



Universitat de Girona

**DESARROLLO DEL PROCESO ANAMMOX PARA EL
TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS : PUESTA EN
MARCHA Y APLICACIÓN**

Helio LÓPEZ CASTILLO

ISBN: 978-84-692-1407-7

Dipòsit legal: GI-147-2009



***Desarrollo del Proceso Anammox
para el Tratamiento de Lixiviados:
Puesta en Marcha y Aplicación***

Helio López Castillo

Tesis Doctoral

Girona, 1 de diciembre de 2008

MARIA DOLORS BALAGUER CONDOM i JESÚS COLPRIM GALCERAN,

Professors del Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia
Agroalimentària de la **Universitat de Girona**

CERTIFIQUEN

Que el llicenciat **Helio López Castillo** ha dut a terme, sota la seva direcció, el treball que, amb el títol: *Desarrollo del Proceso Anammox para el Tratamiento de Lixiviados: Puesta en Marcha y Aplicación*, presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctor per la **Universitat de Girona**.

I perquè en prenguem coneixement i tingui els efectes que correspongui, presentem davant la **Facultat de Ciències de la Universitat de Girona** l'esmentada Tesi, signant aquesta certificació a

Maria Dolors Balaguer Condom

Jesús Colprim Galceran

Girona, 21 d'octubre de 2008

“El éxito es aprender a ir de fracaso en fracaso sin desesperarse”

Winston Churchill

*“Hay que sentir y soñar cada momento, hasta que el tiempo nos arrebatte la vida,
intentando ahogar nuestra condena en felicidad”*

Alberto Suárez Granel

Agraïments

Acabada la meua etapa d'estudiant, se'm va donar l'oportunitat de formar part del grup de recerca **LEQUIA** de la **Universitat de Girona**. A dia d'avui, puc dir amb tota sinceritat que no em vaig equivocar de la decisió presa. I no només ho dic per la formació acadèmica i professional rebuda, sinó per la qualitat humana de les persones que en formen part. Per a mi, això és el més important.

Per tot això, **Marilós** i **Jesús**, moltes gràcies per la vostra confiança i el vostre suport per tirar endavant aquest projecte. Tinc clar que sense la vostra dedicació aquesta tesi no hagués estat possible. Ha estat un plaer treballar amb vosaltres.

A més a més, vull donar les gràcies a tots els membres del **LEQUIA**, joves i no tan joves, savis i no tan savis, que en un moment o un altre heu fet que la investigació no hagi estat només la posada en marxa d'un procés o "*a quant estem de nitrit?*", sinó compartir dia a dia els bons moments, els neguits, les alegries i les preocupacions. La llista és interminable, donaria com a mínim per escriure un altre capítol d'aquesta tesi i, per tant, per por a oblidar-me a algú no ho faré. Espero que no es molesti ningú. Com diu el grup Antònia Font: "*vos estim a tots iguals*". **Tots i totes heu aportat el vostre granet de sorra per fer-me la vida més fàcil**. També, vull donar les gràcies a l'**Àlex** i en **Joan** per la seva ajuda en els aspectes microbiològics d'aquesta tesi i en general, a tota la comunitat que pertany i treballa a la **Facultat de Ciències** (professors, becaris, laborants, alumnes, conserges, personal del bar,...).

No obstant això, vull fer constar que quan comences a formar part d'una institució o empresa tens companys de feina, però amb el pas del temps, alguns es converteixen en amics per a tota la vida. Moltes gràcies **Christian, Lluís, Francesc, Peter** i **Oriol**.

En aquest sentit, seria injust no donar les gràcies al meu "pica-pedrer". **Sebas**, gràcies pel teu temps, per ajudar-me sempre que ho he necessitat, per ser un amic com cal i per moltes més coses. Diuen que: "*El verdadero amigo jamás se interpone en tu camino, a menos que vayas cayendo cuesta abajo*". Moltes gràcies amic. A més, també voldria donar les gràcies a en **Ramon** i en **Maël** perquè som molt més que companys de projecte. Gràcies amics.

Finalment, dir que formar part del **LEQUIA** m'ha permès conèixer i treballar amb persones d'altres universitats i centres de recerca, així com assistir a congressos, on, a part d'aprendre, hem compartit molts bons moments. La llista també és llarguíssima, així doncs, gràcies a tots amb els que he coincidit a Cracòvia, Baltimore, Barcelona, Roma i Florència, especialment a l'**Albert Magrí** per la col·laboració realitzada, que va donar lloc al meu primer article i a la meua primera assistència a un congrés.

També vull donar les gràcies a l'empresa **CESPA** en general i a les persones que formen part del Departament d'I+D per confiar en nosaltres i fer possible que els projectes en que he participat arribessin a bon port. Moltes gràcies tant pel finançament rebut com per les ganes d'aprendre i d'avançar conjuntament.

Dins de l'àmbit professional, i ja per acabar, vull donar les gràcies a l'espècie **Candidatus Brocadia anammoxidans** per estar al meu costat durant aquests últims anys. Sense la teva existència i posterior creixement, aquesta tesi no hagués estat possible. Hem compartit molts bons moments (detecció per consum d'amoni i de nitrit, detecció PCR, FISH,...) i alguns no tant bons (entrada d'oxigen al reactor, acumulació de nitrit,...). En definitiva, espero que continuïs amb nosaltres durant molt de temps i que t'acostumis ràpidament als lixiviats d'abocador.

En l'àmbit més personal, m'agradaria donar les gràcies als **amics de tota la vida** (Tito, Pere, Carlos, Juanvi, Jordi, Miki, Juanjo,...), **als companys de futbol** (Gomis, Josep, Salvi, Joan, Pinki, Jordi, Àngel, Sisu, ...), **als companys de classe** (Marc, Miquel, Pompeu, Anna, Elena,...), **als companys d'anglès** (Quim, Lluís,...), a l'**Alberto** i en **Julen** (els nostres amics bascos), a l'**Adama Traore** (*el amigo cabrón*), a l'**Aleix de Ca l'Andreu**, a la **Gemma Riera**, a en **Juan Ribas**, a en **Solares**, a en **Recio**, a tota la gent que ha passat pel **BAR FIBRACOLOR** i a un llarg etc. per totes les estones viscudes. Son interminables els records i anècdotes que han fet que arribar fins aquí hagi estat molt més divertit.

Finalment, agrair de tot cor als **meus pares**, als **meus tiets**, als **meus germans** amb les seves respectives parelles, als **meus sogres** i a la resta de la **meva família** pel fet d'estar quan els he necessitat. Simplement per això sou una part importantíssima de la meva vida.

I a tu, **Mònica**, mil gràcies per ajudar-me en tots els àmbits de la vida. Gràcies per compartir la teva vida amb mi. Gràcies per tirar endavant en moments difícils. Gràcies per estirar-me les orelles quan calia. Gràcies per entendre'm durant tots aquests anys. En definitiva, gràcies per estimar-me com m'estimes.

Helio López Castillo

Blanes, 28 d'octubre de 2008

RESUMEN

La eliminación biológica de nitrógeno amoniacal se ha llevado a cabo, habitualmente, a través del proceso convencional de nitrificación-desnitrificación. Sin embargo, los lixiviados generados en los depósitos controlados de residuos sólidos urbanos contienen elevadas cantidades de amonio y bajas concentraciones de materia orgánica biodegradable, así como una elevada salinidad. En este caso, para reducir el elevado coste económico que supone aplicar los procesos convencionales en este tipo de efluentes es conveniente desarrollar sistemas alternativos.

Uno de estos nuevos procesos biológicos se basa en el proceso **anammox** (acrónimo en inglés de *anaerobic ammonium oxidation*) previa nitrificación parcial de amonio a nitrito. El proceso **anammox** es un proceso autotrófico que realiza la conversión de amonio y nitrito a nitrógeno gas bajo condiciones anaerobias. El menor consumo de oxígeno durante el proceso de nitrificación parcial y la no necesidad de adicionar materia orgánica para desnitrificar representan un importante ahorro económico respecto a los tratamientos convencionales.

Este trabajo se centra en el estudio del proceso **anammox** y se enmarca dentro del proyecto europeo CLONIC (acrónimo en inglés de *CLOsing the Nitrogen Cycle from urban landfill leachate by biological nitrogen removal over nitrite and thermal treatment*). El proyecto CLONIC (LIFE 03 ENV/000140, 2003-2007), financiado por la Unión Europea dentro del programa LIFE-Medio Ambiente ha sido llevado a cabo por la empresa CESP, en colaboración con el Laboratorio de Ingeniería Química y Ambiental (LEQUIA) de la Universidad de Girona y la Fundación Agbar (Aguas de Barcelona) para minimizar el impacto económico y ambiental del tratamiento de lixiviados.

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la operación y la aplicación del proceso **anammox** para la eliminación del nitrógeno amoniacal de los lixiviados de vertedero. Para alcanzar este objetivo se ha llevado a cabo la puesta en marcha y enriquecimiento de la biomasa **anammox** en un reactor SBR (acrónimo en inglés de *Sequencing Batch Reactor*) a partir de una mezcla de fangos activos procedentes de distintas estaciones depuradoras de aguas residuales.

Una de las premisas más importantes para enriquecer un reactor **anammox** es que el inóculo seleccionado contenga bacterias **anammox**. Así, en primer lugar, se realizaron estudios previos que demostraron que la mayoría de los lodos seleccionados presentaban actividad **anammox** después de unos meses de enriquecimiento. Una vez seleccionado el inóculo, se identificaron las condiciones de operación óptimas para realizar la puesta en marcha del proceso

anammox con especial énfasis en la configuración del ciclo de operación, el mantenimiento de las condiciones anaerobias, la composición del alimento sintético y la estrategia de alimentación.

