nitrogenados presentes en el ambiente y a su vez obtienen la energía necesaria para llevar a cabo sus necesidades metabólicas. Sin embargo, la alteración del ciclo puede provocar la acumulación de distintos intermediarios nitrogenados que traen como resultado, efectos nocivos para la salud y el medio ambiente. Al respecto, se estima que en los últimos cien años, la actividad humana ha duplicado la cantidad de nitrógeno presente en el globo terrestre. En consecuencia, el nitrógeno en sus distintas formas ha contribuido a la contaminación atmosférica, de suelos y de cuerpos de agua (Martínez-Hernández, 2003).



**Figura 2.** Ciclo del nitrógeno  
(Madigan y col., 2004).

### **2.3.2 Métodos fisicoquímicos para eliminar nitrógeno**

Los principales procesos fisicoquímicos utilizados para la eliminación de nitrógeno en aguas residuales son: el arrastre con aire donde, el nitrógeno es removido por la volatilización del gas amoníaco, el rompimiento por cloración, que implica la adición de cloro a las aguas residuales para oxidar el nitrógeno disuelto en forma de amonio hasta nitrógeno molecular y el intercambio selectivo de iones donde, se pueden emplear resinas sintéticas o naturales como la zeolita y cuando los sitios de intercambio han sido saturados, la resina debe regenerarse por la adición de algunos productos químicos. (Weston, 1984. Metcalf y Eddy, 1991). Sin embargo, su uso es limitado por sus altos costos y por los problemas de manejo y operación que se pueden presentar, además que sólo trasladan el contaminante de un lugar a otro.

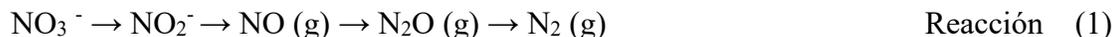
### **2.3.3 Métodos biológicos para eliminar nitrógeno**

El método biológico más utilizado para la remoción de nitrógeno es la nitrificación-desnitrificación (Zhang y col., 2007), el cual se realiza mediante dos etapas: una aerobia (nitrificación) en la que el amonio se oxida hasta nitrato y bajo condiciones anaerobias (desnitrificación), donde se lleva a cabo la reducción del nitrato hasta  $N_2$  (Kalyuzhnyi y col., 2006). Sin embargo, en la actualidad muchas investigaciones hacen referencia a diversas tecnologías biológicas novedosas para eliminar compuestos nitrogenados, los cuales utilizan las diversas vías del ciclo del nitrógeno para acortarlo, haciendo los procesos de tratamiento más eficaces y económicos desde el punto de costos de operación por requerimientos energéticos. Algunas de estas tecnologías son: la oxidación del nitrógeno en condiciones anaerobias (ANAMMOX), la cual consiste en la degradación de  $NH_4^+$  usando al nitrito como aceptor de electrones, presentando una reducción en la demanda de oxígeno y fuente de carbono del 50% y 100%, respectivamente (Fux y col., 2002; Dalsgaard y col., 2005). La desnitrificación-oxidación de amonio (DEAMOX), la cual no requiere de la producción separada de nitrito, además de combinar reacciones ANAMMOX y condiciones de desnitrificación autotrófica usando sulfato como donador de electrones para la generación de nitrito a partir del nitrato (Kalyuzhnyi y col., 2006).

La remoción de amonio en reactores simples productores de nitrito (SHARON), donde se desarrolla la nitrificación autotrófica y la desnitrificación heterotrófica mediante aireación intermitente, y la remoción autotrófica completa de amonio a nitrito (CANON), la cual involucra la combinación de reacciones de nitrificación parcial y ANAMMOX. En el proceso CANON, las bacterias nitrificantes oxidan el amonio a nitrito con el subsecuente consumo de oxígeno, creando así condiciones anóxicas permitiendo el proceso ANAMMOX (Young-Ho, 2006).

#### 2.3.4 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso anóxico secuencial realizado por diversos microorganismos heterotróficos facultativos: primero se reduce el nitrato a nitrito, posteriormente el nitrito se transforma a óxido nítrico, éste se reduce a óxido nitroso y por último el óxido nitroso se reduce a nitrógeno molecular, cerrando así el ciclo del nitrógeno. En la reacción 1 se muestran los intermediarios de la desnitrificación (Van Loosdrecht y Jetten, 1998; Cervantes y col., 2000; De Lucas A. y col., 2005).

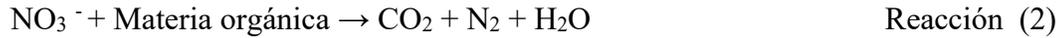


La desnitrificación puede ser llevada a cabo por una gran variedad de bacterias, entre algunos de los géneros que incluyen este tipo de microorganismos están: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Archromobacter*, *Thiobacillus* y *Bacillus*, entre otros. Estas bacterias son bioquímica y taxonómicamente muy diversas (Sorensen y Jorgensen, 1993).

La reducción de nitrato a nitrógeno molecular requiere de la presencia de una fuente de electrones. Algunas especies son fotosintéticas, como es el caso de *Rhodopseudomonas sphaeroides*, otras como *Thiobacillus desnitrificans* puede utilizar hidrógeno o compuestos reducidos de azufre como fuente de energía (litótrofos) y muchas otras pueden utilizar diversas fuentes orgánicas (organótrofos o heterótrofos). Entre las fuentes orgánicas que pueden consumir, se encuentra el glicerol, glucosa, ácidos grasos

volátiles, etanol, alcohol polivinílico, e incluso compuestos difíciles de oxidar como los derivados del petróleo (Martínez Hernández, 2003).

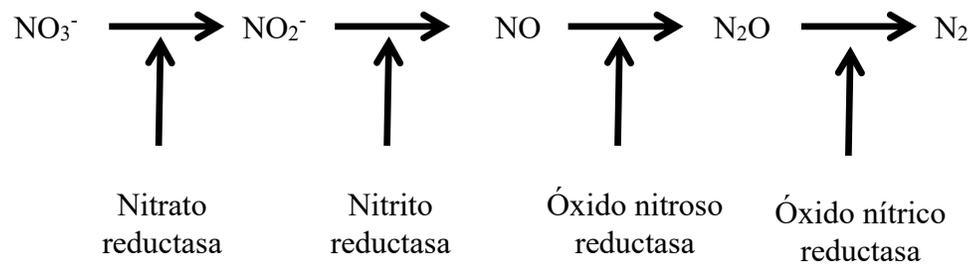
La reacción de la desnitrificación heterotrófica se presenta a continuación (Reyes, 2000).



Este proceso presenta una importante ventaja ya que permite transformar compuestos carbonados y nitrogenados de forma simultánea a compuestos inocuos como  $\text{CO}_2$  y  $\text{N}_2$ . Cada una de las etapas del proceso de desnitrificación mostradas en la reacción 1 son catalizadas por distintas enzimas (Zumft, 1997). Los mecanismos de acción son fuertemente regulados por la presencia de oxígeno y la concentración de sustrato. Estas etapas, así como las enzimas que intervienen en cada una de ellas, son esquematizadas en la Figura 3. Otros factores ambientales que también influyen en el desarrollo de un proceso desnitrificante eficaz, son: la relación C/N, la fuente de energía, el pH y la temperatura.

La relación C/N es un parámetro estequiométrico de suma importancia en la desnitrificación, se ha encontrado que esta puede orientar hacia un proceso desasimilativo desnitrificante, además de estar involucrado en la acumulación de intermediarios, o bien producir una ruta de desasimilación reductiva de nitrato a amonio (DNRA). Al respecto Cuervo López (2003), distingue tres niveles: 1) C/N menor a la estequiométrica, causa desnitrificación incompleta, 2) C/N estequiométrica, desnitrificación completa y 3) C/N mayor a la estequiométrica, desnitrificación completa y materia orgánica residual.

En lo que respecta a la fuente de carbono, esta tiene un efecto directo en las velocidades de desnitrificación, rendimientos, crecimiento de biomasa y la composición de la microflora.



**Figura 3.** Etapas de la desnitrificación y enzimas involucradas (Martínez-Hernández, 2003).

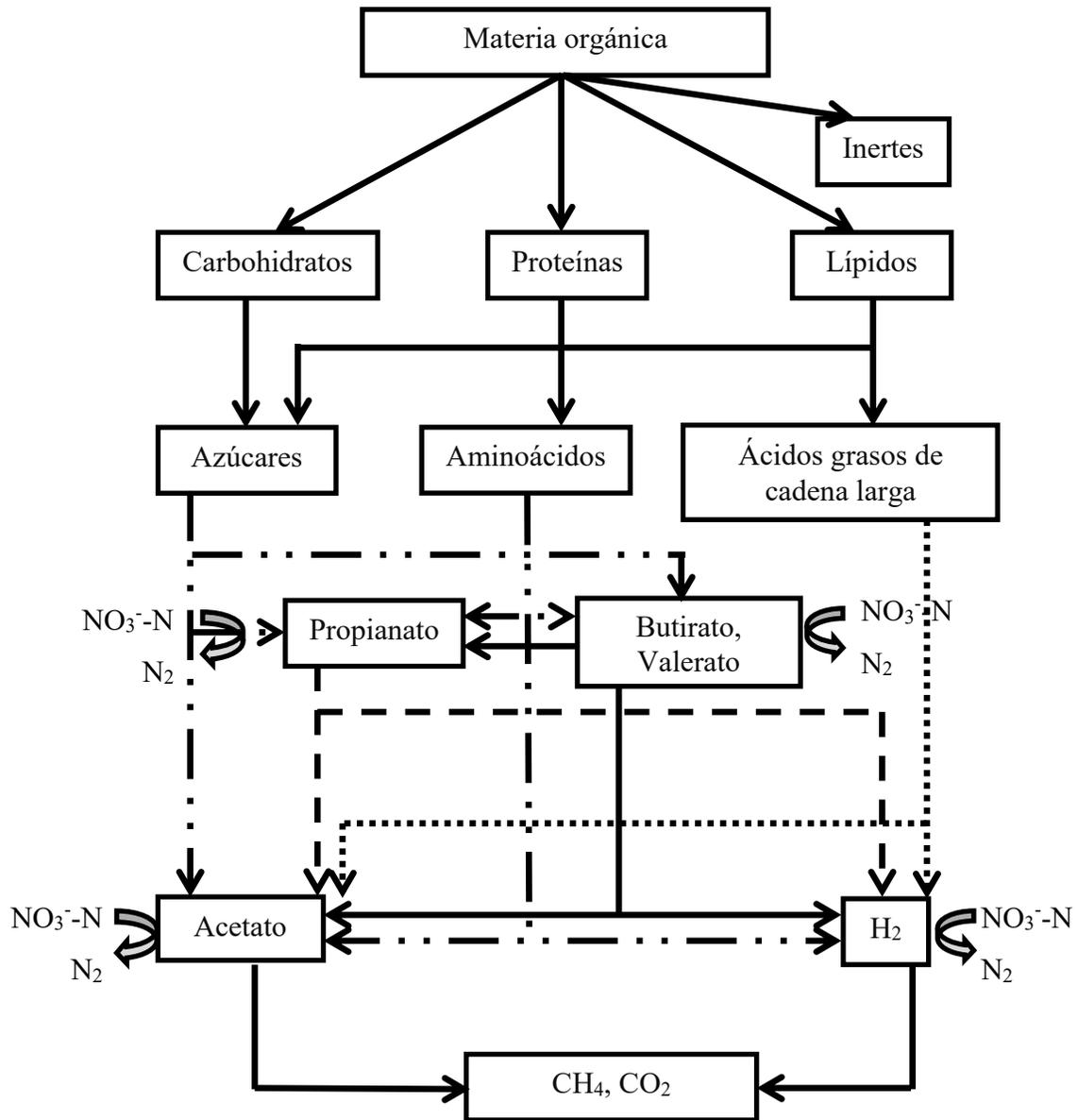
Lee y Welander (1996), encontraron que usando metanol y acetato se obtienen altos rendimientos desnitrificantes y bajo crecimiento de biomasa en comparación con otros sustratos. Por otro lado, utilizando acetato se obtuvieron mayores velocidades de crecimiento y desnitrificación que usando metanol.

Otro parámetro importante es el pH. Los organismos desnitrificantes pueden soportar pH entre 6 y 9, sin embargo el rango óptimo de pH reportado es de 7 a 8. El pH aumenta como resultado de la producción de iones  $\text{OH}^-$  durante la desnitrificación (Dincer y Kargi, 2000).

Respecto a la temperatura, se han observado velocidades de desnitrificación muy bajas y constantes a  $5^\circ\text{C}$ , mientras que a  $20^\circ\text{C}$  las velocidades son constantes y mayores, las temperaturas recomendables para mantener velocidades desnitrificantes adecuadas, oscilan entre  $20$  y  $35^\circ\text{C}$  (Cuervo López, 2003).

#### **2.4 Interacción de Metanogénesis y Desnitrificación Simultánea.**

En la digestión anaerobia, el carbono es eliminado a través de pasos secuenciales de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. Dependiendo del sustrato y de la etapa del proceso, las bacterias desnitrificantes pueden interactuar con estos pasos metanogénicos en un solo reactor o separados en una serie de reactores anaerobios. En el segundo caso, los productos de las primeras dos etapas de la hidrólisis y acidogénesis, puede ser usada como fuente de carbono biodegradable para la desnitrificación heterotrófica. Por otra parte, cuando los desnitrificantes y metanógenos están en el mismo hábitat, ellos parecen estar en competencia por la obtención de carbono (Figura 4). Sin embargo, según la literatura esa competencia por el sustrato no es el principal mecanismo de supresión de la metanogénesis. De hecho, la inhibición de la metanogénesis por los óxidos de nitrógeno ha sido reconocida como el principal mecanismo involucrado en su supresión (Banihani y col., 2009).



**Figura 4.** Proceso de la degradación anaerobia de la materia orgánica y el proceso de la reducción de nitrato simultáneamente. (Tugtas y col., 2010).

Los efectos inhibitorios de los compuestos nitrogenados sobre la metanogénesis son causados por varios mecanismos: (1) El efecto tóxico de los compuestos nitrogenados sobre miembros de la comunidad microbiana metanogénica; (2) la competencia entre desnitrificantes y metanógenos por el sustrato (3) la acumulación temporal del sulfato y  $\text{Fe}^{3+}$  producido durante la desnitrificación, la cual consecuentemente permite que los reductores de sulfato y  $\text{Fe}^{3+}$  se vuelvan activos y compitan por el sustrato con los metanógenos (Andalib y col., 2011).

Las ecuaciones estequiométricas pueden ser utilizadas para describir la relación molar entre productos y reactantes en el proceso de desnitrificación y metanogénesis simultánea. Rittmann y McCarty (2001) describe las ecuaciones estequiométricas basadas en principios termodinámicos y bioenergéticos, las cuales permiten la estimación de coeficientes de rendimiento y velocidades de consumo de sustrato. Las principales reacciones estequiométricas para este proceso simultáneo se describen y resumen en la Tabla 3.

El efecto inhibitorio de los óxidos de nitrógeno en la metanogénesis y otros parámetros importantes como la velocidad de carga orgánica y de nitrógeno, el potencial de oxidación-reducción, pH, relación C/N y la alcalinidad tiene efectos significativos en la velocidad de metanogénesis y desnitrificación simultánea (Andalib y col., 2011).

La naturaleza de la fuente de carbono y la relación carbono-nitrógeno (C/N) son parámetros importantes para la operación óptima de los sistemas de desnitrificación, tanto desde el punto de vista técnico como económico. La desnitrificación y la digestión anaerobia simultánea es posible cuando la fuente de carbono es fácilmente asimilada y cuando existe una relación C/N adecuada para evitar la inhibición metanogénica. Roy y Conrad (1999) reportan que en la desnitrificación y metanogénesis simultánea la supresión de la metanogénesis por el nitrato está relacionada por la relación entre el donador de electrones (DQO) y el aceptor de electrones (nitrato). Cuando la supresión es mínima, indica que el nitrato y sus intermediarios tóxicos como nitrito, NO y  $\text{N}_2\text{O}$ ,

fueron reducidos rápidamente a uno no tóxico, el  $N_2$ . Algunos investigadores sugieren que la naturaleza del sustrato en un lodo anaerobio impacta en las vías del nitrógeno. Se reporta que ácidos grasos volátiles, como el ácido acético es favorecedor de la desnitrificación, mientras que sustratos fermentativos como la glucosa y el glicerol prefirieron la amonificación. Akunna y col. (1992) mostraron que la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio tuvo lugar en la digestión anaerobia solo durante la acidificación y esa conversión de nitrato a amonio fue minimizada con fuentes de carbono orgánicas no fermentables, como los ácidos grasos volátiles.

De acuerdo con la última reacción de desnitrificación de la Tabla 3, para degradar 1 g de  $NO_3^-$ -N se requiere químicamente de 0.645 g de DQO. El actual requerimiento, sin embargo debe ser mayor que 0.645 g debido al DQO requerido para el crecimiento celular (Chen y Lin, 1993).

La alcalinidad tiene un rol vital en la digestión anaerobia y el pH en el cultivo microbiano. Shin y col. (2002) estudiaron el efecto de la alcalinidad en la relación de desnitrificación y amonificación en un sistema de desnitrificación y metanogénesis simultánea, concluyendo que la relación de desnitrificación/amonificación es función de la alcalinidad en lugar del tipo de sustrato utilizado como fuente de carbono. Es decir con baja alcalinidad en el sistema se lleva a cabo la amonificación y con una alta alcalinidad ocurre la desnitrificación.

El pH y la temperatura son reportados en la literatura como un importante parámetro que afecta el comportamiento de desnitrificantes y metanógenos en un proceso anaerobio. Chen y Lin (1993) examinaron la correlación entre desnitrificantes y metanógenos en un sistema de cultivo mixto de lodo de aguas residuales, con el principal enfoque en la competencia de sustrato entre organismos. Ellos notaron que las condiciones óptimas para desnitrificantes fueron pH entre 7 y 8 y temperaturas de 30 a 35 °C, mientras que para la metanogénesis el intervalo de pH fue de 6.5 a 7 y temperaturas de 30 a 35 °C.

**Tabla 3.** Reacciones que ocurren en la metanogénesis y desnitrificación simultánea.

Reacciones	$\Delta G$ (kJ/mol)
Metanogénesis	
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-131
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31
$4CH_3CH_2COO^- + 6H_2O \rightarrow 7CH_4 + CO_2 + 4HCO_3^-$	-57
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2$	-428
Desnitrificación	
$5H_2 + 2NO_3^- + 2H^+ \rightarrow 6H_2O + N_2$	-224
$5CH_3COO^- + 8NO_3^- + 8H^+ \rightarrow 9H_2O + 5CO_2 + 5HCO_3^- + 4N_2$	-797
$5CH_3CH_2COO^- + 14NO_3^- + 14H^+ \rightarrow 17H_2O + 10CO_2 + 5HCO_3^- + 7N_2$	-1398
$5C_6H_{12}O_6 + 24NO_3^- + 24H^+ \rightarrow 12N_2 + 30CO_2 + 42H_2O$	-2720
DNRA	
$4H_2 + 2NO_3^- + 4H^+ \rightarrow 6H_2O + 2NH_4^+$	-150
$CH_3COO^- + NO_3^- + 2H^+ \rightarrow CO_2 + HCO_3^- + NH_4^+$	-500
$8CH_3CH_2COO^- + 14NO_3^- + 28H^+ \rightarrow 2H_2O + 16CO_2 + 8HCO_3^- + 14NH_4^+$	-878
$8C_6H_{12}O_6 + 24NO_3^- + 48H^+ \rightarrow 12NH_4^+ + 48CO_2 + 12H_2O$	-1835
Deamonificación aerobia	
$NH_2OH + NO_2^- \rightarrow N_2O$	
Oxidación anóxica de amonio	
$NO_2^- + NH_4^+ \rightarrow NO$	
Oxidación anaerobia de amonio (ANAMMOX)	
$1.3NO_2^- + NH_3^+ \rightarrow 1.2N_2 + 0.26NO_3^- + 2H_2O$	-357

*Fuente: Andalib y col., 2011.*

## 2.5 Tipos de Reactores Empleados en el Tratamiento de Aguas Residuales

Los reactores se clasifican de acuerdo a la forma en que su biomasa es retenida con base a las propiedades de adhesión de las bacterias. De acuerdo a esto pueden ser divididos en dos grandes grupos: reactores de lecho libre o suspendido y reactores de lecho fijo. En los reactores de lecho fijo la biomasa es retenida formando biopelículas (estructuras complejas de células y polímeros extracelulares) sobre materiales inertes (acarreadores), estáticos o suspendidos. La biomasa también puede ser retenida por aislamiento u obstrucción de partículas biológicas sólidas como lodos suspendidos y granulares en materiales de empacado (Lettinga y col., 1980). Por otro lado, los reactores de lecho libre retienen su biomasa con la formación de partículas biológicas de gran densidad y sedimentabilidad llamadas gránulos.