La estrategia de enriquecimiento se basaba en aplicar, inicialmente, un alimento sintético con una relación molar nitrito:amonio inferior a la estequiométrica (0.76 moles NO_2^- por mol de NH_4^+) y una carga de nitrógeno de $0.02 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ para minimizar la presencia de nitrito en el reactor, tóxico para las bacterias **anammox**. Así, el día 60 de operación, el consumo de amonio y nitrito demostró la presencia de actividad **anammox**, que se corroboró mediante el resultado positivo de la técnica de detección molecular PCR (acrónimo en inglés de *Polymerase Chain Reaction*), identificándose a la especie **anammox** como *Candidatus* Brocadia anammoxidans.

Una vez detectada la actividad **anammox** se incrementó tanto la relación molar nitrito:amonio como la carga de nitrógeno aplicada, hasta llegar a operar con la relación estequiométrica (1.32 moles NO_2^- por mol de NH_4^+) y aplicar una carga de nitrógeno máxima de $1.60 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, obteniéndose porcentajes de eliminación de amonio y nitrito superiores al 99% al cabo de un año de iniciarse el estudio.

Cabe matizar que durante el enriquecimiento del proceso se han aplicado una serie de herramientas para realizar el seguimiento y verificar la actividad de la biomasa **anammox**. Estas técnicas se han basado en la comparación de las relaciones estequiométricas entre el nitrito y el amonio consumidos y entre el nitrato producido y el amonio consumido obtenidas experimentalmente con las relaciones teóricas. Además, también se ha realizado el seguimiento del pH y la determinación de la actividad específica de las bacterias **anammox**.

Una vez realizada la puesta en marcha de un reactor **anammox** con un afluente sintético, se aplicó esta tecnología al tratamiento de lixiviados de vertedero, previamente acondicionados mediante un proceso de nitrificación parcial, aplicándose la misma estrategia que la utilizada para enriquecer la biomasa **anammox**.

Después de un periodo de adaptación se consiguió aplicar una carga media de nitrógeno de $0.28 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. Sin embargo, la presencia de materia orgánica biodegradable permitió el desarrollo de bacterias desnitrificantes heterotróficas. Estas bacterias eliminaban parte del nitrato generado por el proceso **anammox** y utilizaban el nitrito como sustrato, provocando una competencia entre ambos procesos. La evaluación de la coexistencia de estas dos comunidades bacterianas se realizó a partir del seguimiento de las relaciones estequiométricas entre los compuestos nitrogenados y del pH. Un consumo más elevado de nitrito, de nitrato y de protones

adicionados durante el control de pH corroboró la presencia de los organismos desnitrificantes heterotróficos en el reactor **anammox**.

A partir de los balances de amonio, nitrito y nitrato y teniendo en cuenta tanto el crecimiento de la biomasa heterotrófica como el consumo y generación de los diferentes compuestos de nitrógeno se cuantificó la contribución de cada proceso (**anammox** y desnitrificación heterotrófica) en la eliminación total de nitrógeno, que fue del 83.5%. Este nitrógeno se eliminaba, principalmente, a través del proceso **anammox** (79.7%) debido a que la baja biodegradabilidad de la materia orgánica limitaba su eliminación a través del proceso de desnitrificación heterotrófica (20.3%).

Como conclusión final, se ha conseguido enriquecer con éxito la biomasa **anammox** a partir de una mezcla de fangos de depuradora y posteriormente, se ha aplicado este proceso para el tratamiento de lixiviados de vertedero. Sin embargo, es necesario continuar realizando estudios a escala de laboratorio y de planta piloto para poder aplicar esta tecnología a escala industrial minimizando el impacto económico y ambiental.

RESUM

L'eliminació biològica de nitrogen amoniacal s'ha dut a terme, habitualment, mitjançant el procés convencional de nitrificació-desnitrificació. No obstant això, els lixiviats generats als dipòsits controlats de residus sòlids urbans contenen elevades quantitats d'amoni i baixes concentracions de matèria orgànica biodegradable, així com una elevada salinitat. En aquest cas, per reduir l'elevat cost econòmic que suposa aplicar els processos convencionals en aquest tipus d'efluents, és convenient desenvolupar sistemes alternatius.

Un d'aquests nous processos biològics es basa en el procés **anammox** (acrònim en anglès de *anaerobic ammonium oxidation*) prèvia nitritació parcial d'amoni a nitrit. El procés **anammox** elimina l'amoni i el nitrit a nitrogen gas sota condicions anaeròbies. El menor consum d'oxigen durant el procés de nitritació parcial i la no necessitat d'addicionar matèria orgànica per desnitrificar representen un important estalvi econòmic respecte als tractaments convencionals.

Aquest treball se centra en l'estudi del procés **anammox** i s'emmarca dins del projecte europeu CLONIC (acrònim en anglès de *CLOsing the Nitrogen Cycle from urban landfill leachate by biological nitrogen removal over nitrite and thermal treatment*). El projecte CLONIC (LIFE 03 ENV/000140, 2003-2007), finançat per la Unió Europea dins del programa LIFE-Medi Ambient ha estat dut a terme per l'empresa CESPÀ, en col·laboració amb el Laboratori d'Enginyeria Química i Ambiental (LEQUIA) de la Universitat de Girona i la Fundació Agbar (Aigües de Barcelona) per minimitzar l'impacte econòmic i ambiental del tractament de lixiviats.

L'objectiu principal d'aquest treball és l'estudi de l'operació i l'aplicació del procés **anammox** per a l'eliminació del nitrogen amoniacal dels lixiviats d'abocador. Per assolir aquest objectiu s'ha dut a terme la posada en marxa i l'enriquiment de la biomassa **anammox** en un reactor SBR (acrònim en anglès de *Sequencing Batch Reactor*) a partir d'una barreja de fangs actius procedents de diferents estacions depuradores d'aigües residuals.

Una de les premisses més importants per enriquir un reactor **anammox** és que l'inòcul seleccionat contingui bacteries **anammox**. Així, en primer lloc, es van realitzar estudis previs que van demostrar que la majoria dels fangs seleccionats presentaven activitat **anammox** després d'uns mesos d'enriquiment. Un cop seleccionat l'inòcul, es van identificar les condicions d'operació òptimes per realitzar la posada en marxa d'un reactor **anammox** amb

especial èmfasi en la configuració del cicle d'operació, el manteniment de les condicions anaeròbies, la composició de l'aliment sintètic i l'estratègia d'alimentació.

L'estratègia d'enriquiment es basava en aplicar, inicialment, un aliment sintètic amb una relació molar nitrit:amoni inferior a l'estequiomètrica (0.76 mols NO_2^- por mol de NH_4^+) i una càrrega de nitrogen de $0.02 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ per minimitzar la presència de nitrit en el reactor, tòxic per a les bacteries **anammox**. Així, el dia 60 d'operació, el consum d'amoni i nitrit va demostrar la presència d'activitat **anammox**, que es va corroborar mitjançant el resultat positiu de la tècnica de detecció molecular PCR (acrònim en anglès de *Polymerase Chain Reaction*), identificant-se l'espècie **anammox** com *Candidatus Brocadia anammoxidans*.

Una vegada detectada l'activitat **anammox** es va incrementar tant la relació molar nitrit:amoni com la càrrega de nitrogen aplicada, fins arribar a operar amb la relació estequiomètrica (1.32 mols NO_2^- por mol de NH_4^+) i aplicar una càrrega de nitrogen màxima de $1.60 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, obtenint-se percentatges d'eliminació d'amoni i nitrit superiors al 99% després d'un any d'iniciar-se l'estudi.

Cal remarcar que durant l'enriquiment de la biomassa **anammox** s'han aplicat una sèrie d'eines per realitzar el seguiment i la verificació de la seva activitat. Aquestes tècniques s'han basat en la comparació de les relacions estequiomètriques entre el nitrit i l'amoni consumits i entre el nitrat produït i l'amoni consumit obtingudes experimentalment amb les relacions estequiomètriques teòriques. A més, també s'ha realitzat el seguiment del pH i la determinació de l'activitat específica de les bacteries **anammox**.

Un cop realitzada la posada en marxa del reactor SBR **anammox** amb medi sintètic, es va aplicar aquesta tecnologia al tractament de lixiviats d'abocador, prèviament condicionats mitjançant un procés de nitritació parcial, aplicant-se la mateixa estratègia que la utilitzada per enriquir la biomassa **anammox**.

Després d'un període d'adaptació es va aconseguir aplicar una càrrega mitjana de nitrogen de $0.28 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. No obstant això, la presència de matèria orgànica biodegradable va permetre el desenvolupament de bacteries desnitrificants heterotròfiques. Aquestes bacteries eliminaven part del nitrat generat pel procés **anammox** i utilitzaven el nitrit com a substrat, provocant una competència per aquest últim entre ambdós processos. L'avaluació de la coexistència d'aquestes dues comunitats bacterianes es va realitzar a partir del seguiment de les relacions estequiomètriques entre els compostos nitrogenats i del pH. Un consum més elevat de

nitrit, de nitrat i de protons adicionats durant el control de pH van corroborar la presència dels organismes desnitrificants heterotròfics en el reactor **anammox**.

A partir dels balanços d'amoni, nitrit i nitrat, i tenint en compte tant el creixement de la biomassa heterotròfica com el consum i generació dels diferents compostos de nitrogen, es va quantificar la contribució de cada procés (**anammox** i desnitrificació heterotròfica) en l'eliminació total de nitrogen, que va ser del 83.5%. Aquest nitrogen s'eliminava, principalment, a través del procés **anammox** (79.7%) donat que la baixa biodegradabilitat de la matèria orgànica limitava la seva eliminació a través del procediment de desnitrificació heterotròfica (20.3%).

Com a conclusió final, s'ha aconseguit enriquir amb èxit la biomassa **anammox** a partir d'una barreja de fangs de depuradora i, posteriorment, s'ha aplicat aquest procediment pel tractament de lixiviats d'abocador. Tot i això, és necessari continuar realitzant estudis a escala de laboratori i de planta pilot per poder aplicar aquesta tecnologia a escala industrial minimitzant l'impacte econòmic i ambiental.

SUMMARY

Biological nitrogen removal has traditionally been performed by the conventional nitrification-denitrification process. Leachates generated in urban solid waste landfills are characterized by high ammonia concentration and low biodegradable organic matter content, as well as high salinity. In order to reduce the economic costs associated with the conventional process currently used for this kind of effluents, it is necessary to develop alternative treatment procedures.

One of these alternative biological systems is the **anammox** (*anaerobic ammonium oxidation*) process, previous partial nitrification from ammonia to nitrite. It is an autotrophic process that converts ammonia and nitrite to dinitrogen gas under anaerobic conditions. When compared to conventional treatments, the combined partial nitrification and **anammox** processes have lower dissolved oxygen consumption for partial nitrification and organic matter is no longer needed for autotrophic denitrification.

This work is focused on the **anammox** process within the CLONIC (*CLOsing the Nitrogen Cycle from urban landfill leachate by biological nitrogen removal over nitrite and thermal treatment*) framework. The CLONIC project, funded by the European Union within the LIFE program (LIFE 03 ENV/000140, 2003-2007), has been implemented by the CESPAs group in collaboration with both the Chemical and Environmental Engineering Laboratory (LEQUIA) at the University of Girona and the Agbar Foundation. The aim of the overall project is to minimize the economic and environmental impact of landfill leachate treatment.

The main objective of the present work is to study the operation and implementation of the **anammox** process to remove ammonia in landfills. To that end, an **anammox** SBR (*sequencing batch reactor*) was started up with activated sludge from different wastewater treatment plants.

To ensure that the **anammox** bacteria were present in the activated sludge sample, they were inoculated during some months to guarantee their activity. Once the needed inoculation was tested, the optimal conditions to start up the reactor were identified. Special attention was paid to the operation cycle configuration, the maintenance of anaerobic conditions, synthetic food composition and the feed strategy.

The feed strategy was based on applying a synthetic media with a nitrite-to-ammonium molar ratio of 0.76 mole $\text{NO}_2^- \cdot \text{mole}^{-1} \text{NH}_4^+$ and a nitrogen loading rate of $0.02 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ to minimize the nitrite accumulation in the reactor and thus avoid its toxic effects on the **anammox** community. Accordingly, ammonia and nitrite consumptions were observed on the

60th day of operation and the presence of **anammox** bacteria was confirmed. Their activity was tested using PCR (*Polymerase Chain Reaction*) with a positive result identifying *Candidatus Brocadia anammoxidans*.

Once the **anammox** activity was detected, the nitrite-to-ammonium molar ratio and the nitrogen loading rate were increased until the operational stoichiometric ratio of 1.32 mole NO₂⁻ ·mole⁻¹ NH₄⁺ and a nitrogen loading rate of 1.60 kg N·m⁻³·d⁻¹ were achieved. After one year of operation under these conditions an ammonium and nitrite removal percentage of over 99% was achieved.

During the enrichment of the **anammox** bacteria a wide range of tools was applied to both monitor and verify the **anammox** activity. The applied techniques were based on a comparison of experimental and theoretical stoichiometric ratios between nitrite to ammonium conversion and nitrate production to ammonium conversion. Furthermore, pH and specific activity of the **anammox** bacteria was included in the study

Once the **anammox** biomass enrichment was achieved, the same methodology was applied and the same feed strategy was used to treat the urban landfill leachate. The results showed that after an adaptation period, it was possible to apply an average nitrogen loading rate of 0.28 kg N·m³·d⁻¹. However, the presence of biodegradable organic matter promoted the development of heterotrophic denitrifying bacteria that removed part of the nitrate generated by the **anammox** process and caused nitrite competition between both communities. The assessment of this coexistence of bacteria was based on stoichiometric ratios between nitrogen compounds. The presence of heterotrophic denitrification organisms in the **anammox** reactor was corroborated by higher nitrate and nitrite consumptions and the quantity of additional protons provided by the pH control.

The total contribution of both processes (**anammox** and heterotrophic denitrification) to total nitrogen removal efficiency was quantified (83.5%) through mass balances considering the ammonia, the nitrite and the nitrate consumption and generation rates. After this study, it was concluded that the nitrogen was mainly removed by the **anammox** process (79.7%) and that the low organic matter biodegradability limited the nitrogen removal via heterotrophic denitrification to 20.3%.

In conclusion, the enrichment of the **anammox** process was successfully achieved with a mixed activated sludge biomass from wastewater treatment plants. Next, the process was applied to urban landfill leachate treatment. Nevertheless, there is a need for further lab-scale and pilot plant research in order to successfully apply this technology on a full scale.

INDICE

Resumen	i
Resum	v
Summary	ix
Índice de Contenidos.....	xi
Índice de Figuras	xv
Índice de Tablas.....	xix
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Agua: recurso esencial para la vida	1
1.2 El ciclo del Nitrógeno.....	3
1.3 Problemática del Nitrógeno	5
1.4 Sistemas convencionales de eliminación de nitrógeno.....	7
1.4.1 Procesos físico-químicos.....	7
1.4.2 Eliminación biológica de nitrógeno. Nitrificación-Desnitrificación	8
1.5 Efluentes con elevada carga amoniacal. Lixiviados de vertedero	11
1.6 El proyecto CLONIC.....	16
1.7 Proceso anammox.....	18
1.7.1 Antecedentes y características del proceso anammox.....	18
1.7.2 Microbiología del proceso anammox	21
1.7.3 Bioquímica del proceso anammox	22
1.7.4 Localización de las bacterias anammox	24
1.7.5 Factores que afectan a la actividad de las bacterias anammox.....	25
1.7.5.1 Efecto del pH	26
1.7.5.2 Efecto de la temperatura	26
1.7.5.3 Efecto de la concentración de oxígeno disuelto.....	27
1.7.5.4 Efecto de la velocidad de agitación	27
1.7.5.5 Efecto de la concentración de sustrato y producto.....	27
1.7.5.6 Efecto de la materia orgánica.....	28
1.7.6 Tecnologías aplicadas para operar reactores anammox	30
1.7.7 Proceso combinado de nitrificación parcial y anammox.....	35
1.7.7.1 Nitrificación parcial	35
1.7.7.2 Procesos de una etapa	37
1.7.7.3 Procesos de dos etapas	38
1.8 La tecnología SBR aplicada al proceso anammox	40

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	43
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1 Instalación experimental.....	49
3.1.1 Planta Piloto 20L.....	49
3.1.1.1 Procedimiento experimental	51
3.1.1.2 Inóculo	52
3.1.1.3 Afluente: Medio Sintético.....	53
3.1.2 Fermentador 2L.....	53
3.1.2.1 Procedimiento experimental	55
3.1.2.2 Inóculo	55
3.1.2.3 Afluente: Medio Sintético y Lixiviado tratado	55
3.2 Métodos analíticos.....	56
3.2.1 Determinación de Sólidos en Suspensión Totales (SST)	56
3.2.2 Determinación de Sólidos en Suspensión Volátiles (SSV)	57
3.2.3 Determinación de compuestos de carbono.....	57
3.2.3.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)	57
3.2.3.2 Determinación de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO).....	58
3.2.3.3 Determinación del Carbono Orgánico Total (COT), del Carbono Inorgánico (CI) y del Carbono Total (CT).....	59
3.2.4 Determinación de la alcalinidad.....	60
3.2.5 Determinación de la concentración de amonio (N-NH ₄ ⁺)	60
3.2.6 Determinación del Nitrógeno Kjeldahl Total (TKN)	61
3.2.7 Determinación de la concentración de nitrito y nitrato	62
3.2.8 Determinación de la actividad específica de las bacterias anammox.....	63
3.2.9 Técnicas moleculares: PCR y FISH	65
CAPÍTULO 4. PUESTA EN MARCHA DEL PROCESO ANAMMOX	67
4.1 Estudios previos: Localización de las bacterias anammox.....	69
4.2 Condiciones de operación del proceso SBR-anammox.....	71
4.2.1 Configuración del ciclo de operación.....	72
4.2.2 Condiciones anaerobias.....	73
4.2.3 Características del alimento sintético	73
4.2.4 Parámetros operacionales: pH y temperatura.....	74
4.2.5 Inóculo del SBR-anammox	74
4.3 Puesta en marcha y enriquecimiento de las bacterias anammox	75
4.3.1 Período 1: Arranque del proceso anammox (0-78 días).....	76

4.3.2 Período 2: Enriquecimiento del proceso anammox con baja carga de nitrógeno (79-225 días)	79
4.3.3 Período 3: Enriquecimiento del proceso anammox con alta carga de nitrógeno (226-365 días)	80
4.3.4 Caracterización de las bacterias anammox.....	83
4.4 Herramientas para realizar el seguimiento del proceso anammox	84
4.4.1 Técnicas moleculares: PCR y FISH.....	84
4.4.2 Relaciones estequiométricas. Consumo amonio versus consumo de nitrito y producción de nitrato.....	86
4.4.3 Análisis de un ciclo operacional. Determinación de las velocidades de reacción	88
4.4.4 Seguimiento de la actividad anammox a partir del pH	90
4.4.5 Determinación de la Actividad Específica de la biomasa Anammox	91
4.5 Discusión y conclusiones	92
CAPÍTULO 5. APLICACIÓN DEL PROCESO ANAMMOX PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS.....	97
5.1 Estabilización del proceso anammox con medio sintético	100
5.2 Aplicación de lixiviados al proceso anammox	102
5.3 Evaluación de los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica.....	107
5.4 Cuantificación de los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica..	110
5.5 Discusión y conclusiones	113
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	117
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	123
CAPÍTULO 8. ANEXO.....	141