El lodo granular metanogénico consiste de agregados microbianos con alta sedimentabilidad que se desarrollan por las uniones mutualistas de células bacterianas en la ausencia de un material acarreador o de soporte (Lettinga, 1995).

En la literatura, han sido reportados numerosos diseños de reactores aplicados para el proceso de metanogénesis y desnitrificación simultánea en el tratamiento de aguas residuales industriales. Entre estos reactores se encuentran reactores en lote (BR, batch reactors), reactores en lote secuenciales (SBR, sequencing batch reactors), reactores de tanque continuamente agitado (CSTR, continuously stirred tank reactors), reactores de contacto anaerobio (ACP, anaerobic contact processes), reactores anaerobios de placa deflectora (ABR, anaerobic baffled reactors), reactores de filtro anaerobio (AFR, anaerobic filter reactor), reactores de lecho fluidizado (FBR, fluidized-bed reactors), reactores de expansión de gas (GLR, gas lift reactors), biofiltro ascendente (UBF, upflow biofilter), filtro biológico aireado ascendente (UBAF, upflow biological aerated filter), filtro ascendente multi-alimentado (MUF, multi-fed upflow filter), biorreactor de lecho móvil (MBBR, moving bed bioreactor), reactor con recirculación (JLR jet loop reactor), reactor de lecho fijo (FFB fixed film bioreactor), reactor de biopelícula aerobio-anaerobio (AABR, anaerobic aerobic biofilm reactor), (BAS, biofilm airlift suspension),

reactor de placa deflectora de lodo anaerobio granular (AGBR, anaerobic baffled granular sludge bed reactor). También se han utilizado reactores anaerobios híbridos (AHR, anaerobic hybrid reactors), reactores de membrana (MBR, membrane bioreactors), reactores anaerobios de flujo ascendente (UASB, upflow anaerobic sludge blanket reactors) y más recientemente el reactor de lecho expandido de lodos anaerobios granulares (EGSB; Expanded Granular Sludge Bed). En la Tabla 4, se enuncian algunas de las investigaciones con los distintos tipos de reactores y diseños experimentales para el tratamiento de efluentes que contienen compuestos orgánicos y nitrogenados (Andalib y col., 2011).

### **2.5.1 Biorreactores de alta tasa**

El desarrollo del tratamiento anaerobio ha sido paralelo al desarrollo del tipo de reactor donde se lleva a cabo el proceso. Debido al bajo crecimiento de las bacterias metanogénicas y a la lentitud con la que llevan a cabo la formación de metano, es necesario desarrollar diseños en los que se consiga una alta concentración de microorganismos (SSV) en su interior si se quiere evitar utilizar reactores de gran tamaño. Para conseguirlo, habitualmente es necesario que el tiempo de retención hidráulico (TRH) sea inferior al tiempo de retención de sólidos y esto se puede hacer por distintos medios. Lo anterior resulta en la reducción del tamaño del reactor y en bajos requerimientos de energía del proceso. A todos estos reactores se les denomina de alta carga, dado que son los únicos que pueden tratar aguas con elevada carga orgánica de una forma viable.

La aplicación exitosa de la tecnología de la digestión anaerobia para el tratamiento de aguas residuales industriales depende críticamente del desarrollo y uso de biorreactores de alta tasa o velocidad. Los biorreactores de alta tasa incluyen a los reactores de lecho empacado, de lecho fluidizado, y los de lecho libre como el UASB y el EGSB. Estos biorreactores proporcionan una alta velocidad de reacción por unidad de volumen de reactor, lo cual reduce el volumen de reactor y finalmente permite la aplicación de altas velocidades de carga (Parawira, 2004).

**Tabla 4.** Antecedentes de sistemas con desnitrificación y metanogénesis simultánea.

<b>Proceso</b>	<b>Tipo de agua residual</b>	<b>COV (g DQO/L·d)</b>	<b>CON (g NO<sub>3</sub>/L·d)</b>	<b>C/N</b>	<b>Desnitrificación (%)</b>	<b>Metano- génesis (%)</b>	<b>Referencia</b>
EGSB	Destilería	0.38-3.91	0.03-0.84	4.9-19.5	92-100	92-97	Zhang, 2003
CSTR	Glucosa, nitrato	0.53	0.005-2.5	4-182	1-64	0-96	Akunna y col., 1992
CSTR-Acid.	Glucosa, nitrato	10	0.027-1	17-61	47-68	4-53	Rustrian y col., 1997
CSTR-Imm.	Metanol, nitrato	1.3-10	0.58-4.7	1.7-5.8	60-99.9	99	Chen y col. 1997
UBF	Industria de algodón	1-1.25	0.1-0.22	3.4-5	100	80	Mosquera, 2001
UBF+MBR	Glucosa	<7.5	<0.5	24.6-55.3	46	99	Ahn y col., 2007
ABR	Sucrosa, proteína	4.8	1.2	6.8	82-96	100	Barber y col., 2000
UASB-JLR	Sucrosa, peptona	0.59	0.068	14.6	86	92	Tai y col., 2006
UASB/MBR	Glucosa, ext. carne	0.4-0.5	0.16-0.19	6.8	83	98	An y col., 2008
UASB+AS	Porcícola pretratada	3.1	0.640	8.5	54-77	97	Huang y col., 2007
UASB+BR	Lixiviado de basura	12.5	1.7	12.4	81-93	70	Peng y col., 2008
UASB	Peptona, nitrato	7.5	0.075-7.5	1.7-170	0-98	0-96	Ruiz y col., 2006
SBR	Porcícola	0.5-2.5	0.25	17	85-91	81-91	Bernet y col., 2000

Fuente: Andalib y col., 2011.

### 2.5.2 Reactor EGSB

La generación más reciente de sistemas de tratamiento anaerobios de alta tasa es el reactor de lecho expandido de lodos anaerobios granulares (EGSB); el cual se ha hecho popular, principalmente debido a su muy alto potencial de carga en comparación con los reactores UASB convencionales (Lettinga, 2001).

Estudios en el diseño en reactores UASB con trazadores, demostraron que existen zonas muertas con mezclado deficiente, las cuales conllevan a una mala eficiencia en el tratamiento de aguas residuales. Una solución a este problema es el empleo de una recirculación del efluente combinada con el aumento en la altura del reactor, lo que dio inicio al desarrollo del reactor de lecho expandido de lodos granulares anaerobios (EGSB). En este tipo de reactor una velocidad ascensional mayor a 4 m/h causa que la cama de lodos se expanda mejorando el mezclado hidráulico obteniendo un mejor contacto agua residual-gránulo a su vez la recirculación del efluente diluye la concentración del influente lo que es propicio para el tratamiento de compuestos tóxicos (Kato, 1994).

Las ventajas del sistema EGSB son su espacio reducido y el manejo de velocidades de carga más elevadas en comparación con los sistemas UASB. Las cargas orgánicas pueden alcanzar valores de 20-40 g DQO/L · d, dependiendo del tipo de sistema y el agua residual a ser tratada (Van Lier y col., 2001). Uno de los problemas más serios asociados con los digestores expandidos durante la operación continua, es la inestabilidad de los conglomerados granulares. Esto también afecta a los reactores UASB, aunque en mucho menor grado. La pérdida de la biomasa puede ocurrir debido a los siguientes factores: desintegración del gránulo, lavado o arrastre fuera del reactor de gránulos huecos o que contienen gas en su centro, formación de gránulos esponjosos, y arrastre sobre precipitados inorgánicos (Parawira, 2004).

En el reactor EGSB el agua residual entra por la parte inferior del reactor y pasa a través del lecho de lodos granulares constituido por bacterias anaerobias. Estas bacterias crecen

formando gránulos con muy alta velocidad de sedimentación. En la cama de lodo se da la conversión de la materia orgánica a biogás. La alta velocidad ascensional hace que la cama de lodos se expanda.

La velocidad ascensional está dada por el flujo o gasto volumétrico de agua que pasa a través de la columna dividido por el área seccional del reactor y puede llegar a 10 m/h. La parte superior del reactor es más ancha con el fin de disminuir la velocidad ascensional para que la biomasa granular no salga del sistema. Del mismo modo, se utiliza el separador gas-sólido que recupera el gas y evita que los sólidos salgan con el efluente (Almendariz, 2005).

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Estudios en Lote

Los ensayos en lote se realizaron con el objetivo de estudiar la cinética de la relación carbono-nitrógeno (C/N) en las actividades metanogénicas y desnitrificantes de los lodos anaerobios.

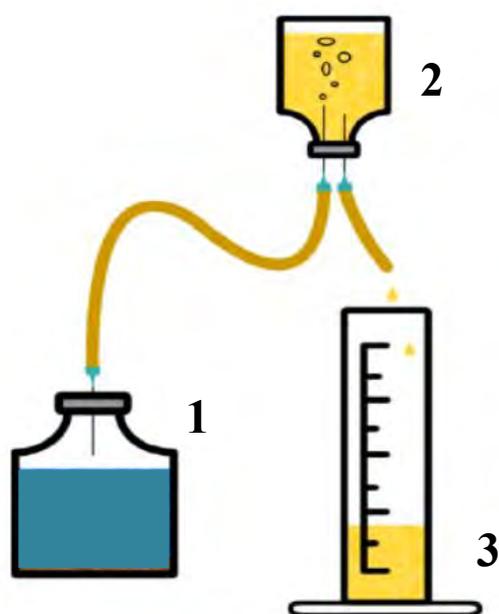
Estos estudios se llevaron a cabo por triplicado en botellas serológicas de 120 mL. Las cuales se prepararon con el medio mineral indicado en la Tabla 5, la concentración de biomasa y fuente de carbono se mantuvieron constantes en 2 g/L de sólidos suspendidos volátiles y glucosa respectivamente. Las condiciones de operación se realizaron variando la cantidad de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ -N) en el medio mineral para obtener relaciones C/N de 10, 7, 4, 3, 2 y 1. Las botellas se taparon con tapones de caucho y arillos de aluminio y la temperatura de incubación fue de 30 °C. El arreglo experimental para el monitoreo de producción de biogás fue en continuo por desplazamiento de una solución de hidróxido de sodio al 3% como se muestra en la Figura 5. Se monitoreó la producción de biogás, consumo de nitratos y producción de nitritos para determinar las actividades metanogénicas y desnitrificantes. Además se analizó el efecto que tienen estas concentraciones de nitrógeno sobre el tamaño de partícula de los gránulos, realizándose una granulometría en cada una de las pruebas.

##### 3.1.1 Actividad metanogénica específica (AME)

La actividad metanogénica específica ( $\text{AME} = \text{gDQO-CH}_4/\text{gSSV}\cdot\text{d}$ ) se define como la velocidad de producción de metano, expresado como DQO, con respecto a la concentración de biomasa expresada como el contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV) por día. Es una manera indirecta de evaluar el desempeño de bacterias que intervienen en la digestión anaerobia.

**Tabla 5.** Medio mineral para pruebas en lote.

Macronutrientes		<i>Solución de elementos traza</i>	
<b>Compuesto</b>	<b>mg/L</b>	<b>Compuesto</b>	<b>mg/L</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	703	FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	600	MnCl <sub>2</sub>	500
NH <sub>4</sub> Cl	205	EDTA	500
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	111	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	100
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
Extracto de levadura	20	ZnCl <sub>2</sub>	50
<i>Soln. de elementos traza</i>	1 ml/L	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
		AlCl <sub>3</sub>	50
		NiCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	50
		CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
		CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
		HCl concentrado	1 ml/L
		EDTA= Ácido etilendiaminotetracético	



**Figura 5.** Medición de biogás por desplazamiento de una solución de NaOH al 3%.

1) Botella serológica, 2) Tubo con solución de NaOH al 3%, 3) Probeta para medir NaOH.

El biogás cuantificado está compuesto por CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>, ya que el CO<sub>2</sub> y trazas de sulfuros quedaron atrapados en la solución de NaOH y sus proporciones fueron calculadas teóricamente de acuerdo a la reacción 3, con la cual podemos obtener el nitrógeno producido en base al nitrato consumido y mediante la ecuación 2 se calculó el metano.



Donde se pudo determinar la cantidad de moles producidos de N<sub>2</sub> por moles de nitrato consumido.

$$V_{N_2} = \frac{(n_{N_2})(0.082 \frac{atm \cdot L}{gmol \cdot ^\circ K})(303^\circ K)}{0.97 atm} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Entonces:

$$V_{CH_4} = V_{biogás} - V_{N_2} \quad \text{Ecuación (2)}$$

El volumen de metano producido se ajusto a condiciones de temperatura y presión estándar.

$$V_{STP}(mL) = V_P(mL) \times \frac{273^\circ K}{303^\circ K} \times \frac{0.97 atm}{1 atm} \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde:

$n_{N_2}$  = Moles de nitrógeno

$0.082 \frac{atm \cdot L}{gmol \cdot ^\circ K}$  = Constante de los gases

$303^\circ K$  = Temperatura del sistema

$0.97 atm$  = Presión de la ciudad de Hermosillo

$V_{STP}$  = Volumen de metano a condiciones de temperatura y presión estándar

$V_P$  = Volumen parcial de metano producido

La actividad metanogénica específica (AME) se calculó utilizando la ecuación 4, obteniendo la pendiente de metano producido respecto al tiempo, calculada en el intervalo de mayor velocidad de producción de metano.

$$AME = \frac{m}{\left(\frac{\gamma_{CH_4}}{DQO}\right)(X)} \quad \text{Ecuación (4)}$$

Donde:

$$m = \text{Pendiente} \left( \frac{L_{CH_4}}{d} \right) (STP)$$

$$X = \text{Biomasa} \left( \frac{g_{SSV}}{L} \right)$$

$$\frac{\gamma_{CH_4}}{DQO} = \text{coeficiente de conversión de metano} = 0.35 \frac{L_{CH_4}}{g_{DQO}}$$

### 3.1.2 Actividad desnitrificante específica (ADE)

La actividad desnitrificante ( $gNO_3\text{-N}/g_{SSV}\cdot d$ ) se define como la velocidad específica de consumo de nitrato con respecto a la biomasa.

El procedimiento que se llevó a cabo para su realización fue similar a la descrita en la sección 3.1.1, donde se tomaron muestras de 1 mL con jeringas desechables de cada botella para realizar las pruebas de consumo de nitrato y producción de nitrito. Cada botella fue una unidad experimental independiente, la cual fue sacrificada después de tomar muestras. Ésta actividad se obtuvo de la pendiente de la concentración de sustrato con respecto al tiempo, entre la concentración de biomasa. La pendiente se calculó en el intervalo de mayor velocidad de consumo (Ecuación 5).

$$ADE = \frac{m}{X} \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde:

$m$  =Pendiente de la curva de nitrato  $\left(\frac{gNO_3^-}{d}\right)$

$X$  =Biomasa  $\left(\frac{gSSV}{L}\right)$

### 3.2 Estudios en Continuo

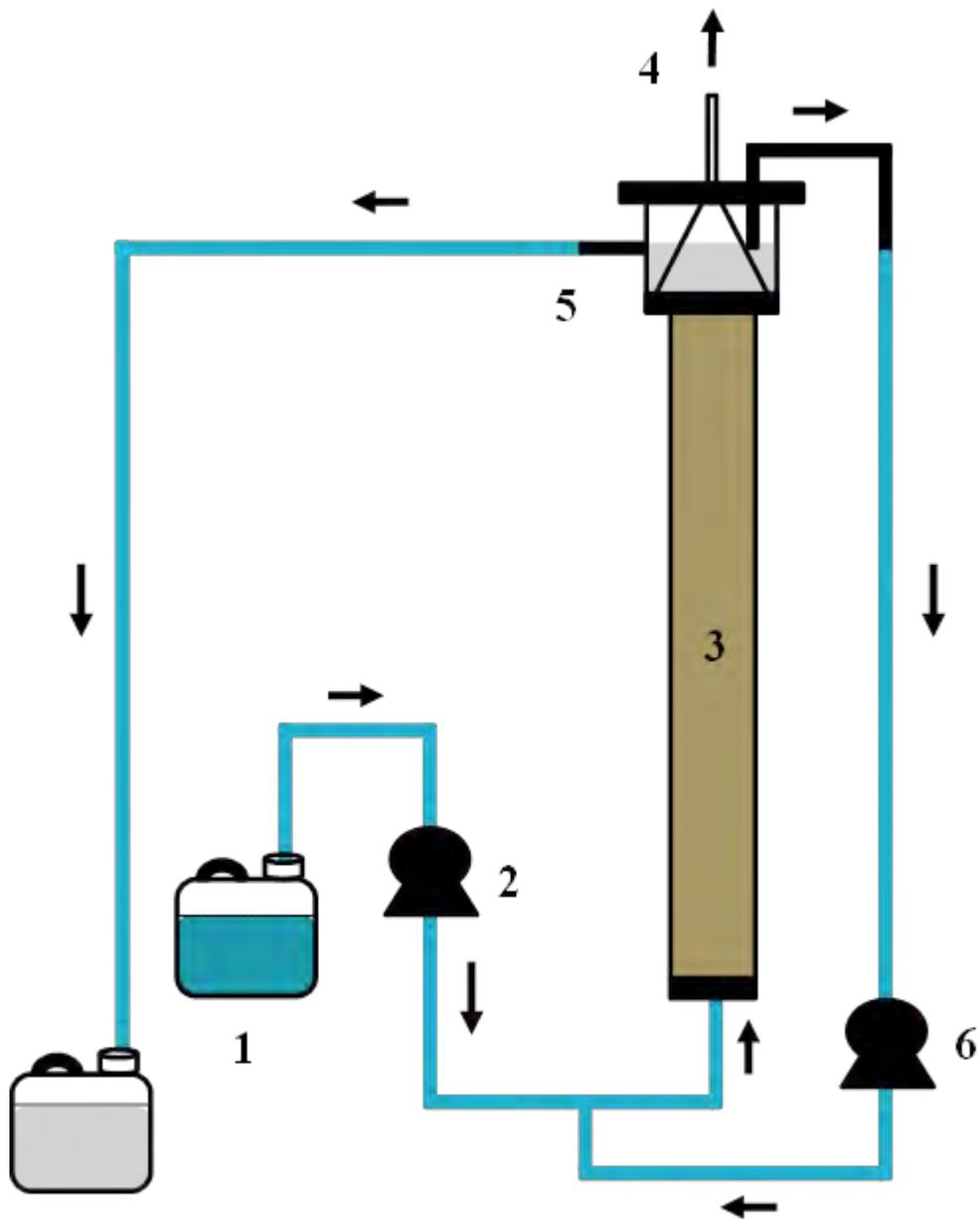
#### 3.2.1 Reactor EGSB

Los estudios se llevaron a cabo en un reactor de lecho expandido de lodos anaerobios granulares (EGSB) de acrílico con un volumen de operación de 3 L, 1.2 m de altura y un diámetro interno de columna de 4.6 cm (Figura 6) con un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 1 día, velocidades ascensionales de 3 a 7 m/h, carga orgánica volumétrica (COV) de 2 gDQO/L·d a una temperatura constante de 30°C y pH neutro. El reactor fue inoculado con 900 ml de biomasa anaerobia metanogénica con 0.261 g/g lodo de SST y 0.07 g/g lodo de SSV proveniente de una Planta Tratadora de Aguas Residuales de la industria cervecera. Fueron utilizadas aguas residuales sintéticas las cuales se prepararon con el medio mineral adicionado con calcio descrito en la Tabla 6, la concentración de la fuente de carbono permaneció constante mientras que la adición requerida de  $NaNO_3$  se varió para obtener las relaciones C/N de 10, 7, 4, 3, 2 y 1.

Para la medición del biogás, el reactor se conectó a una columna de vidrio invertida con una solución saturada de cloruro de sodio a pH 3, para evitar que el dióxido de carbono producido se disolviera en el líquido.

#### 3.2.2 Arranque y aclimatación a condiciones metanogénicas

El arranque del reactor se inició con 1 gDQO<sub>glucosa</sub>/L durante 25 días. Después los lodos se aclimataron con una concentración de 2 gDQO<sub>glucosa</sub>/L. Esta etapa concluyó cuando la eficiencia de remoción de carbono fue superior al 90%. El medio mineral adicionado con 100 mg/L de calcio como efecto granulante utilizado en esta etapa se presenta en la Tabla 6.



**Figura 6.** Diseño experimental del reactor EGSB:

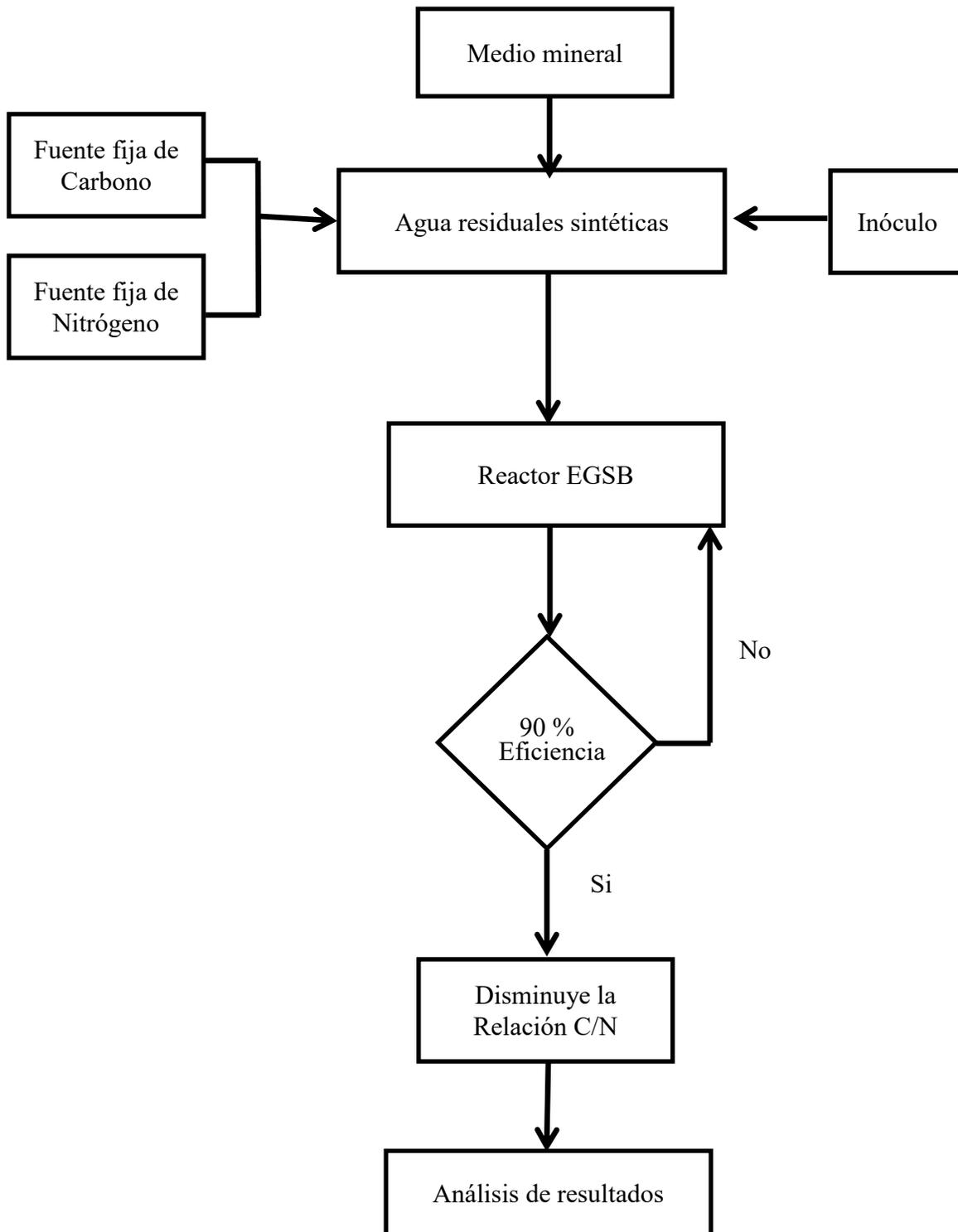
- (1) tanque de alimentación. (2) bomba de alimentación, (3) reactor EGSB, (4) salida de biogás, (5) salida del efluente y (6) bomba de recirculación.

### **3.2.3 Proceso simultáneo de metanogénesis y desnitrificación en el reactor**

El estudio en continuo de desnitrificación y metanogénesis simultánea en el reactor EGSB comenzó una vez que finalizaron las etapas de arranque y aclimatación a condiciones metanogénicas. Durante este periodo se adicionó la fuente de nitrógeno ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) en relaciones C/N de 10, 7, 4, 3, 2 y 1, manteniendo constante la carga de carbono en 2 gDQO/L·d. El procedimiento que se siguió para cambiar de relación C/N en el reactor consistió en monitorear la eficiencia de remoción de nitrógeno, ya sea, que fuera superior al 90% o hasta alcanzar un valor estable de eficiencia para después analizar los resultados (Figura 7). El medio mineral desnitrificante adicionado con 200 mg/L de calcio que se utilizó en estas pruebas se presenta en la Tabla 7.

**Tabla 6.** Medio mineral para pruebas en continuo.

Macronutrientes		<i>Solución de elementos traza</i>	
Compuesto	mg/L	Compuesto	mg/L
NH <sub>4</sub> Cl	1044	FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2000
KCl	270	MnCl <sub>2</sub>	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	169	EDTA	500
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	150	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	100
CaCl <sub>2</sub>	277	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1880	ZnCl <sub>2</sub>	50
Extracto de levadura	18	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
<i>Soln. de elementos traza</i>	1 ml/L	AlCl <sub>3</sub>	50
		NiCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	50
		CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
		CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
		HCl concentrado	1 ml/L
		EDTA=Ácido Etileno Diamino Tetracético	



**Figura 7.** Diagrama del procedimiento para la etapa de metanogénesis y desnitrificación simultánea para el sistema en continuo.

**Tabla 7.** Medio mineral desnitrificante para pruebas en continuo.

Macronutrientes		<i>Solución. de elementos traza</i>	
<b>Compuesto</b>	<b>mg/L</b>	<b>Compuesto</b>	<b>mg/L</b>
KCl	270	FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	169	MnCl <sub>2</sub>	500
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	150	EDTA	500
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	818	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	100
CaCl <sub>2</sub>	277	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	<b>1880</b>	ZnCl <sub>2</sub>	50
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	<b>456</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
Extracto de levadura	18	AlCl <sub>3</sub>	50
<i>Soln. de elementos traza</i>	1 ml/L	NiCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	50
		CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
		CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
		HCl concentrado	1 ml/L
		EDTA=Ácido Etileno Diamino Tetracético	

### 3.3 Métodos Analíticos

#### 3.3.1 Medición del pH

El pH se midió diariamente en influente y efluente, utilizando un potenciómetro Accumet Excel XL94001428 (*Fischer Scientific*) con un electrodo *Cole Parmer*. Para la calibración del equipo, se utilizaron soluciones reguladoras de pH de 4.01, 7 y 10.

#### 3.3.2 Relación de alcalinidad

La relación de alcalinidad ( $\alpha$ ) es un método que estima la capacidad de amortiguamiento del sistema, a través de la medida indirecta de ácidos grasos volátiles (AGV) y bicarbonato, la relación debe mantenerse de 0.5-0.7 lo que indica una alcalinización eficiente (Jenkins y col., 1983). Del efluente del reactor se tomaron muestras de 25 mL, se titularon con una solución 0.02 N de  $H_2SO_4$  hasta un pH 5.75 (promedio al que se titulan el 80 % de los carbonatos), la titulación se continuó hasta un pH 4.3 (promedio al que se titulan los AGV). Los volúmenes gastados fueron registrados, calculándose la relación de alcalinidades ó  $\alpha$  de acuerdo a la Ecuación (6).

$$\alpha = \frac{Alc(HCO_3^-)_{5.75}}{Alc(AGV)_{4.3}} \quad \text{Ecuación (6)}$$

Donde:

$Alc(HCO_3^-)_{5.75}$  = mL ácido consumido para llevar el pH original a 5.75

$Alc(AGV)_{4.3}$  = mL ácido consumido para llevar el pH original a 4.3

#### 3.3.3 Demanda química de oxígeno (DQO)

Se determinó la DQO mediante la técnica de reflujo cerrado. La técnica se basa en que el ion dicromato oxida la materia orgánica presente, lo cual resulta en el cambio de estado del cromo de  $Cr^{6+}$  a  $Cr^{3+}$ . El ion crómico formado absorbe fuertemente a una longitud de onda de 620 nm. Se tomaron las muestras a la entrada y salida del reactor, a 2 mL se les adicionó 1 mL de solución digestora de  $K_2Cr_2O_7$  con sulfato de mercurio y 2 mL de ácido sulfúrico con sulfato de plata, posteriormente se homogenizaron en un agitador durante 1 minuto y se

digirieron en una parrilla de calentamiento a 150 °C durante 2 horas. Se cuantificó la concentración DQO en un espectrofotómetro UV visible a 620 nm mediante el uso de la curva estándar de glucosa (Anexo A).

### **3.3.4 Determinación de nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)**

El ion nitrato reacciona en medio ácido con ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio, la cual se acopla con el ácido gentísico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>) para formar el producto color ámbar. Su cuantificación se realizó con el kit Nitra-Ver de alto rango Hach, el cual se basa en el método de la reducción de cadmio, donde el metal cadmio reduce los nitratos presentes en la muestra a nitritos. El procedimiento utilizado fue el siguiente: a 10 mL de muestra tomada del influente y efluente de los reactores, se les adicionó un sobre de reactivo, posteriormente se mezclaron por 1 minuto y se dejaron en reposo por espacio de 5 minutos. La concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de las muestras fue determinada mediante espectrofotometría UV visible a 500 nm y haciendo uso de la curva estándar de nitrato de sodio (Anexo B).

### **3.3.5 Determinación de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

Se determinó con el kit Nitri-Ver de bajo rango Hach. Mediante el método de diazotización, donde el nitrito en la muestra reacciona con el ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio. Ésta se acopla con el ácido cromotrópico para producir un complejo color rosa, que es proporcional a la cantidad de nitrito presente. A 10 mL de muestra de influente, así como al efluente de los reactores, se les adicionó un sobre de reactivo, posteriormente se mezclaron por 1 minuto y se dejaron en reposo por espacio de 10 minutos. La concentración de nitrito de las muestras fue determinada en un espectrofotómetro UV visible a 500 nm y haciendo uso de la curva estándar de nitrito de sodio (Anexo C).

### **3.3.6 Sólidos suspendidos**

Se determinaron los sólidos suspendidos de los lodos del reactor al inicio y al final de las pruebas, así como también de los estudios en lote. Se lavaron los crisoles y se calentaron en la mufla a 550 °C durante una hora; posteriormente se pasaron al desecador para que se enfriaran antes de pesarlos. Una vez obtenido este peso, se registró como “peso del crisol”.

Se pesó 1 g de lodo por triplicado y se pusieron en los crisoles, después se colocaron en una estufa a 100 °C hasta que se eliminó el agua remanente, posteriormente se pasaron al desecador, se pesaron y se anotó este peso como “peso seco a 100 °C”. Los residuos, se calcinaron a 550 °C durante 30 minutos y se pasaron al desecador, tomándose este peso como “peso de ceniza a 550 °C”. Una vez obtenidos los tres pesos, se procedió a determinar los sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles de la siguiente manera:

$$\text{Sólidos Suspendidos Totales} \left( \frac{g}{g_{\text{lodo}}} \right) = \frac{\text{Peso seco a } 100 \text{ } ^\circ\text{C} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de muestra}} \quad \text{Ecuación (7)}$$

$$\text{Sólidos Suspendidos Fijos} \left( \frac{g}{g_{\text{lodo}}} \right) = \frac{\text{Peso de ceniza a } 550 \text{ } ^\circ\text{C} - \text{Peso del crisol}}{\text{Peso de muestra}} \quad \text{Ecuación (8)}$$

$$\text{Sólidos Suspendidos Volátiles} \left( \frac{g_{SSV}}{g_{\text{lodo}}} \right) = (\text{Sólidos Totales} - \text{Sólidos Fijos}) \quad \text{Ecuación (9)}$$

### 3.3.7 Determinación de biogás

El biogás producido se midió mediante la técnica de desplazamiento de una solución saturada de NaCl (300 mg/L), ajustada a un valor de pH menor a 2 con HCl concentrado para impedir la disolución de CO<sub>2</sub> y como indicador del cambio de pH por disolución de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se usó rojo de metilo. El volumen desplazado se midió en una columna de 4.45 cm de diámetro interno con una altura de 25 cm.

La determinación del volumen de biogás producido se realizó de la siguiente manera:

$$\text{Producción de biogás} \left( \frac{\text{mL}}{\text{d}} \right) = \frac{A_r \cdot h}{t} \quad \text{Ecuación (10)}$$

Donde:

$$A_r = \text{Área seccional de la columna de biogás (cm}^2\text{)} = \frac{\pi \cdot \emptyset^2}{4}$$

$\emptyset$  = Diámetro de la columna (cm)

h = Altura desplazada en la columna (cm)

t = Tiempo (días)

### 3.3.8 Granulometría

La granulometría es una medida de la distribución del tamaño de las partículas en una muestra. La técnica de granulometría que se utilizó para determinar el tamaño de los gránulos que conforman a la biomasa consistió en utilizar 6 tamices de acero inoxidable con una apertura de malla de 2 a 0.149 mm, después apilarlos en forma vertical de tal manera que en la parte superior siempre este un diámetro mayor con respecto al inferior, luego pesar una muestra de 1 g de lodo y posteriormente lavar los lodos con una solución buffer de fosfatos con el fin de hacerlos pasar por los tamices, separándolos de tamaño, para finalmente recuperar por separado los gránulos que se retuvieron en las mallas con un retrolavado de solución amortiguadora de fosfatos (Tabla 8) y después determinar sólidos suspendidos volátiles, sólidos fijos y sólidos totales (Laguna 1999).

**Tabla 8.** Solución amortiguadora de fosfatos.

Compuestos	g/L
$K_2HPO_4$	4.0
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	5.09
$KH_2PO_4$	1.08

### 3.4 Procesamiento de Datos Experimentales

#### 3.4.1 Balance de materia del reactor EGSB

Para el balance de materia, un reactor EGSB puede ser modelado como un reactor de flujo mezclado debido a la alta tasa de recirculación y a la generación de gas en el lecho de lodos, suponiendo que permite un mezclado completo del sustrato y producto de reacción (Jiménez, 1999).

El balance general del sustrato en un reactor de flujo mezclado viene dado por:

$$\{ACUMULACIÓN\} = \{ENTRADA\} - \{SALIDA\} - \{CONSUMO POR REACCIÓN\}$$

Este balance puede ser expresado como:

$$V \frac{dS}{dt} = F(S_0 - S) - \gamma V \quad \text{Ecuación (11)}$$

Donde:

$S_0$  = Concentración del sustrato en la alimentación (g/L)

$S$  = Concentración del sustrato en el efluente (g/L)

$F$  = Flujo (L/d)

$V$  = Volumen del reactor (L)

$t$  = Tiempo (d)

$\gamma$  = Velocidad de consumo = Ecuación de Monod =  $\frac{V_{max}S}{K_s + S}$

$V_{max}$  = Velocidad específica máxima de consumo de sustrato  $\left(\frac{gS}{L \cdot d}\right)$

$K_s$  = Constante de afinidad (g/L)

Dado que el tiempo de retención hidráulica ( $TRH$ ) viene dado por  $TRH = V/F$  y como en estado estacionario no hay acumulación ( $VdS/dt = 0$ ), la ecuación (11) se puede escribir como:

$$\gamma = \frac{(S_0 - S)}{TRH} \quad \text{Ecuación (12)}$$

Sustituyendo la expresión de Monod para  $\gamma$  en la ecuación (12), se obtiene:

$$\frac{V_{max}S}{K_s + S} = \frac{(S_0 - S)}{TRH} \quad \text{Ecuación (13)}$$

Reacomodando:

$$S = V_{max} \cdot TRH \frac{S}{(S_0 - S)} - K_s \quad \text{Ecuación (14)}$$

La ecuación (14) es una recta de  $S$  contra  $TRH \frac{S}{(S_0 - S)}$  con pendiente  $V_{max}$  y ordenada al origen  $K_s$ .

### 3.4.2 Balance de DQO

La DQO suministrada es utilizada por las bacterias desnitrificantes para la formación de nitrógeno y también por las bacterias metanogénicas para su conversión a metano, el balance de DQO es como sigue:

$$DQO_{In} = DQO_E + DQO_{NO_3^-} + DQO_{CH_4} \quad \text{Ecuación (15)}$$

$$DQO_{NO_3^-}(\%) = \frac{f_{NO_3^-} (NO_3^-_{In} - (NO_3^-_E + NO_2^-_E))}{DQO_{In} - DQO_E} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (16)}$$

$$DQO_{CH_4}(\%) = (DQO_{In} \cdot 100) - DQO_{NO_3^-} \quad \text{Ecuación (17)}$$

Donde:

$DQO_{NO_3^-}$  = DQO removida por las bacterias desnitrificantes vía formación de nitrógeno (g/L)

$DQO_{CH_4}$  = DQO removida por las bacterias metanogénicas vía formación de metano (g/L)

$f_{NO_3^-}$  = Factor estequiométrico de conversión de  $NO_3^-$  a DQO (0.846 g $NO_3^-$ /gDQO)

$DQO_{In}$  = Concentración de DQO en el influente (g/L)

$DQO_E$  = Concentración de DQO en el efluente (g/L)

### 3.4.3 Eficiencia de remoción de DQO

La eficiencia de remoción de materia carbonada se calculó a partir del sustrato consumido (DQO) y se expresó como porcentaje:

$$\text{Eficiencia de remoción de DQO (\%)} = \frac{DQO_{In} - DQO_E}{DQO_{In}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (18)}$$

### 3.4.4 Eficiencia de remoción de nitrógeno

La eficiencia de remoción de nitrógeno incluye tanto el nitrato consumido como el nitrito producido en el efluente, ya que otros posibles intermediarios de la desnitrificación (NO y N<sub>2</sub>O) no están incluidos por que se supone que reaccionan rápidamente y no pueden ser detectados (Misiti y col., 2011). Por lo tanto, la eficiencia de eliminación de nitrógeno se evaluó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de remoción de nitrógeno (\%)} = \frac{NO_3^-_{In} - (NO_3^-_E + NO_2^-_E)}{NO_3^-_{In}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (19)}$$

Donde:

$NO_3^-_{In}$  = Concentración de nitrato en el influente (g/L)

$NO_3^-_E$  = Concentración de nitrato en el efluente (g/L)

$NO_2^-_E$  = Concentración de nitrito en el efluente (g/L)

### 3.4.5 Parámetros operacionales del reactor

Los parámetros que se utilizaron para la operación del reactor EGSB son los siguientes:

Se fijó el TRH y a partir de éste se calculó el flujo de alimentación.

$$TRH = \frac{V}{F} [=](d) \quad \text{Ecuación (20)}$$

La tasa de recirculación se obtuvo del flujo de recirculación entre el flujo de alimentación.

$$R = \frac{FR}{F} \quad \text{Ecuación (21)}$$

La carga orgánica volumétrica (COV) se estimó de la concentración de DQO en la alimentación dividida por el TRH.