Índice de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 Planta de tratamiento de aguas residuales.....	2
Figura 1.2 Esquema del ciclo del nitrógeno. (Adaptado de Dapena-Mora, 2007).....	4
Figura 1.3 Eutrofización de las aguas de un lago.....	6
Figura 1.4 Esquema de un vertedero de residuos sólidos urbanos (Jiménez, 2007)	12
Figura 1.5 Ruta metabólica del proceso anammox a partir de los intermedios de reacción: hidroxilamina (NH ₂ OH) e hidracina (N ₂ H ₄) (Schalk <i>et al.</i> , 2000).	22
Figura 1.6 Esquema de los componentes celulares presentes en las bacterias anammox (Van Niftrik <i>et al.</i> , 2004).	23
Figura 1.7 Mecanismo de la reacción anammox en la membrana del <i>anammoxosoma</i> . HZO: hidracina oxidasa; hh: hidracina hidrolasa; nir: nitrito reductasa. (Adaptado de Van Niftrik <i>et al.</i> , 2004).	24
Figura 1.8 Efecto de la temperatura sobre el TRC _{mínimo} de las bacterias amonio y nitrito oxidantes.....	36
Figura 1.9 Comparativa del consumo de oxígeno y de materia orgánica, así como de la cantidad de biomasa generada entre el proceso convencional de nitrificación-desnitrificación (izquierda) y el proceso combinado de nitrificación parcial y anammox (derecha). (Adaptado de Fux <i>et al.</i> , 2002).	39
Figura 1.10 Etapas de un ciclo de operación típico en un reactor SBR.	40

Capítulo 3

Figura 3.1 Esquema planta piloto (izquierda). Fotografía reactor SBR 20L (derecha).	49
Figura 3.2 Fotografía general del panel de control (izquierda) y del interior del cuadro de control (derecha).....	50
Figura 3.3 Pantalla principal del programa SBR (izquierda). Pantalla del seguimiento de los parámetros operacionales del proceso anammox (derecha).....	51
Figura 3.4 Configuración del ciclo de trabajo utilizado para operar el proceso anammox.....	52
Figura 3.5 Fotografía fermentador SBR 2L utilizado para el tratamiento de lixiviados.	54
Figura 3.6 Cromatograma de una muestra patrón.	62

Capítulo 4

Figura 4.1 Evolución de la carga de nitrógeno aplicada y del nitrógeno descargado durante la puesta en marcha del proceso anammox.....	76
--	----

Figura 4.2 Evolución de la carga de nitrógeno aplicada y de la acumulación de nitrógeno durante el arranque del proceso anammox (Período 1).	77
Figura 4.3 Evolución de los compuestos nitrogenados durante el primer período, arranque del proceso anammox (días 0-78).....	78
Figura 4.4 Evolución de la carga de nitrógeno aplicada y de la carga de nitrógeno en el efluente durante el segundo período.....	79
Figura 4.5. Evolución de los compuestos nitrogenados durante el segundo período (días 79-225).....	80
Figura 4.6 Evolución de los compuestos nitrogenados durante el tercer período (días 226-365).	81
Figura 4.7 Evolución de la carga de N aplicada, de la carga de N en el efluente y de la carga de N eliminada durante el tercer período.....	81
Figura 4.8 Evolución del pH durante los tres periodos de estudio.....	82
Figura 4.9 Fotografía de la biomasa granular anammox durante el ensayo realizado.	83
Figura 4.10 Fotografía de la biomasa granular anammox realizada meses después del enriquecimiento de las bacterias anammox. Escala: 1 mm.....	84
Figura 4.11 Microfotografía FISH generada con la sonda Amx820-Cy3 (color rosado) respecto al total de bacterias (Eubacteria, Eub338-(I-II-III)) el día 365 de estudio. Escala: 10 μ m (López <i>et al.</i> , 2008).....	86
Figura 4.12 Evolución del consumo de amonio y nitrito y de la producción de nitrato durante todo el estudio.....	86
Figura 4.13 Relaciones estequiométricas durante el enriquecimiento de la biomasa anammox (días 60-365).....	87
Figura 4.14 Correlación nitrito:amonio consumidos y nitrato producido:amonio consumido durante todo el estudio.....	88
Figura 4.15 Evolución de los perfiles de amonio (A), nitrito (B) y nitrato (C) durante el ciclo operacional de 8 horas.	89
Figura 4.16 Consumo de amonio y nitrito y producción de nitrato durante el ciclo operacional de 8 horas.....	90
Figura 4.17 Perfil experimental de pH y de HCl adicionado durante el ciclo operacional de 8 horas.....	91
Figura 4.18 Evolución de la formación de nitrógeno gas por unidad de biomasa respecto al tiempo.	92

Capítulo 5

Figura 5.1 Evolución de la carga de nitrógeno aplicada durante todo el estudio (días 0-210). 100

Figura 5.2 Evolución de los compuestos nitrogenados en el fermentador anammox (días 0-50).
 101

Figura 5.3 Evolución de los compuestos nitrogenados en el fermentador anammox (días 0-210).
 104

Figura 5.4 Evolución de los compuestos orgánicos en el fermentador anammox (días 0-210).
 105

Figura 5.5 Microfotografía FISH generada con la sonda Amx820-Cy3 respecto al total de bacterias (Eubacteria, Eub338-(I-II-III)) el día 210 de estudio. Escala: 25 μm 106

Figura 5.6 Fotografías de la biomasa granular anammox realizada durante el tratamiento de lixiviados. Escala: 1 mm..... 107

Figura 5.7 Relaciones estequiométricas $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^-$ en el fermentador anammox (días 50-210)..... 107

Figura 5.8 Evolución de la concentración teórica y experimental de nitrato en el fermentador anammox (días 50-210) 108

Figura 5.9 Evolución de la concentración teórica y experimental de nitrito en el fermentador anammox (días 50-210). 109

Figura 5.10 Perfil experimental de pH y de HCl adicionado durante el ciclo operacional de 8 horas..... 110

Figura 5.11 Relación del porcentaje de nitrógeno eliminado durante el tratamiento con lixiviado: A) N total eliminado y B) N eliminado por el proceso anammox y por el proceso de desnitrificación heterotrófica. 112

Índice de Tablas

Capítulo 1

Tabla 1.1 Especies de nitrógeno y estado de oxidación.	5
Tabla 1.2 Géneros bacterianos de los grupos amonio oxidantes y nitrito oxidantes.	8
Tabla 1.3 Relación del contenido de nitrógeno amoniacal y de materia orgánica en diferentes aguas residuales (Adaptado de Dosta, 2007).	11
Tabla 1.4 Composición media de los lixiviados procedentes de los vertederos gestionados por la empresa CESP.A.....	13
Tabla 1.5 Tecnologías disponibles para el tratamiento de lixiviados de vertedero.	14
Tabla 1.6 Contenido de nitrógeno amoniacal en diferentes corrientes residuales tratadas por el proceso anammox.	19
Tabla 1.7 Relación de las especies anammox localizadas en diferentes ambientes.	21
Tabla 1.8 Efecto del pH sobre la actividad de las bacterias anammox (Egli <i>et al.</i> , 2001)	26
Tabla 1.9 Relación de las concentraciones de nitrito inhibitorias para el proceso anammox. ...	28
Tabla 1.10 Velocidades de oxidación de ácidos orgánicos ($\mu\text{mol}\cdot(\text{g proteína}\cdot\text{min})^{-1}$) de las diferentes especies anammox (Kartal <i>et al.</i> , 2008).....	30
Tabla 1.11 Tecnologías y condiciones aplicadas para operar reactores anammox	30

Capítulo 3

Tabla 3.1 Composición del afluente sintético.	53
Tabla 3.2 Relación de los métodos analíticos utilizados.	56
Tabla 3.3 Relación de los encebadores utilizados en este estudio.....	65

Capítulo 4

Tabla 4.1 Relación y resultados obtenidos de los inóculos escogidos (Cáliz, 2005; Sánchez-Melsió, 2006).	70
Tabla 4.2 Relación de las condiciones de operación aplicadas para poner en marcha el proceso anammox.	72
Tabla 4.3 Condiciones de operación y características del afluente sintético durante los tres períodos.	75
Tabla 4.4 Resultado del análisis de la biomasa anammox mediante las técnicas moleculares PCR y FISH.	85
Tabla 4.5 Amonio y nitrito consumido y nitrato producido durante el ciclo operacional de 8 horas.....	89

Capítulo 5

Tabla 5.1 Composición del afluente sintético durante el Período 1. 100

Tabla 5.2 Composición media del lixiviado crudo tratado por el proceso de nitrificación parcial
..... 102

Tabla 5.3 Características del lixiviado pretratado utilizado en el fermentador anammox. 103

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Agua: recurso esencial para la vida

El agua, indispensable para la vida, es un recurso renovable pero limitado. Es un recurso finito y vulnerable, esencial para sostener la vida, el desarrollo y el medio ambiente. Es un recurso natural accesible a la mayoría de la población en nuestro país. Sin embargo, este acceso no es de calidad en todas las zonas y la cantidad disponible para el ser humano está limitada en el tiempo. Por tanto, hay que gestionar los usos del agua de forma sostenible, controlando la presencia de contaminantes para la disponibilidad, renovación y conservación de los acuíferos.

En el contexto mediterráneo, el agua es un recurso escaso. Catalunya, por su clima mediterráneo, se caracteriza por un déficit hídrico en verano. El precio del agua sigue siendo muy bajo y esto hace que no se tomen medidas para disminuir su consumo. En general, la agricultura consume la mayor parte de agua dulce de Catalunya (73%), mientras que, aproximadamente, el 9% es utilizado por la industria y el 18% es consumido por la población para uso doméstico (Prat, 2003).

El problema es considerar el agua, simplemente, como un recurso. Debería considerarse como un componente de los ecosistemas. Dentro de este ecosistema global, el ciclo hidrológico es el que garantiza la circulación y disponibilidad del agua. Antiguamente, el ser humano solamente era una pequeña parte de este ciclo. No obstante, en la actualidad ha llegado a ser el factor determinante (Balaguer *et al.*, 1998). La población y la actividad humana aumentan a un ritmo frenético, incrementándose considerablemente el consumo de agua en los últimos años, afectando a la composición química de la recarga de los acuíferos y a las aguas superficiales, ya sea introduciendo compuestos orgánicos, nutrientes (nitrógeno y fósforo, principalmente) o diversas sustancias tóxicas como por ejemplo plaguicidas, hidrocarburos y disolventes halogenados, entre otros.