$$COV = \frac{DQO_{In}}{TRH} [=] \left( \frac{gDQO}{L \cdot d} \right) \quad \text{Ecuación (22)}$$

La velocidad ascensional se fijó en base a los valores alcanzados en este tipo de reactores (EGSB) y con éste se obtuvo la tasa de recirculación.

$$v_{as} = \frac{F + FR}{A_r} [=] \left( \frac{m}{h} \right) \quad \text{Ecuación (23)}$$

Donde:

TRH= Tiempo de Residencia Hidráulico (d)

V= Volumen del reactor (L)

F= Flujo de alimentación (L/d)

R= Tasa de recirculación

FR= Flujo de recirculación (L/d)

COV= Carga orgánica volumétrica  $\left( \frac{gDQO}{L \cdot d} \right)$

$v_{as}$ = Velocidad ascensional (m/h)

$A_r$  = Área seccional de la columna del reactor (m<sup>2</sup>)

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Estudios en Lote

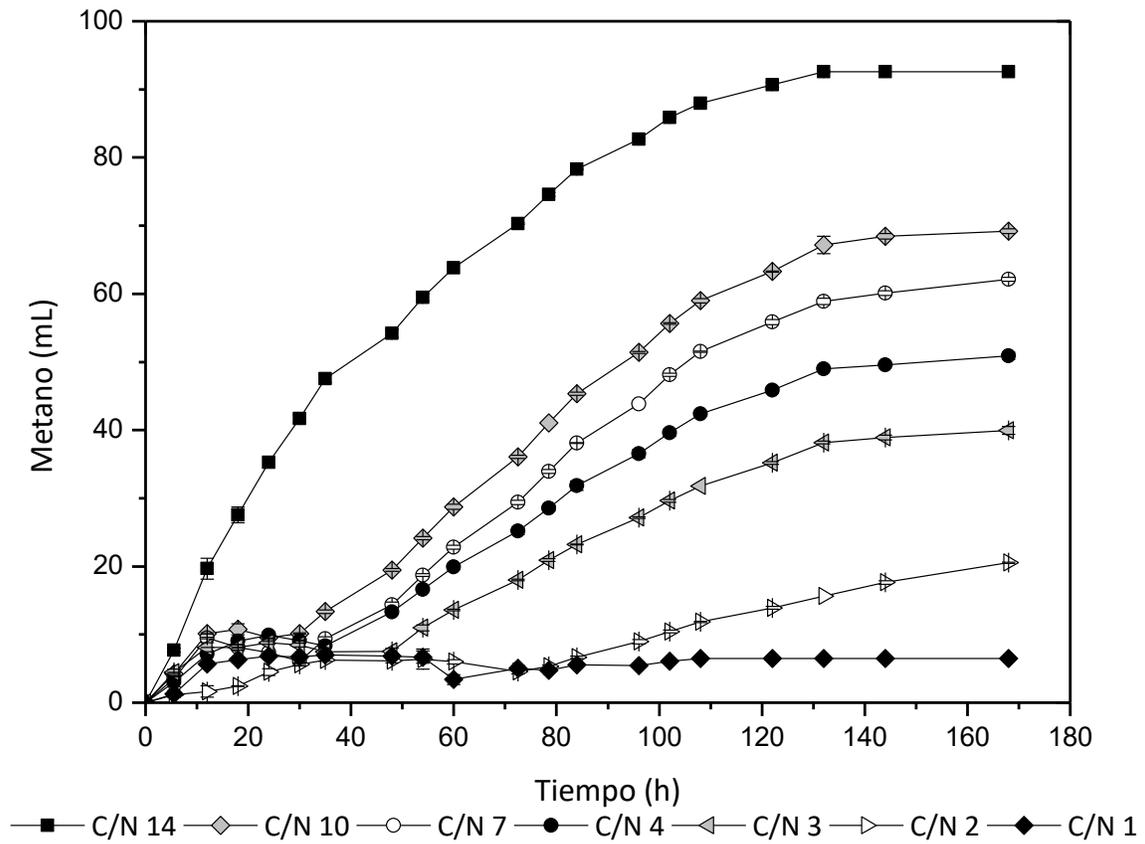
##### 4.1.1 Efecto de la relación C/N en la actividad metanogénica específica

La actividad metanogénica específica (AME) del lodo anaerobio previamente activado, se evaluó a diferentes relaciones C/N. En la Figura 8 se muestra la producción de metano que fue obtenida mediante la medición de biogás a diferentes tiempos en donde se observa que al aumentar la concentración de nitrato, es decir, disminuir la relación C/N, la producción de metano disminuye, ya que en el tiempo de 130 horas en la relación C/N de 14 se obtuvo una producción de 90 mL, mientras que en la relación C/N de 1 el volumen de metano fue solamente de 6 mL.

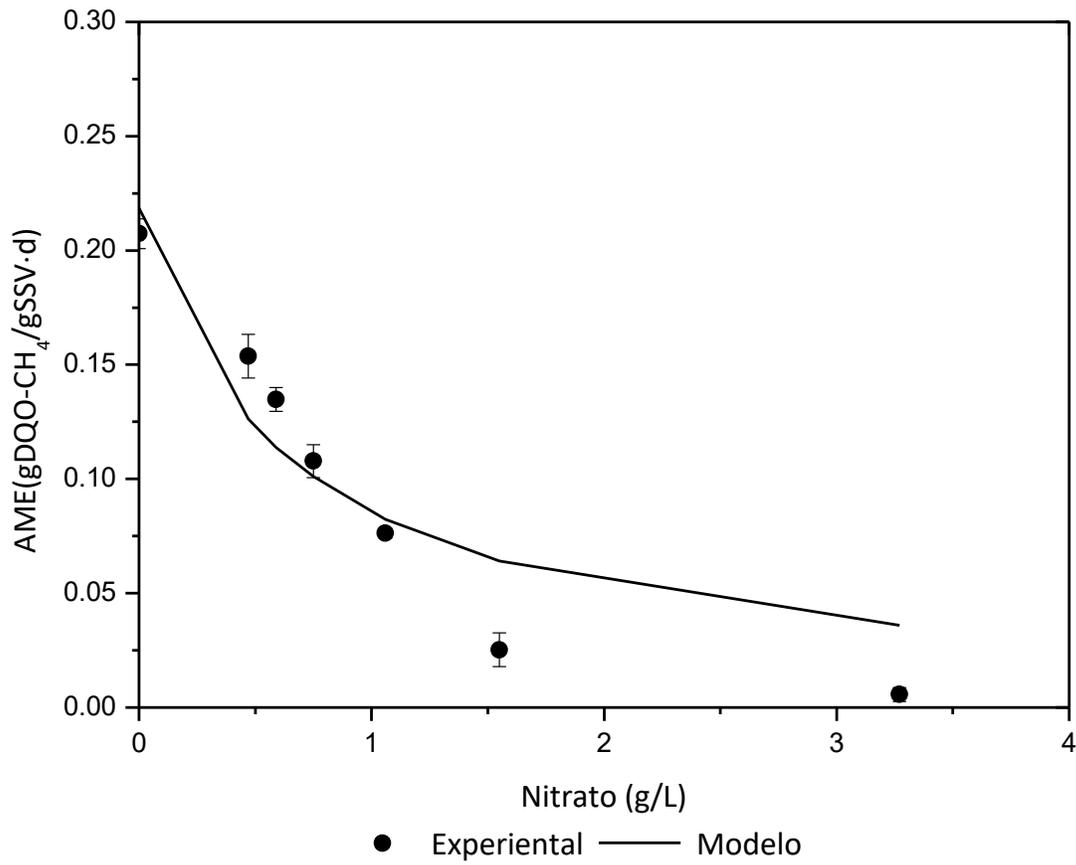
A partir de los perfiles de producción de metano se determinaron las AME mediante la ecuación 4 (Sección 3.3.1). En la Figura 9, se muestra el efecto tóxico del nitrato en concentraciones crecientes de 0 a 3.3 g/L sobre la actividad metanogénica de la biomasa, esto se puede observar ya que la actividad metanogénica disminuyó en un 87.5 % a la concentración de 1.5 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L y se observó una mínima actividad biológica metanogénica en una concentración de 3.3 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>, obteniendo así una concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de 0.75 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L.

Así mismo, la ecuación que se ajustó a los valores de las actividades metanogénicas específicas fue el modelo de Monod con inhibición por sustrato, reportado por Tugtas y col. (2009).

$$V_{DQO-CH_4} = \frac{V_{max}S}{K_S + S + \frac{S^2}{KI}} \quad \text{Ecuación (24)}$$



**Figura 8.** Producción de metano a diferentes relaciones C/N en los ensayos por lote.



**Figura 9.** Efecto de la concentración de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en la actividad metanogénica específica experimental y teóricamente en los ensayos por lote.

Cuando la cantidad de sustrato es mucho mayor que la constante de afinidad, es decir que  $\frac{Ks}{S} \ll 1$ , entonces la ecuación 24 se puede escribir como:

$$V_{DQO-CH_4} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{S}{KI}} \quad \text{Ecuación (25)}$$

Donde:

$V_{DQO-CH_4}$  = Actividad metanogénica específica (gDQO-CH<sub>4</sub>/gSSV·d)

$V_{max}$  = Máxima actividad metanogénica específica (gDQO-CH<sub>4</sub>/gSSV·d)

$S$  = Concentración de sustrato (g/L)

$KI$  = Constante de Inhibición (g/L)

$KS$  = Constante de afinidad por sustrato (g/L)

A partir del ajuste de la ecuación 25 de los datos experimentales, utilizando la herramienta de cálculo de Solver en Excel, se determinó que el valor de la máxima actividad metanogénica fue de 0.21 gDQO-CH<sub>4</sub>/gSSV·d y la constante de inhibición fue de 0.64 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, con un coeficiente de correlación de 0.94.

Los resultados obtenidos indican que la biomasa utilizada en esta prueba presenta una mayor tolerancia a la presencia de nitrato en comparación a la reportada por Plascencia-Jatomea (2010) y Banihani y col. (2009), quienes mencionan que concentraciones de 1 y 0.54g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L respectivamente pueden inhibir la AME en un 95% o más. Por otro lado, Chen y Lin (1993) concluyeron que en un sistema por lote con una relación de C/N menor a la estequiométrica, la formación de metano fue completamente suprimida, situación similar a la presentada en este estudio.

Según Banihani (2009), la adición de nitrato provoca una supresión en la metanogénesis y esta no se debe a la cantidad de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sino a la cantidad de compuestos intermediarios formados durante la desnitrificación como los nitritos.

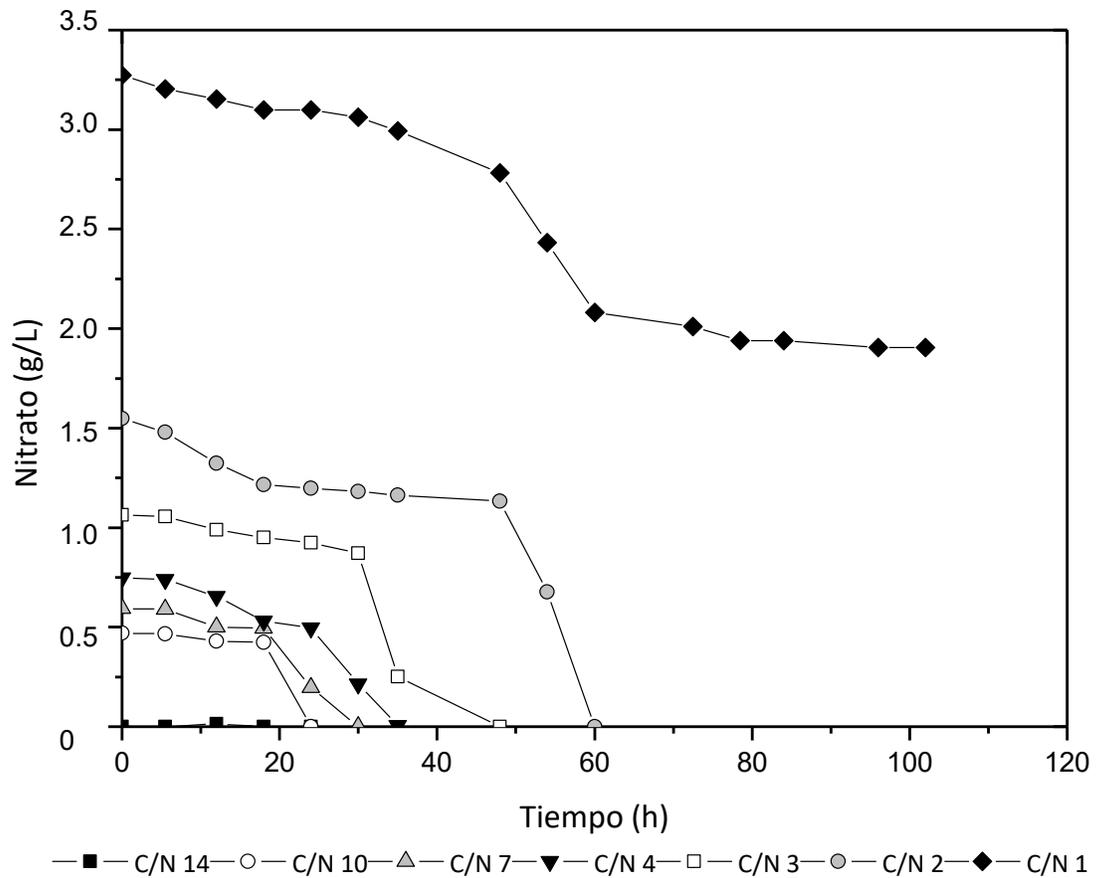
Por otro lado, Roy y Conrad, (1999) concluyeron que el principal mecanismo involucrado en la supresión de la producción de metano por nitrato es debido a la inhibición de intermediarios metanogénicos y no por la competencia entre desnitrificantes y metanógenos por sustratos.

Los efectos inhibitorios que el nitrato causa en la producción de metano son debido a que este compuesto se reduce a  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$ , y  $\text{N}_2\text{O}$ , y todos estos óxidos de nitrógeno provocan cambios en el potencial redox y en la inhibición enzimática (Scheid y col., 2003). Por lo tanto, puede corroborarse que los nitratos son agentes inhibitorios y tóxicos sobre los microorganismos metanogénicos y se puede asumir que las concentraciones de nitrato tolerables para el lodo granular anaerobio son menores a 0.75 g/L y pueden ser tomadas como referencia para el estudio en continuo.

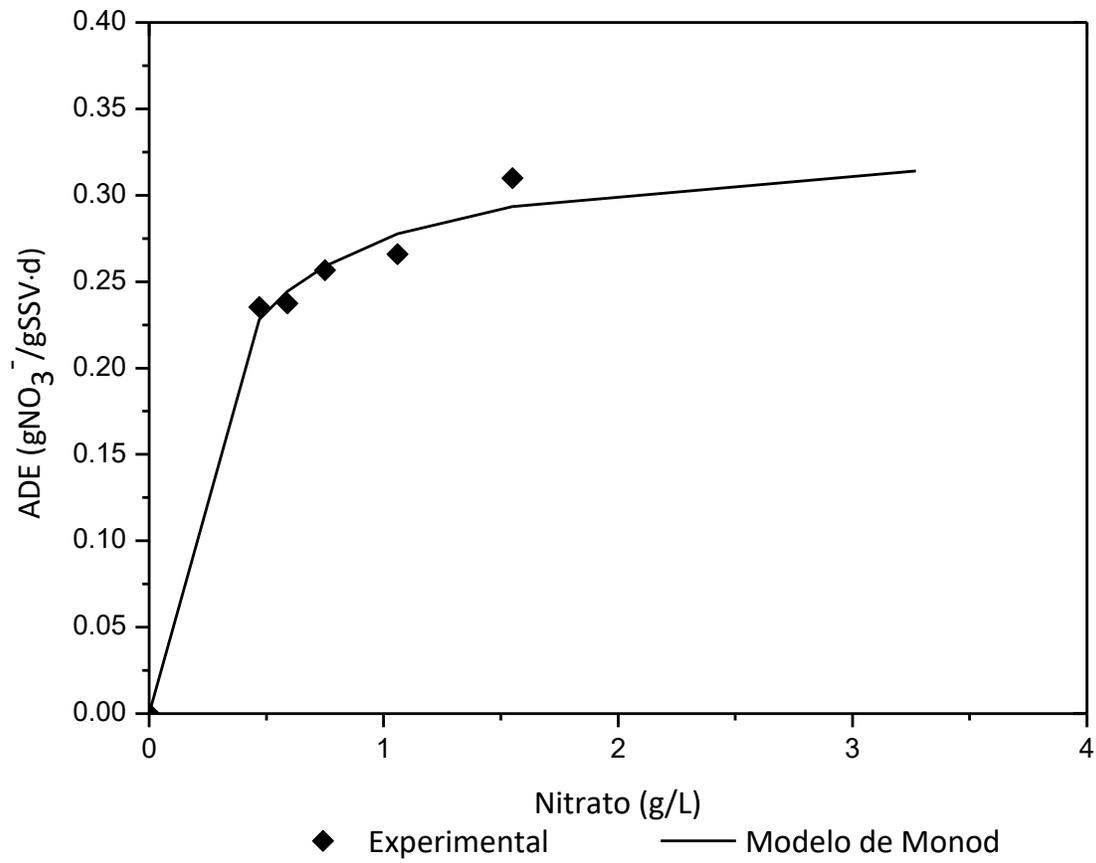
#### **4.1.2 Actividad desnitrificante específica**

Simultáneamente a la producción de biogás, se determinó la cantidad de nitrato consumido y nitrito producido con el objetivo de conocer la capacidad de consumo de nitrato de la biomasa. En la Figura 10 se muestra que conforme disminuye la relación C/N, el nitrato se consume totalmente en mayor tiempo, excepto en la relación C/N de 1, donde la eficiencia del consumo de nitrato fue de 39 %.

El análisis de la actividad desnitrificante (Figura 11) muestra que al aumentar la concentración de nitrato la actividad desnitrificante se incrementa, presentándose una actividad máxima de 0.33  $\text{gNO}_3/\text{gSSV}\cdot\text{d}$  en la concentración de 1.8  $\text{gNO}_3/\text{L}$ . Resultados similares obtuvieron Ruiz y col., (2006) donde realizaron la actividad desnitrificante específica con diferentes relaciones DQO/N y mostraron que la ADE tiende a incrementar cuando la relación disminuye.



**Figura 10.** Consumo de nitrato con diferentes relaciones C/N en las pruebas en lote.



**Figura 11.** Efecto de la concentración de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) sobre la actividad desnitrificadora específica.

De acuerdo a Olguin-Lora y col., (2003) el modelo cinético de Monod se puede ajustar para obtener los parámetros cinéticos en la actividad desnitrificante específica.

$$V_{NO_3^- - N_2} = V_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{Ecuación (26)}$$

Donde:

$V_{NO_3^- - N_2}$  = Actividad desnitrificante específica (gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/gSSV·d)

$V_{max}$  = Máxima actividad desnitrificante específica (gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/gSSV·d)

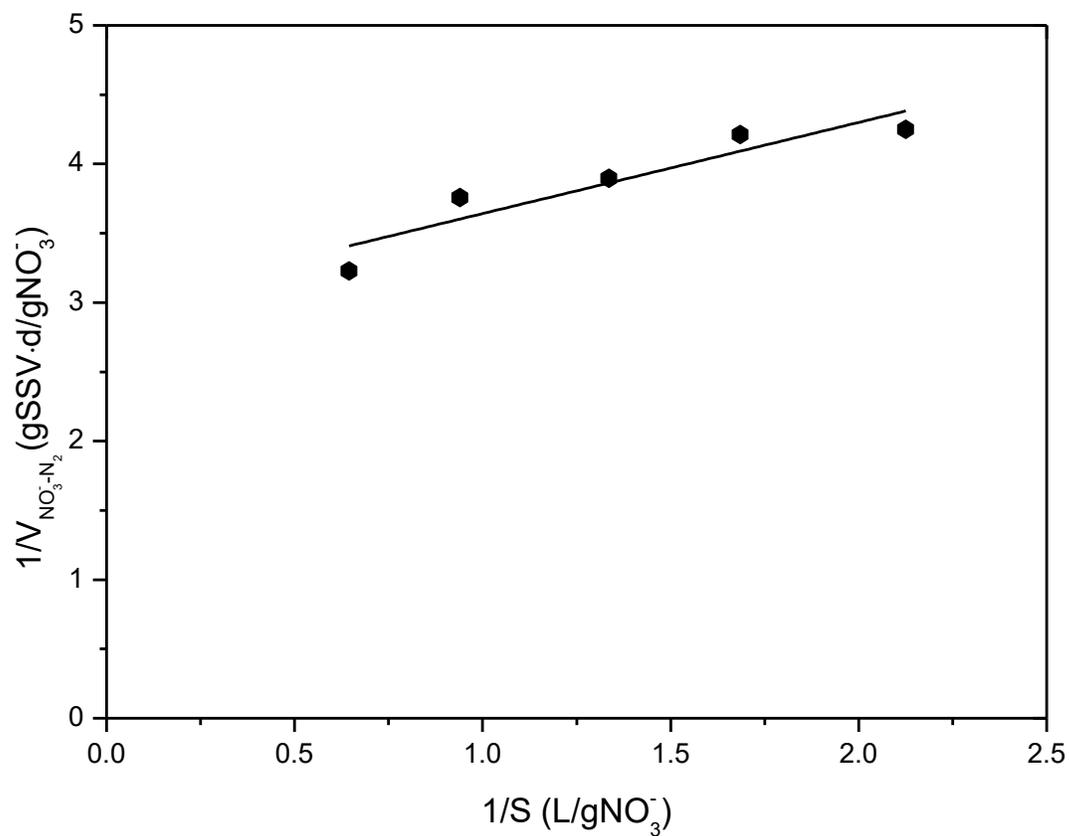
$S$  = Concentración de sustrato (g/L)

$K_S$  = Constante de saturación media (g/L)

El ajuste matemático, mediante la linealización de la ecuación 26 determinó el valor de la constante de saturación media ( $K_S$ ), el cual fue de 0.22 gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (Figura 12).

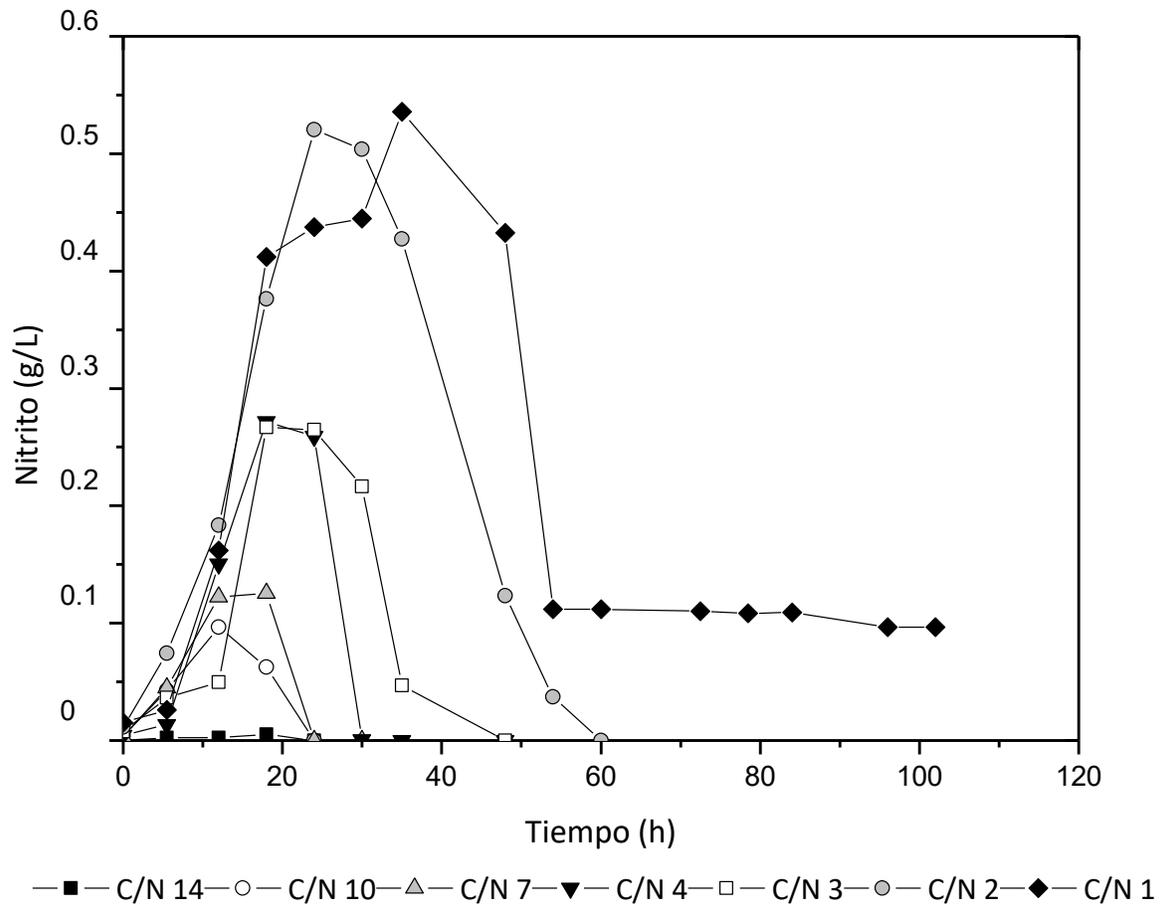
Conforme el nitrato se consumió el nitrito se produjo como compuesto intermediario. En la Figura 13 se muestra que al disminuir la relación C/N aumentó la producción de nitrito y éste se consumió una vez que finalizó el consumo de nitrato, excepto en la relación C/N de 1 donde la concentración de nitrito permaneció en 0.1 g/L, ya que no hubo un consumo total de nitrato.

Al respecto, algunos trabajos en lote han reportado la acumulación de nitrito. Por ejemplo, Schocher y col. (1991), trabajando con *Pseudomonas* sp. en un cultivo en lote menciona una inhibición del cultivo por una acumulación considerable de nitrito que entre otras variables, se debió a un exceso de nitrato.



**Figura 12.** Ecuación de Monod linealizada para el consumo de nitrato

$(1/V = 0.6583 (1/S) + 2.9832; R^2=0.86)$ ,  $V_{\max} = 0.33 \text{ gNO}_3^-/\text{gSSV} \cdot \text{d}$  y  $K_s=0.22 \text{ g/L}$ .

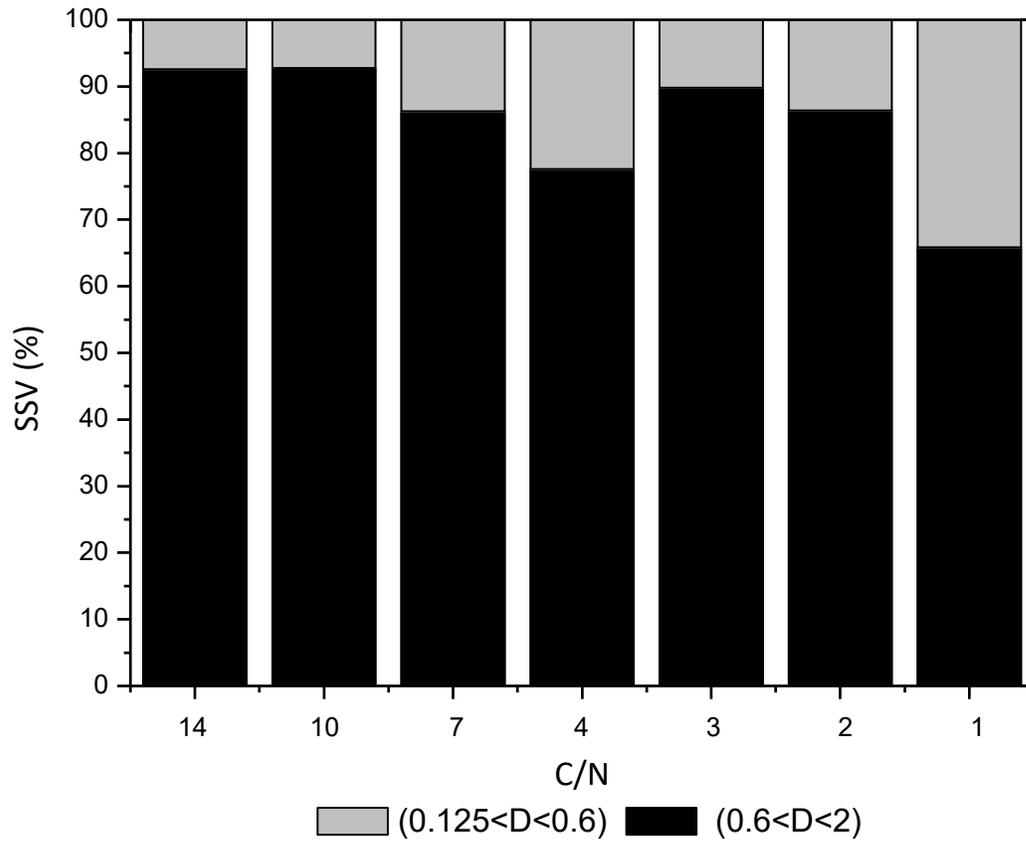


**Figura 13.** Producción de nitrito en las pruebas de desnitrificación por lote.

#### **4.1.3 Efecto de la relación C/N en los gránulos anaerobios**

Al concluir los estudios en lote, a los gránulos anaerobios se les realizó un estudio granulométrico con el fin de observar el efecto de la relación C/N en la distribución de tamaño de partícula.

El aumento en la concentración de nitrato afectó el tamaño de los gránulos, ya que al disminuir la relación C/N se observó que la distribución de la biomasa se redujo en los gránulos de mayor tamaño ( $0.6 < D < 2$ ) y se distribuyó a los gránulos de menor tamaño ( $0.125 < D < 0.6$ ). En la Figura 14 se muestra que a la relación C/N de 14 correspondiente al medio mineral sin la adición de nitrato, el 90 % de la concentración de biomasa medida como SSV se encontró distribuida en los gránulos con un diámetro mayor a 0.6 y menor a 2 mm, mientras que a la relación C/N de 1 ésta disminuyó a 65 % para el mismo intervalo de tamaño de partícula, indicando la desintegración de los gránulos.



**Figura 14.** Efecto de la relación C/N sobre los gránulos anaerobios en estudios en lote.

## 4.2 Estudios en Continuo

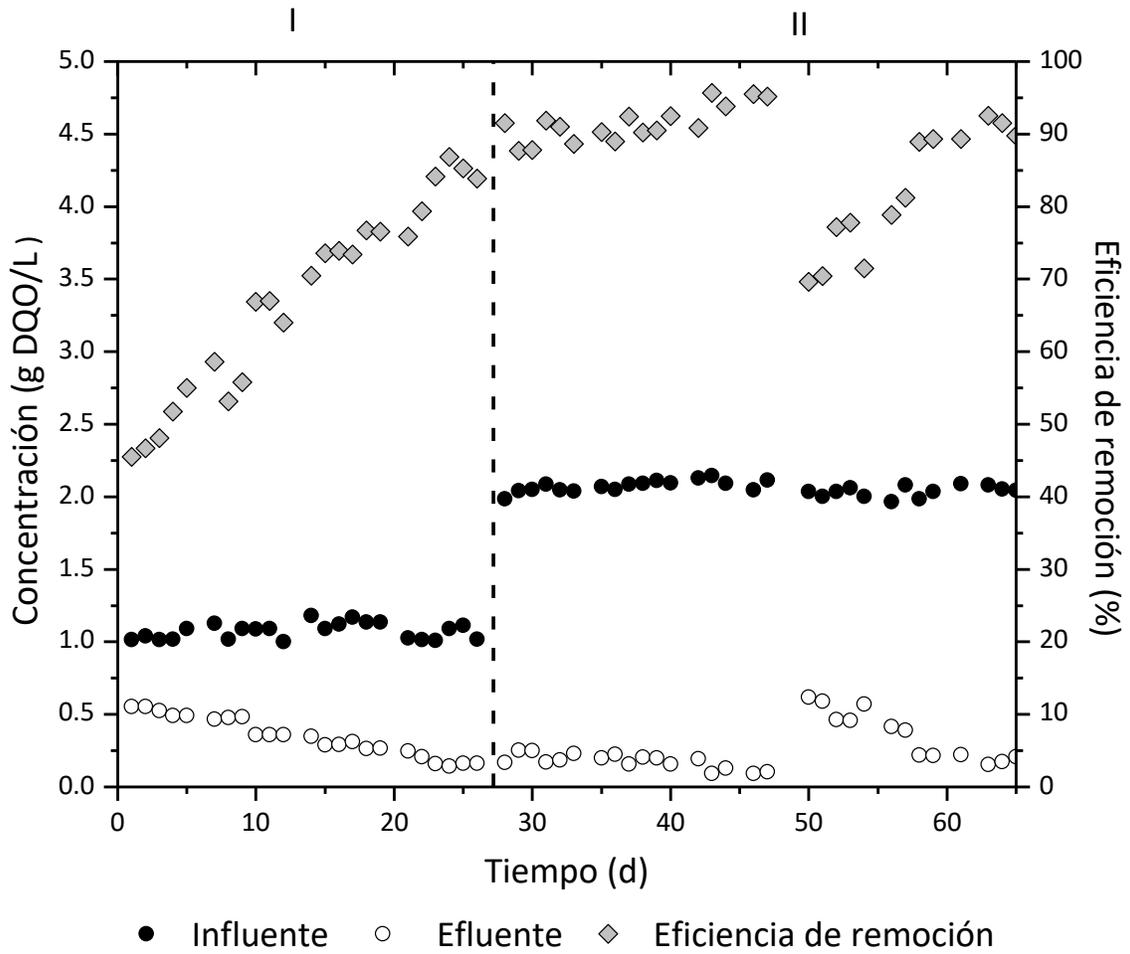
### 4.2.1 Arranque y aclimatación del reactor a condiciones metanogénicas

Para permitir la rápida activación del reactor se operó como un proceso metanogénico y se dividió en dos etapas: arranque y aclimatación. La etapa de arranque se llevó a cabo en el reactor con el fin de activar la biomasa, en la cual se utilizó una baja concentración de la fuente de carbono con 1 gDQO<sub>glucosa</sub>/L durante 27 días en donde se observó que la remoción de materia carbonada aumentaba gradualmente hasta alcanzar una eficiencia de remoción por arriba del 90% (Figura 15, etapa I).

En la etapa de aclimatación la concentración de glucosa se incrementó a 2 gDQO/L (día 27), y aunque se presentó una disminución en la remoción de DQO en el día 50, el reactor se recuperó y se logró una eficiencia de remoción superior al 90% en el día 65 (Figura 15, etapa II).

Durante estas etapas, también se monitoreó la alcalinidad y el pH del efluente, ya que la operación eficiente de un reactor anaerobio implica el control de una adecuada capacidad buffer del sistema, que asegure el mantenimiento del pH en un rango óptimo para el desarrollo del consorcio microbiano. La relación de alcalinidad ( $\alpha$ ) es un parámetro de control de estabilidad rápido y confiable en el proceso anaerobio. El sistema será más estable conforme el valor de  $\alpha$  sea más cercano a uno. En cambio, el pH proporciona información del comportamiento del reactor en estados más avanzados de desequilibrio, cuando la corrección del problema ya puede ser difícil de conseguir (Martínez-Hernández, 2003).

Durante los 65 días de la operación metanogénica del reactor, el pH del influente del medio mineral se mantuvo en un promedio de 7, ya que el rango de pH óptimo para el desarrollo de las bacterias metanogénicas es entre 6.5 y 7 (Chen y Lin, 1993).



Etapa I activación del lodo, etapa II aclimatación metanogénica.

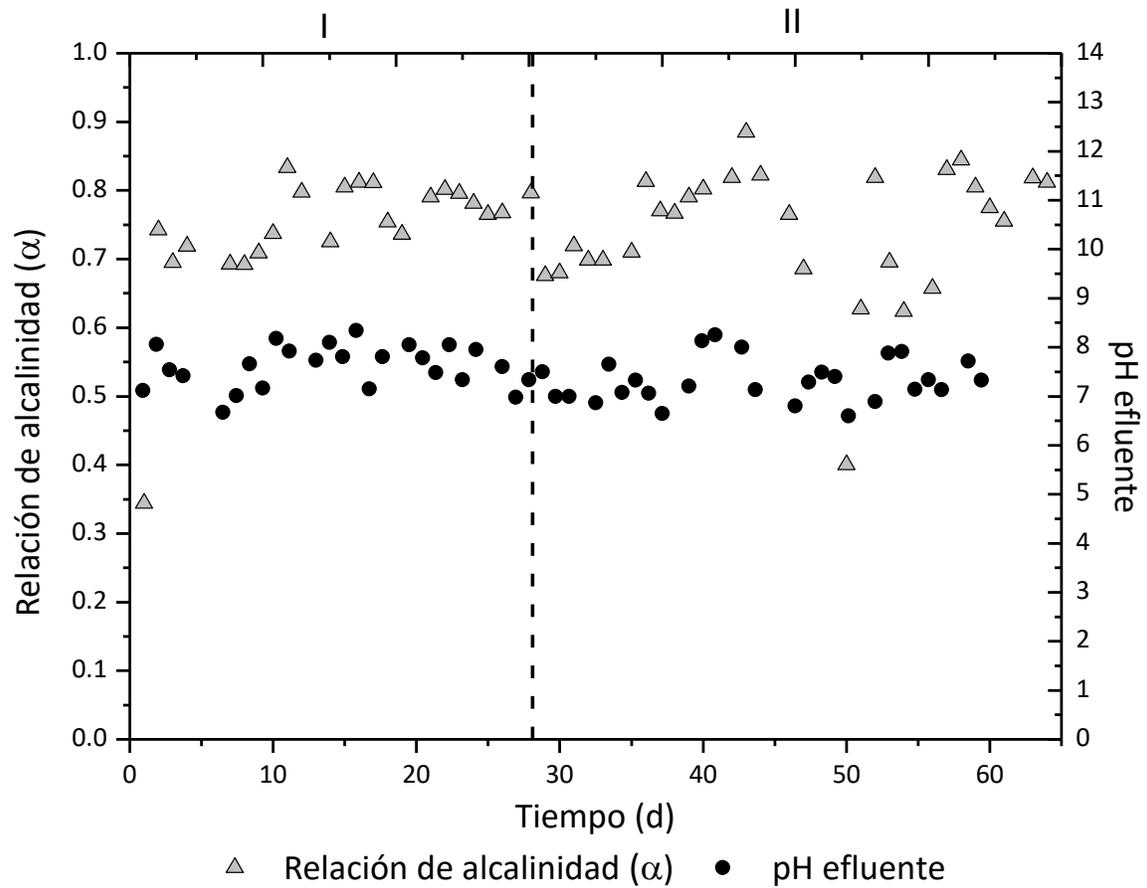
Como resultado se consiguió mantener el pH del efluente en  $7.36 \pm 0.5$  y además se obtuvo una adecuada alcalinización ya que el valor promedio de  $\alpha$  fue de 0.74 (Figura 16, etapas I y II). Sin embargo, en el día 50 se observa que  $\alpha$  alcanzó un valor de 0.4 lo que indica la acidificación del reactor pero al adicionar 1 g/L de bicarbonato al medio, se logró un aumento en la  $\alpha$  con lo que se recuperó la actividad microbológica, observada con el aumento de la eficiencia de remoción de la materia carbonada del reactor EGSB.

En la Figura 17 se muestra la producción de biogás. La cuantificación de biogás incluye tanto la producción de metano ( $\text{CH}_4$ ) como la producción de  $\text{CO}_2$ , y fue calculada teóricamente en base a la reacción 4, mediante la carga orgánica volumétrica (COV) y considerando la remoción experimental de DQO en el reactor.