En este sentido, el ser humano es el único que puede actuar sobre la contaminación de las aguas residuales, reduciendo los contaminantes generados por la industria, la agricultura y los núcleos urbanos y rurales para que no afecten de manera irreversible a sistemas tan frágiles como los acuíferos, los ríos y las aguas del litoral. Esto se conseguirá si, a parte de incluir la depuración como tratamiento de las aguas residuales, se aplica una política más amplia que implique la actuación sobre los hábitos de los seres humanos y los procesos llevados a cabo.

Las aguas residuales se definen como la combinación de líquidos o aguas que transportan residuos procedentes de residencias, instalaciones públicas e industriales, a las que, eventualmente, se añaden las aguas subterráneas, superficiales y pluviales (Metcalf and Eddy, 2003). El tratamiento de las aguas residuales en las estaciones depuradoras se realiza mediante la combinación de procesos físicos, químicos y biológicos. El diseño de estas operaciones depende de las características y del volumen de agua residual a tratar y de la calidad del efluente que se quiera obtener. En la Figura 1.1 se presenta una fotografía de una planta de tratamiento de aguas residuales.



Figura 1.1 Planta de tratamiento de aguas residuales.

La calidad de las aguas que llegan a una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) depende, en gran medida, de la cantidad y la composición de las aguas residuales industriales. Por esta razón, se tienen que establecer normativas que regulen los vertidos industriales y así, limitar las concentraciones de determinados parámetros (Poch, 1999). Los contaminantes que se encuentran en las aguas residuales se clasifican según unos parámetros físicos, químicos y biológicos, que pueden provocar un efecto nocivo sobre el medio receptor (ríos, lagos y mares).

Por lo tanto, la depuración de las aguas residuales es un punto clave para mantener en buen estado ecológico los ecosistemas acuáticos y asegurar la calidad del agua para próximas generaciones. En los últimos años, la sociedad se ha concienciado del incremento de los problemas ambientales y se ha originado una Nueva Cultura del Agua (Prat, 2004; Arrojo, 2006). En este sentido, la Unión Europea ha establecido un marco comunitario para la protección y la gestión de las aguas. La Directiva europea Marco del Agua (2000/60/CE) prevé, entre otras cosas, la definición y las características de las aguas europeas por cuencas y demarcaciones hidrográficas, así como la adopción de planes de gestión y programas de medidas apropiados para cada masa de agua. En el tratamiento de las aguas residuales se

observa una necesidad creciente para obtener la calidad de los efluentes que provienen de las estaciones depuradoras, tal y como se constata en la Directiva de Aguas Residuales Urbanas (91/271/CEE).

La eficiencia de la depuración de aguas residuales implica la eliminación de los compuestos perjudiciales para la salud de la población, así como, para la calidad de las aguas y para el buen estado de los ecosistemas. Para lograr estos objetivos se definen una serie de técnicas analíticas que permiten determinar los parámetros de control sobre los contaminantes, los cuales son, mayoritariamente, el contenido de materia orgánica y de sólidos en suspensión. Actualmente, también se controla el contenido de nutrientes (nitrógeno y fósforo) si el medio receptor del agua tratada se considera una zona sensible. En este sentido, en los últimos años muchas EDARs han sido modificadas para poder eliminar el nitrógeno de las aguas residuales y así cumplir la normativa 91/271/CEE.

Según el *Plan de Saneamiento de la Generalitat de Catalunya*, basándose en la Directiva del Consejo 91/271/CEE del *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, la concentración de Nitrógeno Total que puede ser vertida al medio receptor no puede superar los $15 \text{ mg N}_{\text{total}} \cdot \text{L}^{-1}$ en poblaciones entre 10.000 y 100.000 habitantes equivalentes (h.e.) ni los $10 \text{ mg N}_{\text{total}} \cdot \text{L}^{-1}$ en poblaciones que superen los 100.000 h.e. Las poblaciones de menos de 2.000 h.e. tienen que realizar un tratamiento en función de la vulnerabilidad del medio receptor (PSARU 2002, *Programa de Sanejament d'Aigües Residuals Urbanes*).

1.2 El ciclo del Nitrógeno

El ciclo del nitrógeno es uno de los ciclos biogeoquímicos más importantes que tienen lugar en la naturaleza, permitiendo mantener un equilibrio dinámico entre las distintas formas de nitrógeno y la composición de la biosfera. Se trata de un proceso cíclico a través del cuál el nitrógeno se incorpora al suelo y pasa a formar parte de los organismos vivos antes de regresar a la atmósfera. El ciclo del nitrógeno está compuesto por diferentes procesos naturales que mediante la acción de diversos microorganismos suministran este elemento a los seres vivos.

El nitrógeno, parte esencial de las proteínas y los aminoácidos, se encuentra mayoritariamente en la atmósfera. El porcentaje de nitrógeno en el aire es del 79%. Sin embargo, este nitrógeno gas tiene que ser transformado químicamente para poder ser utilizado por los seres vivos a través de su fijación y asimilación. Posteriormente, mediante una serie de reacciones este nitrógeno asimilado es convertido en compuestos susceptibles de ser utilizados

por los organismos vivos. Estas reacciones se llevan a cabo a través del ciclo del nitrógeno (Figura 1.2).

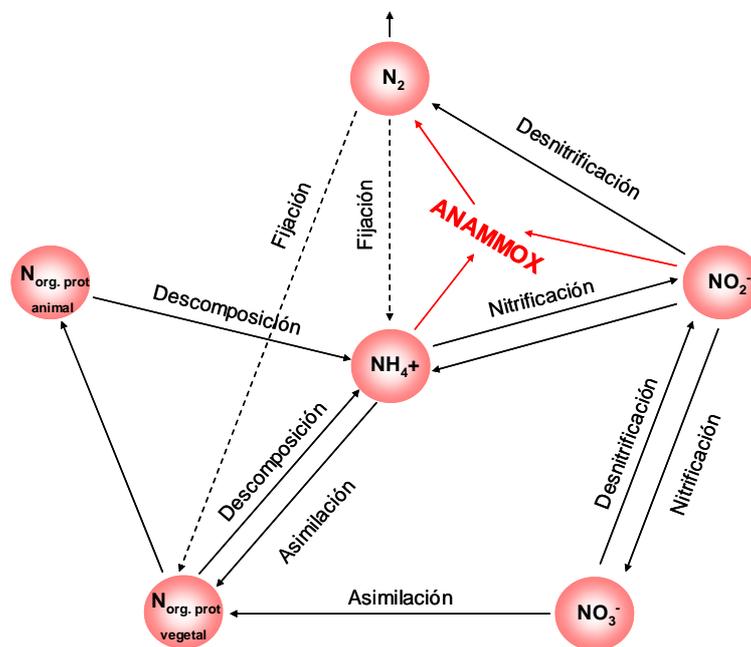


Figura 1.2 Esquema del ciclo del nitrógeno. (Adaptado de Dapena-Mora, 2007).

La **fijación** del nitrógeno molecular permite incorporar diferentes compuestos solubles de nitrógeno (N_{org} , NH_4^+ , NO_3^-) susceptibles de ser utilizados por los seres vivos para su crecimiento, que los organismos autótrofos transforman en nitrógeno orgánico mediante su **asimilación**. Una vez los compuestos orgánicos nitrogenados (N_{org}) son asimilados, las bacterias los transforman en amonio (NH_4^+) a través de la **descomposición** de los seres vivos, de los excrementos y de la orina. Los organismos nitrificantes (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrobacter*,...), en presencia de oxígeno, convierten este amonio en nitrito (NO_2^-) y posteriormente en nitrato (NO_3^-) a través del proceso de **nitrificación**. Finalmente, este nitrato, en condiciones anóxicas y consumiendo materia orgánica, se transforma en nitrógeno gas por las bacterias desnitrificantes (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Thiobacillus*,...), mediante el proceso de **desnitrificación**.

Sin embargo, recientemente se han descubierto nuevos microorganismos que intervienen en el ciclo global del nitrógeno. Uno de estos organismos son las bacterias **anammox** (*anaerobic ammonium oxidation*), que oxidan el amonio a nitrógeno gas utilizando el nitrito como aceptor de electrones en condiciones anaerobias y sin la necesidad de materia orgánica (Strous *et al.* 1998; Jetten *et al.* 1999).

1.3 Problemática del Nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente básico para la vida de los seres vivos, pero si se encuentra en exceso en las aguas puede ocasionar graves problemas. En este sentido, es uno de los contaminantes más importantes del agua y, junto con el carbono y el fósforo, se encuentra en diversos tipos de aguas residuales, ya sean urbanas, agrícolas o industriales. Los compuestos de nitrógeno tienen un estado de oxidación que comprende desde la valencia **-3** ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) hasta la **+5** ($\text{HNO}_3/\text{NO}_3^-$) (Tabla 1.1). Los compuestos más estables son el anión nitrato y el catión amonio, que pueden llegar al agua, creando problemas de toxicidad y cambios ambientales en los ecosistemas acuáticos.

Tabla 1.1 Especies de nitrógeno y estado de oxidación.

Especie	Nombre	Estado de oxidación
$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	Amoníaco/Ion amonio	-3
N_2H_4	Hidracina	-2
NH_2OH	Hidroxilamina	-1
N_2	Nitrógeno gas	0
N_2O	Óxido nitroso	+1
NO	Óxido nítrico	+2
$\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$	Ácido nitroso/Ion nitrito	+3
NO_2	Dióxido de nitrógeno	+4
$\text{HNO}_3/\text{NO}_3^-$	Ácido nítrico/Ion nitrato	+5

Uno de los problemas asociados al vertido de compuestos de nitrógeno en el medio acuoso, junto con los de fósforo y micronutrientes, es el rápido desarrollo de algas y otras plantas acuáticas que posteriormente mueren y se descomponen, dando lugar al fenómeno de la **eutrofización** (Figura 1.3).