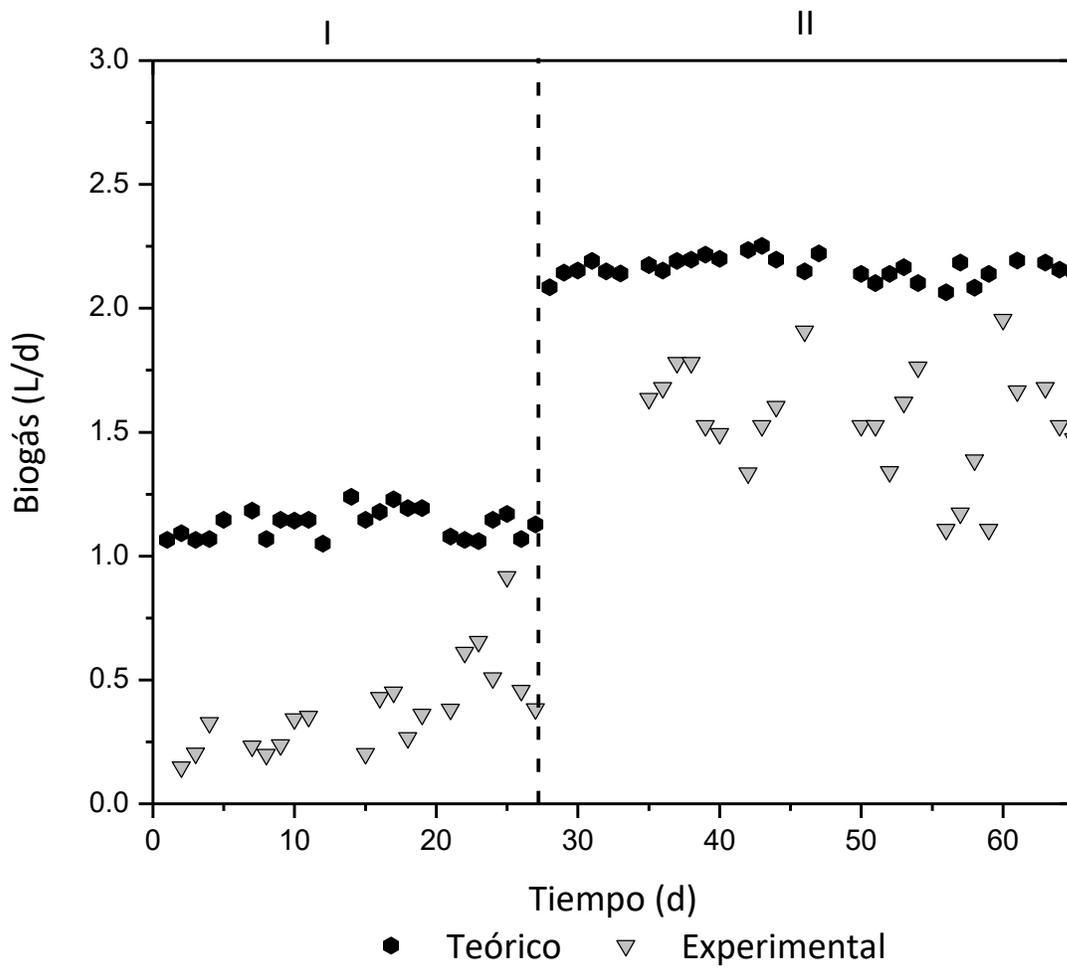


Durante los primeros 27 días de operación en la etapa de arranque la producción de biogás fue mínima con un promedio de 0.38 L/d, que corresponde sólo al 40 % de la calculada teóricamente, probablemente debido a errores en la medición de biogás por fugas en el sistema. Sin embargo, a partir de la etapa de arranque (día 28) se mejoró la captación de biogás alcanzando un promedio de 1.5 L/d, es decir, un 77 % al calculado teóricamente. La máxima producción de biogás obtenida fue de 1.96 L/d.

Una situación similar le ocurrió a Plascencia (2010), donde la producción de biogás fue un 10.6 % menor a la esperada teóricamente debido a fugas en el sistema de medición de biogás, que fue corregida una vez que el sistema fue cerrado herméticamente.



**Figura 16.** Relación de alcalinidad y pH del efluente en la etapa I de activación de lodo y etapa II de aclimatación metanogénica del reactor.



**Figura 17.** Producción de biogás en el reactor EGSB. Etapa I de activación de lodo y etapa II de aclimatación metanogénica.

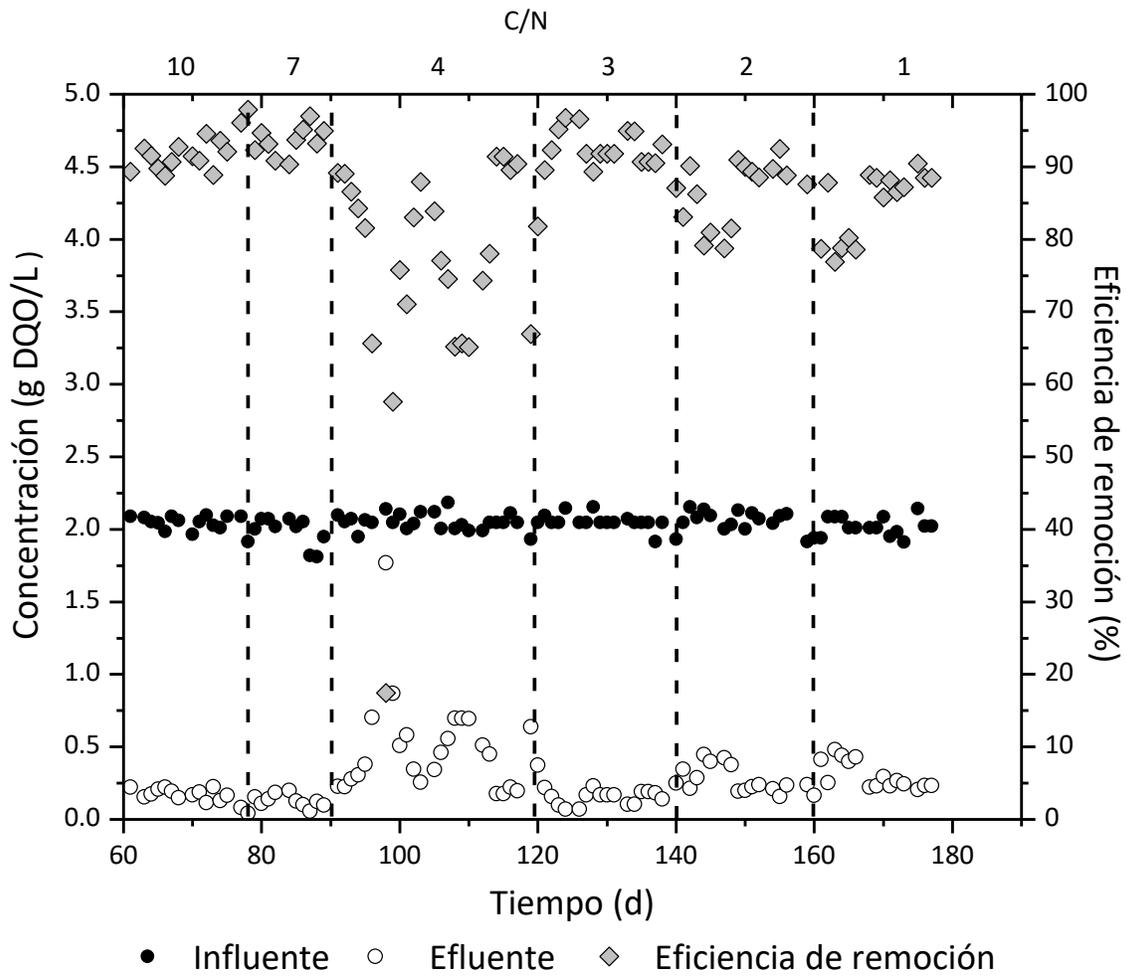
#### **4.2.2 Proceso simultáneo de metanogénesis y desnitrificación en el reactor EGSB**

Una vez obtenidas las condiciones estacionarias de metanogénesis, se procedió a realizar los estudios sobre los procesos simultáneos de metanogénesis y desnitrificación (a partir del día 65). En la Figura 18, se muestra el comportamiento del consumo de materia carbonada. En este período de operación, la relación C/N se varió aumentando periódicamente la concentración de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ -N), dando como resultado seis etapas de tratamiento utilizando glucosa como fuente de carbono. En la Tabla 9, se muestran las condiciones de operación de cada etapa, así como las eficiencias globales de remoción de DQO y nitrógeno.

En la relación C/N de 10 se presentó un período de operación muy estable obteniendo una eficiencia de remoción de materia carbonada por arriba del 90 % en el día 77, posteriormente al aumentar la concentración de nitrato a una concentración de 0.475 g/L y una relación C/N de 7, no se observaron cambios significativos en la remoción de DQO (97 %).

En la etapa de la relación C/N de 4 (día 90), se comenzó a desestabilizar el reactor observándose una desintegración de los gránulos anaerobios evidenciada por la presencia de biomasa en suspensión dentro del reactor, provocando una disminución de la eficiencia de remoción hasta un 50 %, por lo que se procedió a bajar la velocidad ascensional de 7 a 3 m/h para evitar una salida de biomasa. Una vez que se logró estabilizar la eficiencia, se comenzó a disminuir gradualmente la relación C/N del influente, hasta una máxima relación de 1.

Después se obtuvo una eficiencia de remoción de DQO superior al 90 % usando una relación C/N de 3 (día 120) con una duración de 20 días, la cual no presentó alteraciones significativas durante las variaciones de carga de nitrógeno, debido a la contribución de las bacterias desnitrificantes a la remoción de la materia carbonada y posiblemente a la aclimatación de los microorganismos metanogénicos a la presencia de nitrato.



de  
desnitrificación y metanogénesis simultánea a diferentes relaciones C/N,  
divididas por líneas punteadas.

**Tabla 9.** Condiciones de operación del reactor EGSB en la etapa de metanogénesis y desnitrificación simultánea.

<b>Relación C/N</b>	<b>Tiempo de operación (días)</b>	<b>Concentración de DQO (g/L)</b>	<b>Remoción de DQO (%)</b>	<b>Concentración de nitrato (g/L)</b>	<b>Remoción de nitrato (%)</b>
10	12	2	94	0.33	98
7	14	2	97	0.47	92
4	30	2	91	0.83	90
3	20	2	96	1.10	94
2	20	2	92	1.65	93
1	17	2	90	3.30	60

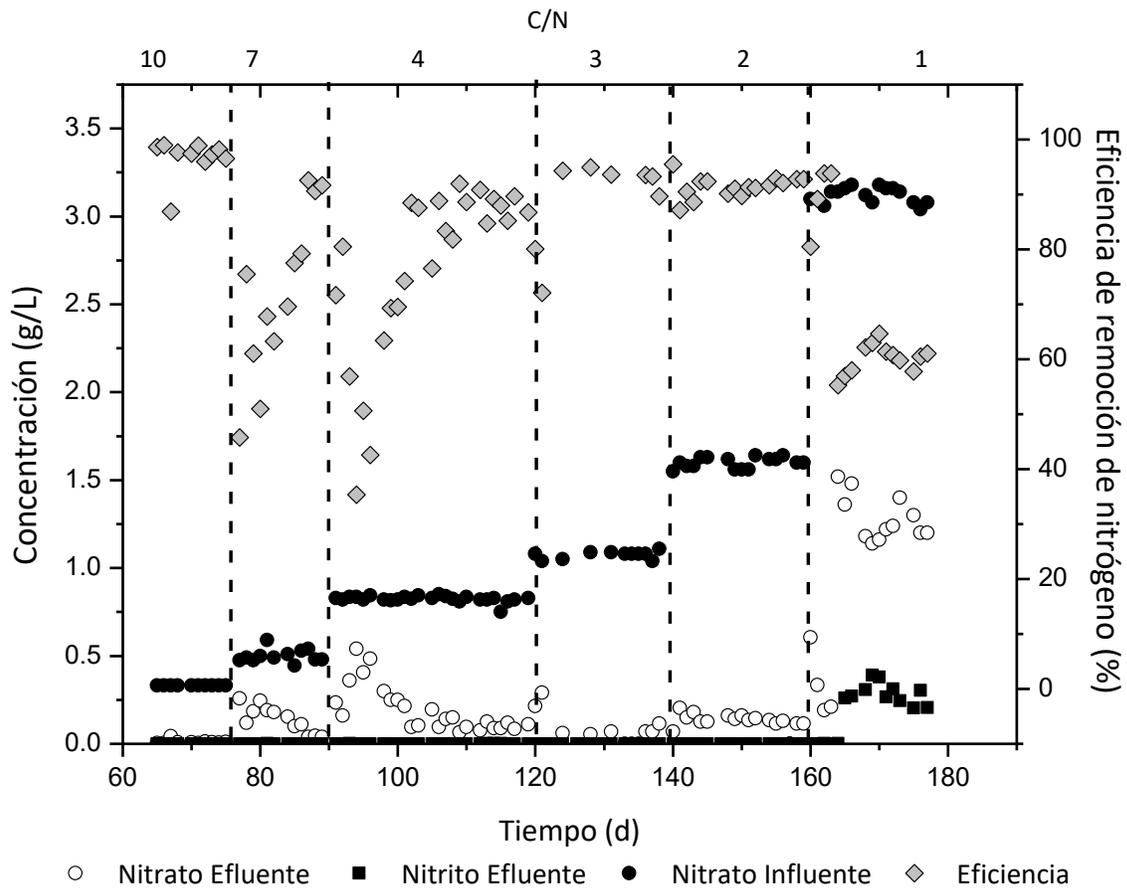
Lo mismo ocurrió cuando se incrementó a la relación C/N de 2 en el día 160, así como también en el día 177 con 3.3 g de nitrato (C/N=1).

La remoción de materia carbonada es similar a la obtenida por Vidal y col. (2007), y Gharsallah y col. (2002), tratando efluentes de la industria procesadora de pescado, las cuales fueron del 90%, aproximadamente.

En la Figura 19, se muestra el comportamiento de los compuestos nitrogenados a las diferentes condiciones de operación de la relación C/N. Al adicionar nitrato a la alimentación del reactor para obtener una relación C/N de 10 durante 18 días de operación, la remoción de nitrato fue del 97 %, sin embargo en las relaciones C/N de 7 y 4, la remoción de nitrato disminuyó al 50 % y se recuperó al final de cada una de las etapas. Usando las relaciones C/N de 3 y 2 la operación del reactor mantuvo un remoción mayor al 90 %, sin embargo en la relación C/N de 1, aunque la eficiencia de materia carbonada se mantuvo en un 90 %, la remoción de nitrato descendió hasta un 60 %, debido a la insuficiente fuente de carbono necesaria para llevar a cabo la desnitrificación, permitiendo la acumulación de nitritos (0.3 g/L).

Los resultados obtenidos muestran la importancia de establecer una relación C/N balanceada y demuestran que el uso de relaciones C/N cercanas a la estequiométrica (1.4, que incluye la formación de biomasa) permite altas eficiencias de desnitrificación sin la acumulación de intermediarios, mientras que el uso de relaciones altas provoca una importante actividad metanogénica permitiendo con ello tener ambos procesos en un mismo reactor (Ruiz y col., 2006).

En el caso de los compuestos nitrogenados, la remoción de nitratos en las relaciones C/N de 10 a 2 resultó ser de 97 %. La cual es muy comparable con la obtenida por Chen y Lin, (1993) que estudiaron el efecto de la carga de nitrato en un CSTR co-inmovilizado con metanol como fuente de carbono, y concluyeron que con una alta concentración de nitrato



**Figura 19.** Eficiencia de remoción de nitrógeno en el reactor durante las relaciones C/N 10, 7, 4, 3, 2 y 1.

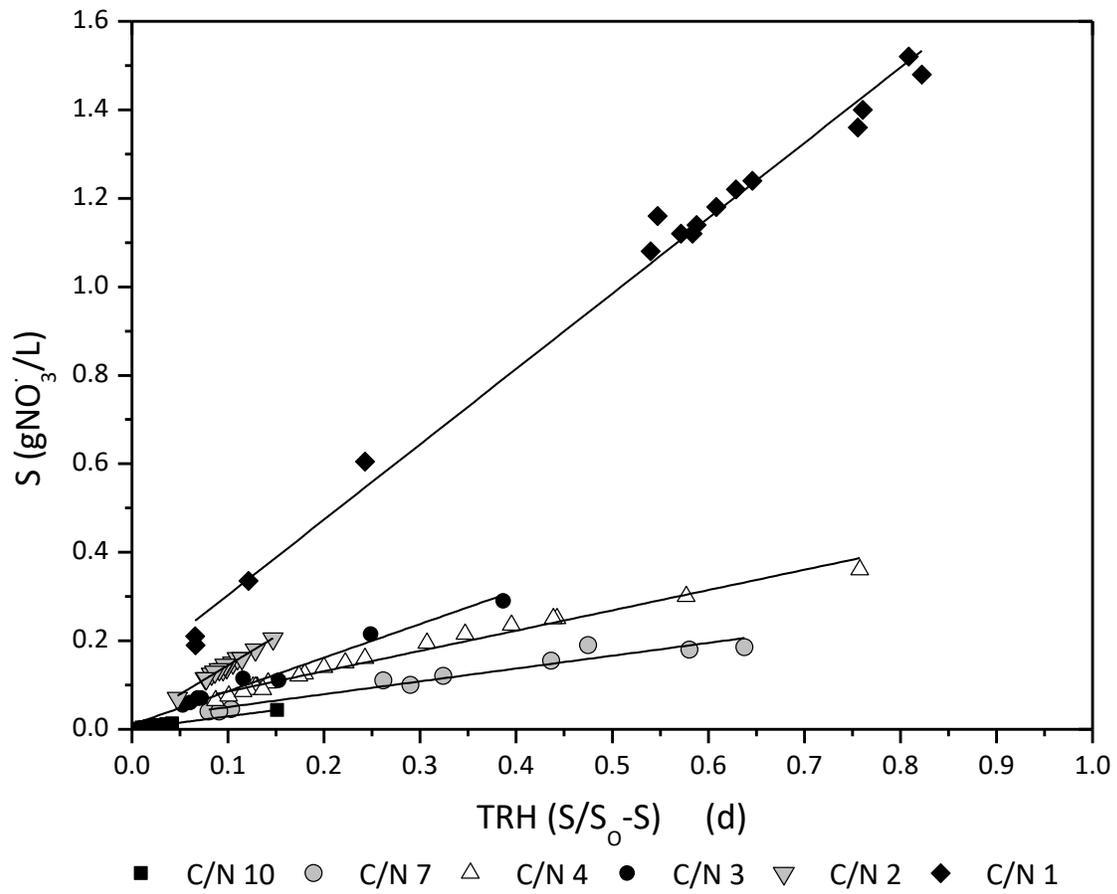
superior a 774 mg/L en el influente y una relación C/N arriba de 1.3, las eficiencias de remoción de nitrato fueron mayores a 99 % con eficiencias de remoción de la fuente de carbono superiores al 98 %. Además, la acumulación del nitrito como intermediario fue observada cuando fue suministrada insuficiente fuente de carbono en un sistema simultáneo de desnitrificación y metanogénesis con una relación C/N menor de 1.5, el cual además inhibió la actividad metanogénica, situación similar a la ocurrida en este estudio.

De igual forma los trabajos realizados por Oh y Silverstein (1999), en reactores de lote secuenciado, empleando acetato como agente reductor en los datos generados, encontraron que a una relación C/N de 1, se presentó una acumulación de nitrito del 30%. En cambio cuando la relación C/N estuvo en 2 y 3, el nitrato fue consumido sin presentar acumulación de nitrito.

Martínez-Hernández, (2003) determinó que el punto de inicio para el estudio de la relación C/N, radica en su valor estequiométrico, pues estudió al tolueno como fuente de carbono en la desnitrificación en un reactor UASB empleando la relación C/N de 1.4, obteniendo consumos de carbono y nitrato superiores al 95 y 87 % respectivamente. Esto permitió la conducta de un proceso respiratorio desnitrificante, sin una acumulación significativa, tanto de compuestos nitrogenados, como carbonados. También Plascencia-Jatomea, (2010) tratando efluentes del procesamiento de desechos de jaiba utilizando un reactor EGSB acoplado a uno aerobio con diferentes relaciones C/N cercanas a la estequiométrica, logró remover 81 % de carbono y hasta 74 % de nitrógeno.

#### **4.2.3 Balance de materia del reactor**

El balance de materia en el reactor EGSB permite describir el comportamiento ocurrido en el proceso biológico de metanogénesis y desnitrificación simultánea. En la Figura 20 se presentan los resultados gráficos del balance de nitrato en estado estacionario de acuerdo a la ecuación 19 (Sección 3.4.1). Para cada recta de esta figura, la pendiente corresponde a la velocidad máxima de consumo de nitrato y la ordenada al origen a la constante de afinidad.



**Figura 20.** Representación esquemática del balance de masa en el reactor para cada una de las relaciones C/N.

Linear Fit of S  
 Linear Fit of S  
 Linear Fit of S  
 Linear Fit of S

Se observa que a medida que aumenta la concentración del sustrato, la velocidad máxima de consumo de nitrato también aumenta y sus valores son presentados en la Tabla 10.

Las velocidades obtenidas en este estudio son superiores a las reportadas por Zhang (2003) y Rustrian (1997) quienes trabajaron con relaciones C/N de 4.9 a 61 y obtuvieron velocidades de 0.03 a 1 gNO<sub>3</sub>/L·d, mientras que, Ruiz y col. (2006) mencionan que después de una estrategia de aclimatación consistente en aumentos graduales de las concentraciones de nitrato, con velocidades de carga de 0.075 a 7.5 gNO<sub>3</sub>/L·d y relaciones C/N de 1.7 a 170, se logran remociones mayores al 80 % en un reactor UASB, además, se ha observado que el tipo de reactor influye en las velocidades de consumo de nitrato ya que Chen y col (1997) en un reactor CSTR inmovilizado obtuvieron velocidades de 0.58 a 4.7 gNO<sub>3</sub>/L·d con relaciones C/N de 1.7 a 5.8.

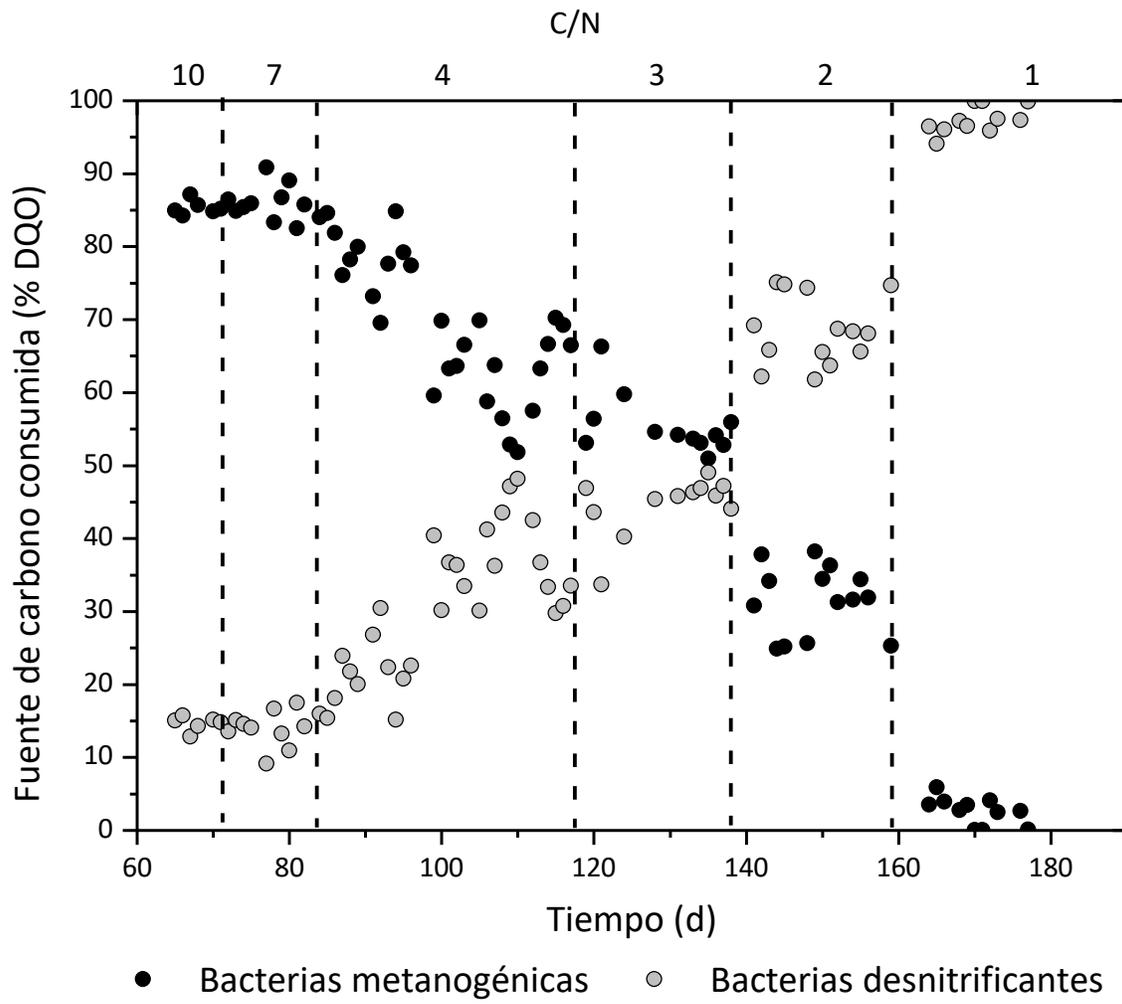
#### **4.2.4 Competencia entre bacterias metanogénicas y desnitrificantes en el proceso en continuo**

Se ha observado que las bacterias desnitrificantes compiten con las metanogénicas por sustratos orgánicos durante el tratamiento anaerobio de aguas que contienen altos niveles de nitrato. El resultado de esta competencia es importante porque puede determinar el rendimiento de los productos finales, nitrógeno y metano (Andalib, 2011).

En la Figura 21 se observa que conforme aumenta la cantidad de nitrato, la actividad metanogénica disminuye, mientras que la desnitrificante aumenta. Inicialmente, la actividad metanogénica fue ampliamente dominante, ya que para el día 90 con las relaciones C/N de 10 a 7, el 85 % de la DQO fue consumida por las bacterias metanogénicas. En la relación C/N de 4 (día 110) la actividad metanogénica disminuyó un 20 % y la actividad desnitrificante aumentó consumiendo el 35 % de la materia carbonada y en la relación C/N de 3 (día 130) la DQO fue removida en un 50 % por ambos consorcios, ya que se ha demostrado que crecen en regiones diferentes del gránulo.

**Tabla 10.** Obtención de los parámetros del balance de sustrato en el reactor EGSB.

Relación C/N	Sustrato (gNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	V <sub>max</sub> (gNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L·d)	Ks (gNO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	R <sup>2</sup>
10	0.33	0.28	0.009	0.99
7	0.47	0.29	0.021	0.94
4	0.83	0.46	0.039	0.98
3	1.10	0.76	0.010	0.98
2	1.65	1.30	0.013	0.99
1	3.30	1.70	0.133	0.99



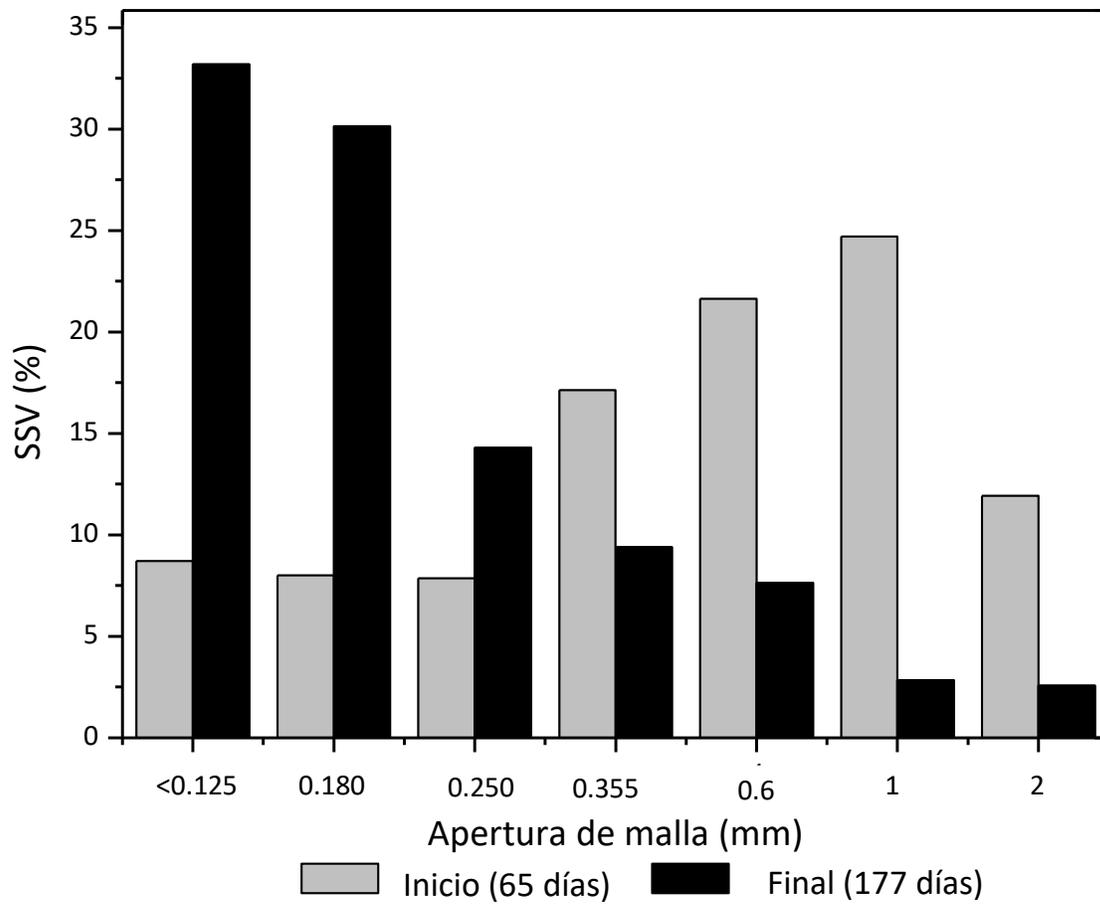
**Figura 21.** Competencia entre bacterias metanogénicas y desnitrificantes.

En relación a este efecto Chen y Lin (1993) estudiaron un cultivo mixto inmovilizado en perlas de gel, con pH 7 alimentado con 800 mg/L metanol y 100 mg/L  $\text{NO}_3\text{-N}$  revelando que la bacteria metanogénica y la desnitrificante fueron capaces de crecer simultáneamente ya que ocupan diferentes regiones de las perlas de gel. La bacteria desnitrificante crece principalmente en la superficie periférica mientras que la bacteria metanogénica crece en la parte interior de las perlas de gel. También Zhang (2003) trabajando sobre la integración de la metanogénesis con desnitrificación y ANAMMOX en un reactor EGSB, observó un cambio de color en el lodo del reactor revelando que una comunidad de bacteria ha cambiado, debido a que en la parte exterior del gránulo se encuentran las bacterias desnitrificantes y en la parte interior las metanogénicas.

Finalmente, la actividad desnitrificante dominó el proceso, ya que para el día 160 a la relación C/N de 1 el 97 % de la DQO fue consumida por las bacterias desnitrificantes. Este comportamiento también fue observado por Klüber y Conrad, (1998) donde encontraron que la adición de nitrato afecta no sólo en la actividad, sino también en la composición de la comunidad metanogénica y reportaron que el nitrato inhibió a los microorganismos metanogénicos.

#### **4.2.5 Efecto de la relación C/N en los gránulos del reactor EGSB**

De la misma forma que en los estudios en lote, el aumento de la concentración de  $\text{NO}_3\text{-N}$  afectó el tamaño de los gránulos, ya que como se muestra en la granulometría de la Figura 22, al inicio del estudio en continuo (día 65) con la relación C/N de 10, el 58.3 % de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se distribuyó en los gránulos de mayor tamaño ( $0.6 < D < 2$ ), mientras que, al concluir el estudio en la relación C/N de 1 (día 177) además de que se observó un cambio de color (de negro a café) en la biomasa del reactor, la biomasa para este intervalo de tamaño de gránulos disminuyó al 13 %. La desintegración de los gránulos en los estudios en continuo fue más evidente que en los estudios en lote, esto pudo deberse a que en el reactor EGSB existen fuerzas de ruptura y de abrasión ligadas a las velocidades ascensionales (Seghezzi, 1998).



**Figura 22.** Granulometría del lodo anaerobio realizado al inicio y al final del proceso de metanogénesis y desnitrificación simultánea.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Los estudios en lote demostraron la degradación simultánea de la materia carbonada y de nitrógeno, observando que conforme disminuye la relación C/N la actividad desnitrificante aumenta, mientras que la actividad metanogénica disminuye. En base a esto se determinó que la actividad metanogénica disminuyó en un 50 % a la concentración de 0.78 g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (C/N= 3.8), por lo que en concentraciones superiores de nitrato la actividad desnitrificante fue la que prevaleció.

Durante el proceso de metanogénesis y desnitrificación simultánea, en el reactor EGSB se mantuvo la remoción de la materia carbonada por arriba del 90 %. Esta remoción fue llevada a cabo por la participación de ambos consorcios, en donde se observó que a altas relaciones C/N la actividad metanogénica predominó, mientras que a bajas relaciones la degradación se llevó a cabo principalmente por las bacterias desnitrificantes y en relaciones intermedias (C/N de 3) participaron en un 50 % ambos consorcios.

Cuando el carbono se encontró en concentraciones superiores a la estequiométrica (C/N>1) se obtuvieron remociones superiores al 90 % de nitrógeno, mientras que, al superar la concentración de nitrógeno necesaria para que se lleve a cabo la desnitrificación (C/N=1) la eliminación del nitrógeno fue del 60 %, propiciando la acumulación de nitrito. Por lo que es importante que el reactor trabaje a relaciones superiores a la estequiométrica.

El aumento en la concentración de nitrato causó un cambio en la distribución de la biomasa en los gránulos anaerobios provocando una disminución de los mismos, fenómeno que pudo deberse a que la biomasa predominante no tiene capacidad para formar gránulos como la biomasa anaerobia metanogénica.

En los estudios en continuo la desintegración de los gránulos fue más evidente que en los estudios en lote, esto pudo deberse a que en el reactor EGSB existen fuerzas de ruptura y de abrasión ligadas a las velocidades ascensionales.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la factibilidad de utilizar reactores de alta tasa (EGSB) para el tratamiento de aguas residuales como las de industrias pesqueras, lo cual es beneficioso, ya que se pueden tratar gran cantidad de efluentes en espacios menores que los sistemas de tratamiento convencionales.

## **5.2 Recomendaciones**

Con el fin de aplicar este tipo de tratamiento en las industrias pesqueras es necesario realizar estudios de costos y escalamiento, así como también dependiendo de la industria es importante caracterizar cada corriente para conocer cuál de ellas es la que aporta la mayor concentración de contaminantes y así definir si ésta se trata por separado o se incorpora a todo el proceso.

Realizar el estudio de la composición del biogás producido en el reactor EGSB durante el proceso de desnitrificación y metanogénesis simultánea, para realizar el balance másico de los compuestos orgánicos y nitrogenados.

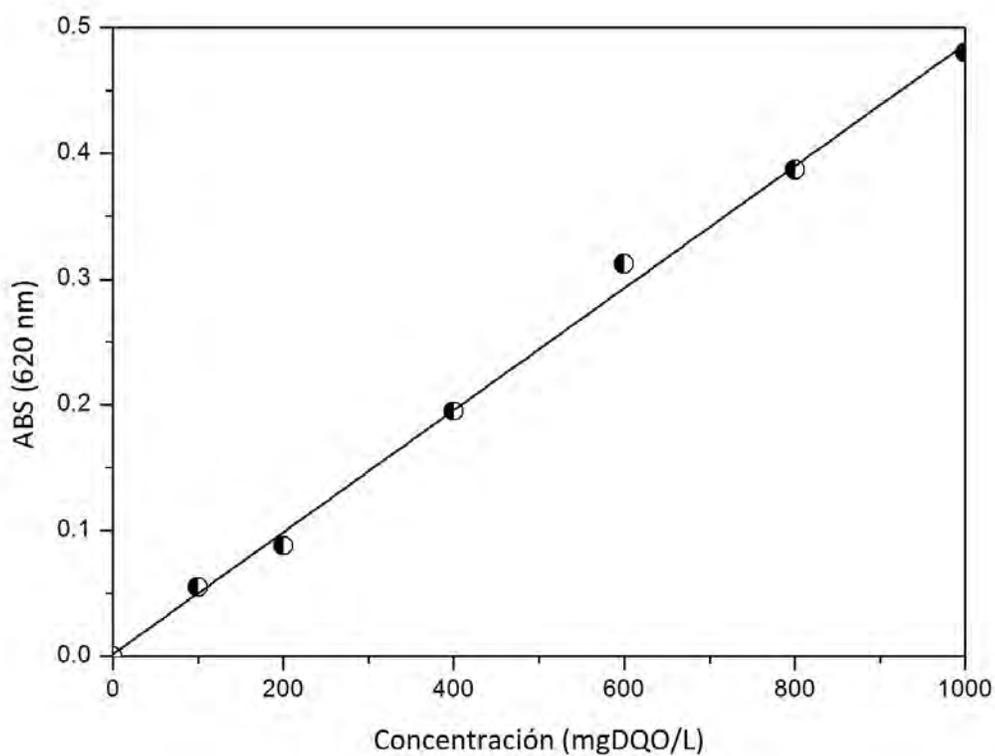
Llevar a cabo estudios de granulometría, así como la composición de proteínas y sustancias exopoliméricas de los gránulos para cada una de las relaciones C/N en el reactor EGSB, para ver el efecto de la adición de nitrato y determinar las condiciones de operación (velocidad ascensional, carga orgánica, pH, relación C/N, tasa de recirculación) para que la biomasa remueva la mayor cantidad de contaminantes.

## ANEXOS

## Anexo A. Curva de calibración para determinar DQO

Tabla 11. Curva estándar de la demanda química de oxígeno (DQO).