La eutrofización de masas acuosas es la aceleración del proceso de envejecimiento y se produce cuando hay un exceso de nutrientes que provoca una rápida proliferación de algas. El crecimiento desmesurado de esta biomasa puede llegar a agotar los nutrientes e iniciarse una muerte masiva de estas algas. Esta descomposición en condiciones aeróbicas provoca la disminución del oxígeno disuelto en el agua, de manera que no permite la vida acuática. En este sentido, cuando no hay suficiente oxígeno, la biomasa creada se descompone anaeróbicamente aportando un exceso de materia orgánica al medio y provocando la disminución de la calidad del agua. Por esta razón, es necesario encontrar sistemas para mantener las concentraciones de

estos nutrientes (nitrógeno y fósforo) dentro de unos niveles que no causen el deterioro de lagos, ríos y mares.



Figura 1.3 Eutrofización de las aguas de un lago.

Por otro lado, la contaminación de las aguas por nitrógeno amoniacal suele ser más importante que la eutrofización, ya que sus efectos son más inmediatos. El amonio, compuesto nitrogenado más abundante en las aguas residuales, es problemático en los sistemas acuáticos porque se produce un consumo de oxígeno para ser oxidado a nitrito y posteriormente a nitrato, a través del proceso de nitrificación. Si la cantidad de amonio es importante, el consumo de oxígeno es elevado provocando anoxia en el medio acuático y causando la muerte de los organismos acuáticos que necesitan el oxígeno para sobrevivir. La señal más evidente de contaminación por amonio en aguas superficiales es una elevada y repentina mortandad de peces debido a la ausencia de oxígeno disuelto.

En general, aunque el nitrógeno suele ser un nutriente abundante en las aguas residuales urbanas, la concentración no es excesivamente elevada ($20-70 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$). Sin embargo, en otras corrientes de aguas residuales, tales como lixiviados de vertedero, purines de cerdo o retornos de efluentes de digestores anaerobios, entre otros, la concentración de nitrógeno, principalmente en forma de amonio, es bastante elevada ($>1\text{g N}\cdot\text{NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$). Estas elevadas concentraciones pueden suponer un gran riesgo de contaminación ambiental si se vierten directamente en el medio receptor sin un tratamiento previo.

Actualmente, para eliminar el nitrógeno presente en las aguas residuales se utilizan métodos físico-químicos y biológicos. Los primeros, en la mayoría de los casos, no resuelven el problema ya que trasladan el contaminante de un medio a otro (Cervantes-Carrillo *et al.*, 2000). Los principales procesos físico-químicos utilizados para eliminar el nitrógeno son el *stripping* del amoniaco y el intercambio iónico (Metcalf and Eddy, 2003).

En cambio, los métodos biológicos, en condiciones idóneas, transforman los compuestos nitrogenados a nitrógeno gas (N₂), cerrándose así el ciclo del nitrógeno. Estos métodos se basan en aprovechar la capacidad de los microorganismos para obtener energía a partir de compuestos orgánicos y/o inorgánicos. Por un lado, los microorganismos heterótrofos utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Por otro lado, los organismos autótrofos obtienen el carbono de la fijación del CO₂ disuelto en agua. Los procesos biológicos convencionales no asimilativos, como la nitrificación y la desnitrificación, han constituido la forma más efectiva, sostenible y económicamente viable para la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales (Cervantes-Carrillo *et al.*, 2000).

1.4 Sistemas convencionales de eliminación de nitrógeno

Los procesos naturales que transforman los compuestos de nitrógeno en la naturaleza se llevan a cabo en las plantas de tratamiento para eliminar estos compuestos de las aguas residuales. La eliminación de los compuestos nitrogenados de las aguas residuales urbanas, principalmente el amonio, se lleva a cabo generalmente, mediante procesos biológicos que suelen combinarse con la eliminación de la materia orgánica. Sin embargo, efluentes industriales pueden presentar características que favorezcan tratamientos físico-químicos. A continuación se describen los tratamientos más utilizados en la eliminación de nitrógeno.

1.4.1 Procesos físico-químicos

Los procesos físico-químicos más utilizados para realizar el tratamiento del amonio son el *stripping* con aire y el intercambio iónico. El *stripping* del amoniaco es el método más utilizado debido a que opera de una manera simple, se obtienen elevadas eficiencias de eliminación y no está afectado por sustancias tóxicas. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como la necesidad de aplicar un control de pH y de temperatura y no elimina nitrito, nitrato ni nitrógeno orgánico (Siegrist, 1996).

En cambio, el intercambio iónico, que elimina amonio y metales pesados, no se utiliza habitualmente para aguas residuales por los elevados costes operacionales. Este proceso, además del elevado coste de inversión, no elimina únicamente amonio, sino también cationes presentes en el agua que reducen la capacidad de eliminación del amonio. En este sentido, este proceso se utiliza para eliminar bajas concentraciones de nitrógeno amoniacal.

1.4.2 Eliminación biológica de nitrógeno. Nitrificación-Desnitrificación

Uno de los métodos biológicos más habituales para la eliminación de los compuestos de nitrógeno en las aguas residuales es la combinación de los procesos de nitrificación y desnitrificación (Münch *et al.*, 1996; Grady *et al.*, 1999) que permite oxidar el amonio a nitrito y posteriormente a nitrato, que finalmente, se convierte a nitrógeno gas.

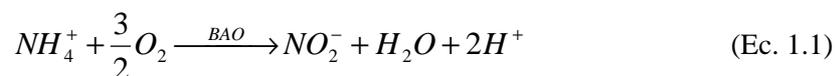
La nitrificación es un proceso aeróbico realizado por microorganismos quimiolitotróficos que pertenecen al Filo Proteobacteria. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas: oxidación del amonio a nitrito y oxidación de nitrito a nitrato, el cuál necesita el aporte de oxígeno que actúa como aceptor de electrones.

Los organismos nitrificantes se dividen en dos grandes grupos: las bacterias amonio oxidantes (BAO) y las bacterias nitrito oxidantes (BNO). Estos microorganismos, de respiración aeróbica estricta, obtienen la energía de los compuestos reducidos de nitrógeno (amonio y nitrito, respectivamente) y la fuente de carbono es el CO₂ disuelto en el agua que fijan mediante el ciclo de *Calvin-Benson* (Madigan *et al.*, 1997). Una característica importante de estos microorganismos es que realizan un proceso aeróbico concertado, de manera que el producto final de las BAO es el sustrato de las BNO. En la Tabla 1.2 se presentan los géneros bacterianos de estos dos grupos de bacterias.

Tabla 1.2 Géneros bacterianos de los grupos amonio oxidantes y nitrito oxidantes.

Amonio oxidantes	Nitrito oxidantes
<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrobacter</i>
<i>Nitrosococcus</i>	<i>Nitrospira</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrococcus</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrospina</i>
<i>Nitrosovibrio</i>	

Las bacterias amonio oxidantes oxidan el amonio a nitrito, mediante el proceso de nitrificación (Ecuación 1.1).



El sustrato de estas bacterias es el amoniaco (NH₃), el cuál se encuentra en equilibrio con el ion amonio (NH₄⁺) en función del pH (Anthonisen *et al.*, 1976; Ganigué *et al.*, 2007; Van Hulle

et al., 2007). Dentro de este grupo de bacterias, las más abundantes y estudiadas son las *Nitrosomonas sp.*

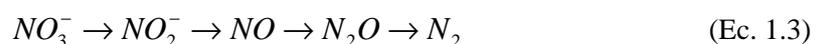
En el proceso de nitrificación, las bacterias amonio oxidantes transforman el amonio en hidroxilamina (NH₂OH) mediante la enzima amonio mono-oxigenasa (AMO). Posteriormente, convierten la hidroxilamina en nitrito mediante la enzima hidroxilamina óxido-reductasa (HAO). Durante esta etapa se produce el mayor consumo de oxígeno disuelto del proceso global de nitrificación (3.43 g O₂ por 1 g de N-NH₄⁺ oxidado a N-NO₂⁻).

En la segunda etapa del proceso de nitrificación, tiene lugar la oxidación de nitrito a nitrato (nitratación) por parte de las bacterias nitrito oxidantes mediante un complejo enzimático denominado nitrito óxido-reductasa (NOR) (Ecuación 1.2). Dentro de este grupo de bacterias, las más estudiadas son el género *Nitrobacter sp* (Schmid *et al.*, 2000). En esta etapa se consumen 1.14 g O₂ por 1 g de N-NO₂⁻ oxidado a N-NO₃⁻.



Así, durante el proceso de nitrificación se produce un consumo de oxígeno de 4.57 g O₂ por 1 g de N-NH₄⁺ oxidado a N-NO₃⁻. Por otro lado, se producen dos moles de protones por cada mol de amonio oxidado (Ecuación 1.1). En este sentido, la alcalinidad presente en el agua residual debe ser suficiente para mantener el pH en el rango óptimo (7.0-7.5) para realizar la nitrificación, debido a que se consumen 7.14 g CaCO₃ por 1 g de N-NH₄⁺ oxidado a N-NO₃⁻ (Metcalf and Eddy, 2003). Además, el proceso de nitrificación puede verse afectado por diversos factores medioambientales, tales como el pH, la presencia de tóxicos (Metcalf and Eddy, 2003), el amoníaco libre (NH₃) y el ácido nitroso (HNO₂) (Anthonisen *et al.*, 1976; Ganigué *et al.*, 2007).

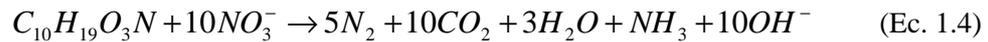
Una vez se ha oxidado el amonio a nitrato, éste se reduce a nitrógeno gas (N₂) mediante el proceso de desnitrificación (Ecuación 1.3). La desnitrificación es un proceso heterotrófico y anóxico donde la reducción de nitrato hasta N₂ se realiza por medio de diferentes enzimas. Los productos intermedios son el nitrito (NO₂⁻), el óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso (N₂O).



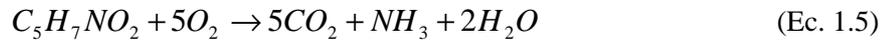
Los géneros de bacterias desnitrificantes más comunes son *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*, entre otros. La desnitrificación se realiza en

presencia de una fuente de materia orgánica (donador de electrones) y utilizando los óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones en sustitución del oxígeno disuelto (Cervantes-Carrillo *et al.*, 2000). Dependiendo de cual sea la fuente de materia orgánica utilizada, las expresiones que describen el proceso de desnitrificación son (Metcalf and Eddy, 2003):

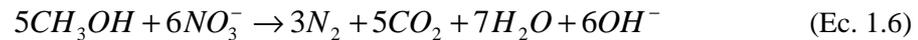
1. Materia orgánica presente en las aguas residuales (Ecuación 1.4).



2. Materia orgánica producida durante la muerte de los microorganismos (endógena) (Ecuación 1.5)



3. Materia orgánica como fuente de carbono exógena (metanol o acetato) (Ecuaciones 1.6 y 1.7, respectivamente).



El proceso de desnitrificación provoca un incremento del pH debido a un aumento de la alcalinidad presente en el medio, ya que se aportan de media 3.57 g de alcalinidad en forma de $CaCO_3$ por 1 g de $N-NO_3^-$ reducido a N_2 . Sin embargo, la aplicación conjunta del proceso de nitrificación-desnitrificación reduce la cantidad de productos químicos necesarios para controlar el pH, ya que el proceso de nitrificación causa una disminución del pH mientras que el proceso de desnitrificación lo incrementa.

El rendimiento del proceso de desnitrificación está relacionado con la concentración de materia orgánica biodegradable presente en el afluente. Por esta razón, cuando la carga amoniacal es elevada, la desnitrificación no es efectiva por la falta de materia orgánica biodegradable. Así, Helmer-Madhok *et al.* (2002) expusieron que para aguas residuales con una baja relación C:N es necesario adicionar una fuente externa de materia orgánica para completar el proceso de desnitrificación. Mientras que con relaciones de C:N inferiores a 2.5 no se alcanza una desnitrificación óptima, con una relación de C:N superior a 4, la tasa de desnitrificación aumenta un factor de 1.5 a 1.7. En este sentido, la relación C:N se ha de ajustar para tener un proceso desnitrificante eficiente (Cervantes-Carrillo *et al.*, 2000).

Sin embargo, para realizar el tratamiento de aguas residuales con una elevada concentración de nitrógeno amoniacal y una baja concentración de materia orgánica biodegradable no es sostenible aplicar el proceso convencional de nitrificación-desnitrificación debido al elevado coste económico asociado. A continuación se presenta una relación de este tipo de aguas residuales, realizándose una descripción detallada de los lixiviados de vertedero.

1.5 Efluentes con elevada carga amoniacal. Lixiviados de vertedero

Existen diversos tipos aguas residuales que contienen una elevada carga de nitrógeno amoniacal y una baja concentración de materia orgánica biodegradable, tales como efluentes de digestores anaerobios, lixiviados de vertedero, purines de cerdo o efluentes de aguas residuales industriales (alimentaria, conservera, curtidos,...), entre otros, que se resumen en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Relación del contenido de nitrógeno amoniacal y de materia orgánica en diferentes aguas residuales (Adaptado de Dosta, 2007).

Tipo de Agua Residual	Nitrógeno amoniacal (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹)	DQO (mg O ₂ ·L ⁻¹)	DBO ₅ (mg O ₂ ·L ⁻¹)	Referencia
	403-997	119-530	9.5-86.7	Caffaz <i>et al.</i> (2005)
	840±99	1044±855	-	Fux <i>et al.</i> (2003)
Efluente Digestores	910	610	140	Wyffels <i>et al.</i> (2003)
Anaerobios	1000	810	230	Hellinga <i>et al.</i> (1999)
	1250-1700	700-1000	-	Wett <i>et al.</i> (1998)
	1100-2100	81	23	Strous <i>et al.</i> (1997a)
Lixiviados de vertedero	780-1080	9660-20560	-	Kalyuzhnyi and Glad. (2004)
	1150-3223	3200-6100	136-1059	Ganigué <i>et al.</i> (2007)
	1275-5500	14600-70800	-	Vilar <i>et al.</i> (2007)
Purines de cerdo	970±50	2940±1100	-	Hwang <i>et al.</i> (2005)
	1582-1680	18408-19117	-	Magrí and Flotats (2000)
	4320±170	56200±1370	-	Ahn <i>et al.</i> (2004)
Efluente industria curtidos	123-185	1940-2700	-	Murat <i>et al.</i> (2003)
	160-270	300-1400	-	Carucci <i>et al.</i> (1999)
Efluente industria almidón	1060	3000	990	Abelling and Seyfried (1992)
Efluente industria alimentaria	500-1200	3600-13000	-	Mosquera-Corral <i>et al.</i> (2003)
Efluente industria conservera ⁽¹⁾	700-1000	1000-1300 ⁽²⁾	-	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2006)

⁽¹⁾ Después de digestión anaerobia; ⁽²⁾ mg COT·L⁻¹.

La eliminación de elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal junto con la presencia de bajas concentraciones de materia orgánica biodegradable es una tarea difícil debido a la composición de este tipo de efluentes.

Uno de estos efluentes son los lixiviados de vertedero que se generan durante el proceso de transformación y degradación de la materia orgánica contenida en los residuos sólidos urbanos (RSU) al ser depositados en los vertederos conjuntamente con las infiltraciones del agua de lluvia a través de cualquier material o superficie permeable, que disuelven y arrastran elementos contaminantes.

Entre los principales problemas asociados a la gestión integral de un vertedero o depósito controlado de RSU está la dificultad del tratamiento de los lixiviados para poder verterlos al medio natural. Por ello, la gestión de los lixiviados de un vertedero incorpora balsas impermeables y sistemas de canalización que evitan la fuga al entorno y recuperan el líquido producido para aplicar un método de tratamiento adecuado. La Figura 1.4 muestra un esquema de un vertedero de residuos sólidos urbanos donde se depositan los lixiviados.

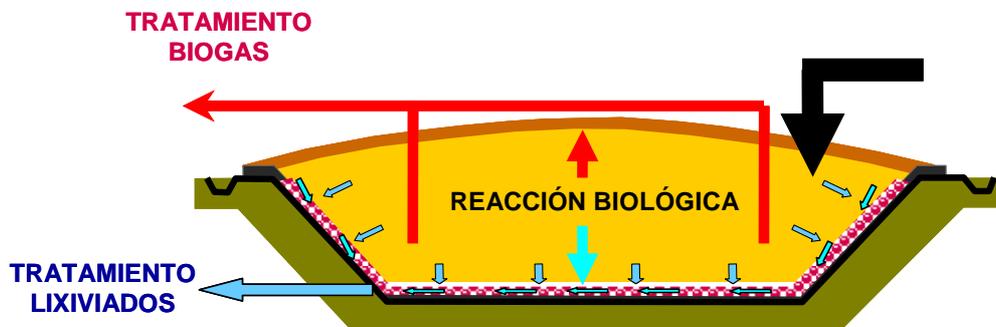


Figura 1.4 Esquema de un vertedero de residuos sólidos urbanos (Jiménez, 2007)

Cada vertedero puede generar un lixiviado de naturaleza y composición diferentes. Su aspecto es oscuro, tiene un olor fuerte y penetrante, difícil de ser confundido. En zonas de acumulación y/o estancamiento, éste puede presentar una capa superficial de varios centímetros de espuma. La composición química de los lixiviados es muy compleja e inestable. Además, este líquido arrastra todo tipo de sustancias nocivas, encontrándose hasta 200 compuestos diferentes, algunos de ellos muy tóxicos y hasta cancerígenos, como el hexaclorobenceno (HCB), el cloruro de vinilo, el cloruro de metilo o el tetracloruro de carbono.

En la Tabla 1.4 se presenta una relación de los principales compuestos que se encuentran en los lixiviados de vertedero.

Tabla 1.4 Composición media de los lixiviados procedentes de los vertederos gestionados por la empresa CESPA.

Compuesto	Media	Máximo	Mínimo	Unidades
DQO	10.517	34.000	177	$mg\ O_2 \cdot L^{-1}$
DBO	2.897	12.400	29	$mg\ O_2 \cdot L^{-1}$
COT	4.096	19.370	46	$mg\ C \cdot L^{-1}$
Amonio	2.057	4.156	37	$mg\ N-NH_4^+ \cdot L^{-1}$
Nitrito	31	116	0,05	$mg\ N-NO_2 \cdot L^{-1}$
Nitrato	216	900	0,20	$mg\ N-NO_3 \cdot L^{-1}$
Fosfato	67	252	1	$mg\ P \cdot L^{-1}$
Cloro	4.570	10.650	612	$mg\ Cl \cdot L^{-1}$
Sulfatos	835	1.867	100	$mg\ SO_4^{2-} \cdot L^{-1}$
Conductividad	26.483	91.750	1.178	$\mu S \cdot cm^{-1}$
pH	8,15	8,98	6,76	-
SST	5.216	42.766	18	$mg \cdot L^{-1}$
Calcio	37	61	6	$mg\ Ca^{2+} \cdot L^{-1}$
Magnesio	32,7	65,3	0,02	$mg\ Mg^{2+} \cdot L^{-1}$
Hierro	15,96	45,60	0,15	$mg\ Fe^{3+} \cdot L^{-1}$
Zinc	2,33	21,59	0,04	$mg\ Zn^{2+} \cdot L^{-1}$
Cobre	1,16	8,69	0,02	$mg\ Cu^{2+} \cdot L^{-1}$
Plomo	0,22	0,96	0,001	$mg\ Pb^{2+} \cdot L^{-1}$
Cadmio	0,10	0,91	0,001	$mg\ Cd^{2+} \cdot L^{-1}$
Cromo	1,09	3,20	0,03	$mg\ Cr^{3+} \cdot L^{-1}$
Níquel	0,73	2,31	0,01	$mg\ Ni^{2+} \cdot L^{-1}$

La composición media de los contaminantes presentes en los lixiviados varía considerablemente según el área geográfica, la edad del vertedero, el tipo de residuo depositado y el estado del lixiviado en el momento de tomar la muestra. Según la edad del vertedero, los lixiviados se pueden dividir en jóvenes y maduros. Los lixiviados jóvenes, procedentes de vertederos con menos de dos años en explotación, presentan una elevada concentración de compuestos orgánicos biodegradables que a medida que aumenta la edad del lixiviado disminuye y elevadas concentraciones de amonio. Por el contrario, los lixiviados maduros, procedentes de vertederos con más de diez años en explotación, contienen, principalmente, materia orgánica no biodegradable y elevadas concentraciones de amonio (Horan *et al.*, 1997).