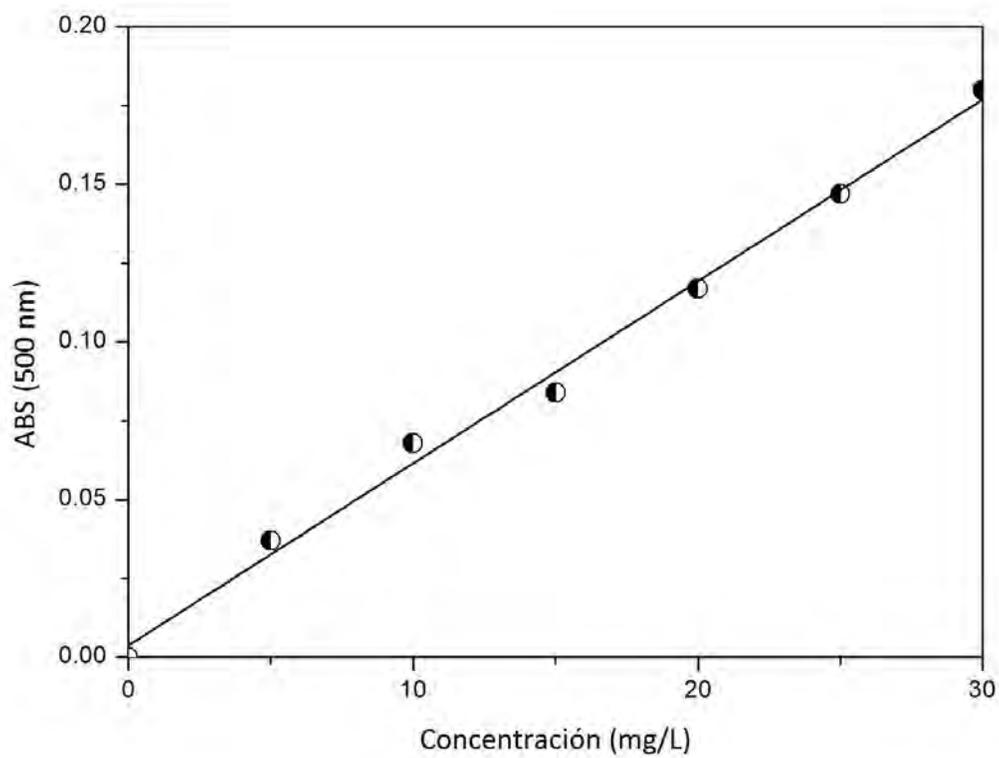
Concentración (mg/L)	ABS (620 nm)
0	0
100	0.055
200	0.088
400	0.195
600	0.312
800	0.387
1000	0.480



**Figura 23.** Curva estándar de la demanda química de oxígeno.  
 (ABS = 2474.5 (DQO) - 23.686;  $R^2 = 0.9947$ ).

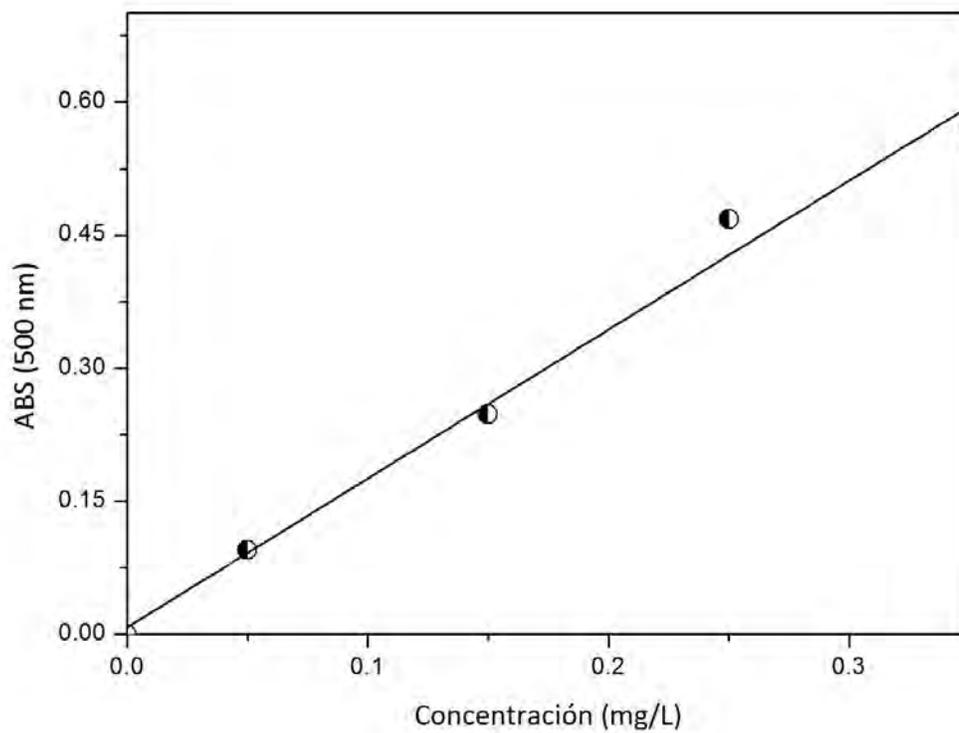
**Anexo B. Curva de calibración para la técnica de nitrato****Tabla 12.** Curva estándar de nitrato.

Concentración (mg/L)	ABS (500 nm)
0	0
5	0.037
10	0.068
15	0.084
20	0.117
25	0.147
30	0.180

**Figura 24.** Curva estándar de la determinación de nitratos.  
( $ABS = 2474.5 (NO_3^-) - 23.686$ ;  $R^2 = 0.9947$ ).

**Anexo C. Curva de calibración para la medición de nitrito****Tabla 13.** Curva estándar de nitrito.

Concentración (mg/L)	ABS (500 nm)
0	0
0.5	0.095
0.15	0.248
0.25	0.468
0.35	0.571

**Figura 25.** Curva estándar de la determinación de nitritos.  
( $ABS = 2474.5 (NO_2^-) - 23.686$ ;  $R^2 = 0.9947$ ).

**Anexo D. Tablas de los resultados de la actividad metanogénica específica (AME)**

**Tabla 14.** Valores de la AME obtenidos experimental y teóricamente.

<b>Nitrato (g/L)</b>	<b>AME</b>	<b>AME</b>	<b>(Mod-Exp)^2</b>
	<b>Experimental (gDQO- CH<sub>4</sub>/gSSV·d)</b>	<b>Modelo (gDQO- CH<sub>4</sub>/gSSV·d)</b>	
0	0.2073	0.2186	0.0001
0.47	0.1536	0.1262	0.0007
0.59	0.1348	0.1137	0.0004
0.75	0.1078	0.1010	4.602E-05
1.06	0.0762	0.0823	3.7359E-05
1.55	0.0252	0.0641	0.0015
3.27	0.0056	0.0359	0.0009
<b>Suma</b>			0.0038

**Tabla 15.** Constantes obtenidas mediante la herramienta de cálculo de Solver en Excel.

<b>Ks (gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L)</b>	<b>KI (gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L)</b>	<b>Vmax (gDQO- CH<sub>4</sub>/gSSV·d)</b>	<b>Correlación</b>
0	0.64	0.21	0.94

**Anexo E. Tablas de resultados de la actividad desnitrificante específica (ADE)**

**Tabla 16.** Valores de la ADE experimental y del modelo de Monod.

<b>S</b> <b>(gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L)</b>	<b>ADE</b> <b>(gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ gSSV·d)</b>	<b>ADE Modelo</b> <b>(gNO<sub>3</sub><sup>-</sup> /gSSV·d)</b>	<b>1/S</b> <b>(L/gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</b>	<b>1/V</b> <b>(gSSV·d /gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</b>
0	0	0		
0.47	0.2353	0.2282	2124.88	4.2497
0.59	0.2373	0.2443	1685.14	4.2128
0.75	0.2565	0.2588	1336.45	3.8980
1.06	0.2660	0.2776	939.81	3.7592
1.55	0.3098	0.2934	645.52	3.2276

**Tabla 17.** Constantes obtenidas mediante la linealización del modelo de Monod.

<b>Vmax</b> <b>(gNO<sub>3</sub><sup>-</sup> /gSSV·d)</b>	<b>Ks</b> <b>(gNO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L)</b>	<b>Correlación</b>
0.33	0.22	0.86

## Anexo F. Imágenes de la experimentación



**Figura 26.** Botellas serológicas de las pruebas en lote.



**Figura 27.** Cinética metanogénica.



**Figura 28.** Determinación de nitratos y nitritos por colorimetría.



**Figura 29.** Determinación de sólidos suspendidos volátiles.



**Figura 30.** Reactor EGSB utilizado para las pruebas en continuo.

## BIBLIOGRAFÍA

Ahn Y.T., Kang S.T., Chae S.R., Lee C.Y., Bae B.U., Shin H.S. (2007). Simultaneous high-strength organic and nitrogen removal with combined anaerobic upflow bed filter and aerobic membrane bioreactor. *Desalination*. 202:114-121.

Akunna J.C., Bizeau C., Moletta R. (1992). Denitrification in anaerobic digesters: possibilities and influence of wastewater COD/N-NO<sub>x</sub> ratio. *Environmental Technology*. 13: 825-836.

Almendariz-Tapia, F.J. (2001). Degradación del alquilbencen sulfonato lineal (LAS) en un reactor acidogénico bioaumentado con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* M113. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México D.F.

Almendariz-Tapia, F.J. (2005). Tratamiento de sosas gastadas en un reactor de lecho expandido de lodos granulares anaerobios (EGSB). Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México D.F.

An Y., Yang F., Wong F.S., Chua H.C. (2008). Simultaneous bioenergy (CH<sub>4</sub>) production and nitrogen removal in a combined upflow anaerobic sludge blanket and aerobic membrane bioreactor. *Energy and Fuels*. 22: 103-107.

Andalib M., Nakhla G., McIntee E., Zhu J. (2011). Simultaneous denitrification and methanogenesis (SDM): Review of two decades of research. *Desalination Elsevier*. doi: 10.1016/j.desal.2011.06.018.

Banihani, R. Sierra-Alvarez, J.A. Field., (2009) Nitrate and nitrite inhibition of methanogenesis during denitrification in granular biofilms and digested domestic sludges. *Springer*. DOI 10.1007/s10532-009-9268-9.

Barber W.P., Stuckey D.C. (2000). Nitrogen removal in a modified anaerobic baffled reactor (ABR):1. *Water Research*. 34(9):2413-2422.

Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, R. I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., Sanders, W. T. M., Siegrist, H., and Vavilin V. A. (2002) Anaerobic Digestion Model No. 1. (ADM1). *J. Env. Eng.* 125 (3): 234-242.

Bernet N., Delgenes N., Akunna J.C., Delgenes J.P., Moletta R. (2000). Combined anaerobic-aerobic SBR for the treatment of piggery wastewater. *Water Research* 34(2): 611-619.

Boone, D. R. (1982) Terminal reactions in the anaerobic digestion of animal waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:57-64.

Castilla-Hernández, P. (2006). Biodegradación anaerobia de compuestos petroquímicos. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F.

Cervantes, C. F., Perez F., y Gomez J. (2000). Avances en la eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales., *Revista Latinoamericana de Microbiología.*, 42 (2): 73-82.

Cervantes, F., J., De la Rosa, D., A. y Gómez, J. (2001). Nitrogen removal from wastewater at low C/N ratios with ammonium and acetate as electron donors. *Bioresource Technology.* 79:165-170.

Chen K.C., Lin Y.F. (1993). The relationship between denitrifying bacteria and methanogenic bacteria in a mixed culture system of acclimated sludges. *Water Research.* 27(12): 1749-1759.

Cheremisinoff P. Nicholas (1996). Biotechnology for waste and wastewater treatment. *Noyes Publications*, Westwood, New Jersey, USA.

Crites, R., Tchobanoglous G. (2000). Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones. *McGraw-Hill Interamericana S.A.*

Cuervo-López, F.M. (2003). Estudio biológico-fisicoquímico de un lodo desnitrificante alimentado con diferentes fuentes de electrones. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Dalsgaard T., Bo Thamdrup y Canfield D. (2005). Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Research in Microbiology*. 156(4):457-464.

De Lucas, A., Rodríguez L., Villaseñor, J. y Fernández, F., J. (2005). Denitrification potential of industrial wastewaters. 39:3715-3726.

Del Pozo R., Diez V. (2003). Organic matter removal in combined anaerobic-aerobic fixed-film bioreactors. *Water Research*. 37:3561-3568.

Dincer Ali R., Kargi Fikret (2000). Kinetics of sequential nitrification and denitrification processes. *Enzyme and Microbial Technology*. 27(1-2): 37-42.

Fama-Graciela. (1998). Caracterización ultraestructural de gránulos anaerobios de reactores UASB industriales operados en mesofilia. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F.

Fux C., Boehler M., Huber P., Brunner I. y 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(3):295-306.

Gharsallah, N., Khannous, L., Souissi N. y Nasri M. (2002). Biological treatment of saline wastewater from marine products processing factories by a fixed-bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 77:865-870.

Guyot, J.P. (1990). Introducción a la Microbiología de los Digestores Anaerobios. *Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales en América Latina*. Ciudad Universitaria, México D. F., 8 y 9 de noviembre.83-95.

Halling S.B. and Jorgensen S.E. (1993). The removal of Nitrogen Compounds from Wastewater, *Studies in Environmental Sciences*, vol. 54. Elsevier Eds.119-138.

Huang J.S., Chou H.H., Chen C.M., Chiang C.M. (2007). Effect of recycle-to-influent ratio on activities of nitrifiers and denitrifiers in a combined UASB-activated sludge reactor system. *Chemosphere*. 68: 382-388.

Hungate, R.E. (1967) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in Microbiology*. Norris, J.R. and Ribbons D. W.(ed.).Academic press. New York, NY, vol. 2:117-130.

Kalyuzhnyi S., Gladchenko M., Mulder A. y Versprille B. (2006). DEAMOX—New biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. *Water Research*. 40(19):3637-3645.

Khin, T. y Annachatre, A., P. (2004). Novel microbial nitrogen removal processes. *Biotechnology Advances*. 22:519-532.

Klüber, H.D. and Conrad, R. (1998) Inhibitory effects of nitrate, nitrite, NO, and N<sub>2</sub>O on methanogenesis by *Methanosarcina barkeri* and *Methanobacterium bryantii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25:331-339.

Lacalle M.L., Villaverde S., Fdez-Polanco F., García-Encina P.A. (2001). Combined anaerobic/aerobic (UASB+UBAF) system for organic matter and nitrogen removal from high strength industrial wastewater. *Water Science and Technology*. 4:255-262.

Laguna A., Ouattara A., González R. O., Barón O., Fama G., El Mamouni R., Guio S., Monroy O. y Macarie H. (1999). A simple and low cost technique for determining the granulometry of upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Wat. Sci. Technol.* 40 (8): 1-8.

Lee, N., M. y Welander, T. (1996). The effect of different carbon sources on respiratory denitrification in biological wastewater treatment. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 82(3):277-285.

- Lettinga G. (1995). Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *Antonie van Leeuwenhoek*. (67): 3-28.
- Lettinga G. (2001). Digestion and degradation, air for life. *Water Science and Technology*. 44(8):157-176.
- Lettinga G., van Velsen A.F.M., Hobma S.W., Zeeuw W. & Klapwijk A. (1980). Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* (22): 699-734.
- Madigan T. M., Martinko M. J. y Parker J. (2004). Brock: Biología de los Microorganismos. Ed. Pearson Educación, S. A. 1096.
- Martínez-Hernández, S. (2003). Estudio del tolueno como fuente de carbono en la desnitrificación en un reactor en continuo. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México D.F.
- McCarty, P. L. (2001) The development of anaerobic treatment and its future. *Water Sci Technol*. 44: 149-156.
- Metcalf & Eddy, Inc. (2003). Wastewater Engineering-Treatment and Reuse, 4th ed., McGraw-Hill, New York, NY.
- Misiti T.M., Hajaya M.G., Pavlostathis S.G. (2011). Nitrate reduction in a simulated free-water surface wetland system. *Water research*. 45: 5587-5598.
- Mosquera-Corral A., Sanchez M., Campos J.L., Mendez R., Lema J.M. (2001). Simultaneous methanogenesis and denitrification of pretreated effluents from a fish canning industry. *Water Research*. 35-2: 411-418.
- Mulder A., van de Graaf A. A., Robertson L. A. y Kuenen J. G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*. 16(3):177-183.

Pacheco J., Pat R., Cabrera A. (2002). Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Ingeniería*. 6-3: 73-81.

Parawira W. (2004). Anaerobic treatment of agricultural residues and wastewater: Application of high-rate reactors. Doctoral dissertation. Department of Biotechnology. Faculty of Engineering, Lund University. 91-89627-28-8: 53

Peng Y., Zhang S., Zeng W., Zheng S., Mino T., Satoh H. (2008). Organic removal by denitrification and methanogenesis and nitrogen removal by nitrification from landfill leachate. *Water Research*. 42:883-892.

Plascencia-Jatomea, R. (2010) Caracterización y tratamiento de efluentes generados en el proceso de aprovechamiento de crustáceos para la obtención de productos de alto valor agregado. Tesis de maestría. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.

Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. (1999). Microbiología. Editorial McGraw-Hill-Interamericana.

Reyes, J. A. (2000). Eliminación biológica de nitrógeno, carbono y azufre por desnitrificación. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.

Rittmann, B. E. and McCarty, P. L. (2001) Environmental Biotechnology: Principles and Applications, New York, NY:McGraw Hill. 126.

River Luis, Aspe Estrella, Roeckel Marlene, Mart M. Cristina (1998). Evaluation of Clean Technology Processes in the Marine Products Processing Industry. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 73: 217-226.

Roy R., Conrad R. (1999). Effect of methanogenic precursors (acetate, hydrogen, propionate) on the suppression of methane production by nitrate in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 28:49-61.

Ruiz G., Jeison D., Chamy R. (2006). Development of denitrifying and methanogenic activities in USB reactors for the treatment of wastewater: effect of COD/N ratio. *Process Biochemistry*. 41: 1338-1342.

Rustrian E., Delgenes J.P., Bernet N., Moletta R. (1997). Nitrate reduction in acidogenic reactor: influence of wastewater COD/N-NO<sub>3</sub> ratio on denitrification and acidogenic activity. *Environmental Technology*. 18: 309-315.

Saval, S. y Noyola, A. (1992). Aportaciones de la Biotecnología al Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales. *Biotecnología*. 2: 155-172.

Scheid D., Strubner S., Conrad R. (2003). Efectos of nitrate and sulfate amendment in the methanogenic populations in rice root incubations. *FEMS Microbiology Ecology*. 43: 309-315.

Schocher, R. J., Seyfried, B., Vazquez, F. and Zeyer, J. (1991). Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 175: 7-12.

Seghezzi L., Zeeman G., Van Liel J., Hamelers H., Lettinga G. (1998) A review: the anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology*. 65: 175-190.

Shin H.S., Kim K.Y., Lee C.Y., Kang S.K. (2002). Effect of alkalinity and substrate on simultaneous denitrification and methanogenesis, WEF Proceeding. toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 175: 7-12.

Speece R. E. (1996). Anaerobic biotechnology: For industrial wastewater. *Ed. Archea Press*, Nashville, Tennessee, USA. 274-286.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995). 19th edn. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.

- Tai C.S., Singh K.S., Grant S.R. (2006). Combined removal of carbon and nitrogen in an integrated UASB-jet loop reactor bioreactor system. *Journal of Environmental Engineering*. 624-637.
- Thauer R. K., Möller-Zinkhan D. y Spormann A. M. (1989). Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 43-67.
- Tugtas A. Evren, Tezel U., Pavlostathis Spyros G. (2009). A Comprehensive Model of Simultaneous Denitrification and Methanogenic Fermentation Processes. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 105(1): 98-108
- Van Lier J.B., Van Der Zee F.P., Tan N.C.G., Rebac S. & Kleerebezem R. (2001b). Advances in high rate anaerobic treatment: staging of reactor systems. *Wat. Sci. Technol.* (44): 15-25.
- Van Loosdrecht M.C.M. y Jetten M.S.M. (1998). Microbiological conversions in nitrogen removal., *Water Science and Technology.*, 38(1): 1-7.
- Vang Hendriksen H., Ahring B.K. (1996). Integrated removal of nitrate and carbon in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor: operating performance. *Water Research*. 30-6: 1451-1458.
- Vidal, G., Aspé, E., Marti, M., C. y Poeckel, M. (1997). Treatmente of recycled wastewater from fishmeal factory by an anaerobic filter. *Biotechnology Letters*. 19:117-121.
- Visser A. (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Ph. D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Netherlands.
- Weston, R.F. (1984). Inc.: Advanced waste treatment performance evaluation summary report, USEPA. 68-03-3019.
- Williams, R.T. and Crawford, R.L. (1985) Methanogenic bacteria, including acid-tolerant strain, from peatlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1542-1544.

Young-Ho, Ahn (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*. 41:1709-1721.

Zhang D.J. (2003). The integration of methanogenesis with denitrification and anaerobic ammonium oxidation in an expanded granular sludge bed reactor. *Journal of Environmental Science*. 15-3: 423-432.

Zhang, X., Zhou, J., Guo, H., Qu, Y., Liu, G. y Zhao, L. (2007). Nitrogen removal performance in a novel combined biofilm reactor. 42:620-626.

Zinder, S. H. (2003) Physiological ecology of methanogens. In: Methanogenesis: Ecology, Physiology. *Biochemistry and Genetics*. 128-206.

Zinder, S. H. T, Anguish, T., and Cardwell, S. C. (1984) Selective inhibition by 2-bromoethanesulfonate of methanogenesis from acetate in a thermophilic anaerobic digester. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1343-1345.

Zoutberg G.R. & Eker Z. (1999). Anaerobic treatment of potato processing wastewater. *Water Science and Technology*. 40: 297-304.

Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(4): 533-616.