Así mismo, los lixiviados presentan elevadas concentraciones de sales (elevada conductividad), asociadas principalmente a cloruros y sulfatos. También contienen metales pesados, principalmente hierro, pero también cromo, cobre, plomo, cadmio, mercurio, níquel y zinc, entre otros. Además, pueden contener concentraciones altas de sólidos en suspensión, así como una elevada alcalinidad. Por último, también pueden estar presentes microorganismos patógenos, que disminuyen rápidamente a medida que aumenta la edad del depósito controlado (lixiviados maduros).

Las variaciones de caudal y de concentración de contaminantes de los lixiviados, debidas a la evolución del vertedero con su edad y a las condiciones ambientales, obligan al diseño de una planta de tratamiento con una gran flexibilidad de funcionamiento. El tratamiento de los lixiviados se puede realizar en el mismo vertedero o en una planta de tratamiento externa. Los sistemas más extendidos en la actualidad son los que tratan el lixiviado en el mismo vertedero (*in-situ*), gracias a los buenos resultados obtenidos y al encarecimiento de las otras opciones. Por el contrario, el tratamiento en un lugar distinto del vertedero (*ex-situ*), normalmente en estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) urbanas o industriales, se emplea cuando no hay más opción y si estas instalaciones admiten cargas orgánicas y de nitrógeno muy elevadas, aunque con poco caudal. Sin embargo, el envío de estos lixiviados a plantas de tratamiento de aguas residuales depende de las características del lixiviado y del límite de la capacidad de tratamiento de la EDAR.

Los criterios utilizados para realizar la elección del proceso más adecuado dependen de diferentes parámetros, tales como la ubicación del vertedero, la localización física de la planta de tratamiento de lixiviados, la calidad y cantidad del lixiviado a tratar, la fuente de energía disponible, los costes económicos (inversión inicial, mantenimiento, personal, reactivos, etc), los requisitos legales para realizar la descarga y las mejores técnicas disponibles. Así, en función de estos criterios se aplicaran diferentes tipos de tratamiento. En la Tabla 1.5 se presenta una relación de las tecnologías disponibles para realizar el tratamiento de los lixiviados de vertedero (Jiménez, 2007).

Tabla 1.5 Tecnologías disponibles para el tratamiento de lixiviados de vertedero.

CONTAMINANTE	TECNOLOGÍAS			
	Biológicos	Físico-químicos	Caloríficos	Membranas
Nitrógeno	Fangos activos	<i>Stripping</i> amoniaco		
Materia Orgánica	SBR ⁽¹⁾	Oxidación	Evaporación	
	Lecho fijo	Ozonización	Evapocondensación	Osmosis Inversa
	RBC ⁽²⁾	Carbón Activo		
	MBR ⁽³⁾			
Sales			Secado térmico	Osmosis Inversa
Iones/Metales pesados		Precipitación química		Electrodialisis
		Coagulación-Floculación		
Sólidos en Suspensión		Precipitación		Filtración
				Ultrafiltración

⁽¹⁾ *Sequencing Batch Reactor*; ⁽²⁾ *Rotating Biological Contactor*; ⁽³⁾ *Membrane Bioreactor*

Normalmente, se utiliza una combinación de estos métodos para realizar un tratamiento completo de los lixiviados de vertedero. No obstante, la mayoría de estos métodos tienen un

coste económico elevado debido al coste inicial del equipamiento de la planta, al elevado gasto energético para su funcionamiento y al uso frecuente de aditivos químicos. Por ejemplo, los procesos de oxidación avanzada (UV/Fe²⁺ H₂O₂, UV/H₂O₂, UV/O₃, UV/TiO₂) se han propuesto recientemente como una alternativa efectiva para el tratamiento de compuestos orgánicos presentes en los lixiviados de vertedero. Sin embargo, estas técnicas aplicadas a gran escala no son siempre viables económicamente. Otros métodos como la ósmosis inversa o la adsorción con carbón activo, únicamente transfieren el contaminante y no resuelven la problemática medioambiental (Wiszniewski *et al.*, 2006).

El mercado ofrece una gran variedad de tratamientos, tanto biológicos como físico-químicos o una combinación de ambos (Tabla 1.5). La solución más adecuada es un tratamiento integral de los lixiviados, preferentemente en las instalaciones del vertedero, reduciendo la carga contaminante a los valores exigidos por la legislación relativa al vertido de residuos (1999/31/CE) y vertiendo a los cauces públicos más cercanos. Desde un punto de vista práctico y económico, el tratamiento biológico es la mejor alternativa para la eliminación del nitrógeno amoniacal y de la materia orgánica biodegradable, que combinado con los tratamientos físico-químicos posteriores permite la eliminación completa de los contaminantes (metales pesados, sales, sólidos en suspensión, etc).

El proceso biológico de nitrificación-desnitrificación es, probablemente, el método más económico y eficiente para tratar los lixiviados procedentes de los vertederos controlados (Wiszniewski *et al.*, 2006). Sin embargo, los lixiviados de vertedero son, generalmente, difíciles de tratar de manera efectiva a través de los procesos biológicos convencionales debido a la elevada concentración de nitrógeno amoniacal y a la baja disponibilidad de materia orgánica biodegradable, lo que obliga a la adición de fuentes externas de materia orgánica, con el consiguiente coste económico asociado.

Por otro lado, los tratamientos físico-químicos necesitan instalaciones más pequeñas y sencillas y son menos sensibles a las variaciones del medio. En cambio, los procesos físico-químicos son más costosos económicamente que los métodos biológicos generando un residuo difícil de tratar, incrementado el coste final del tratamiento de los lixiviados. De las técnicas físico-químicas empleadas para el tratamiento de lixiviados se destacan las siguientes:

- a) **Stripping**, que elimina el amoníaco del agua al ser arrastrado por una corriente de aire.
- b) **Precipitación química**, que consiste en acelerar la decantación de los sólidos en suspensión agregando determinadas sustancias químicas. Esta técnica se utiliza para eliminar los metales y algunas especies aniónicas como sulfato y fluoruro.

c) **Oxidación química**, que se utiliza para degradar los compuestos orgánicos refractarios presentes en los lixiviados mediante agentes oxidantes.

d) **Adsorción**, donde se utiliza un filtro de carbón activo para depurar las sustancias contaminantes, principalmente, compuestos orgánicos.

e) **Osmosis inversa**, a partir de la cuál se filtra el líquido a través de membranas a diferentes presiones para eliminar, principalmente, compuestos orgánicos y sales.

Así, los aspectos económicos y técnicos marcaran el tipo de tratamiento más adecuado para cada caso concreto, combinándose en muchas ocasiones varios de ellos. Actualmente, ninguna de las tecnologías asociadas al tratamiento de lixiviados permite resolver el problema global por sí sola, lo que hace necesario la combinación de diferentes tratamientos físicos, biológicos y/o químicos para reducir los niveles de contaminación de los lixiviados. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevas soluciones y mejorar las tecnologías ya existentes para minimizar el impacto de los lixiviados de vertedero en el medio ambiente.

1.6 El proyecto CLONIC

Como se ha comentado anteriormente, el lixiviado generado en los depósitos controlados de residuos sólidos urbanos presenta altos niveles de contaminación y se caracteriza por una elevada concentración de amonio y materia orgánica, en su mayor parte no biodegradable, así como por una elevada salinidad (elevada conductividad). El tratamiento de los lixiviados es uno de los principales problemas en la gestión de depósitos controlados. En este sentido, se pueden utilizar diferentes técnicas para realizar el tratamiento de éstos, tales como procesos biológicos convencionales, osmosis inversa, oxidación química, evapocondensación o *stripping* del amoníaco. No obstante, la aplicación de estos tratamientos por separado no resuelve completamente el problema. Por ello, es necesaria la combinación de diversos tratamientos (físicos, químicos y/o biológicos) para reducir la contaminación generada por los lixiviados.

Ante la necesidad de hallar nuevas alternativas para la completa eliminación del nitrógeno amoniacal presente en los lixiviados de vertedero con una baja relación C:N, se ha llevado a cabo el proyecto **CLONIC** (Cierre del ciclo de nitrógeno mediante tratamiento biológico de lixiviados procedentes de depósitos controlados para la eliminación del nitrógeno a partir de nitrito y posterior tratamiento térmico). El proyecto **CLONIC** (LIFE03 ENV/000140, 2003-2007), financiado por la Unión Europea dentro del programa LIFE-Medio Ambiente, pretende solventar la problemática existente en torno al tratamiento de los lixiviados de vertedero. Este proyecto ha sido llevado a cabo por la empresa CESP, en colaboración con el Laboratorio de

Ingeniería Química y Ambiental (LEQUIA) de la Universidad de Girona y la Fundación Agbar (Aguas de Barcelona).

El proyecto **CLONIC** (www.lifeleachate.com) propone como alternativa, para realizar el tratamiento integral de los lixiviados de vertedero, la aplicación del proceso combinado de nitrificación parcial y anammox seguido de un proceso de secado térmico.

Las ventajas de la combinación de estos dos procesos biológicos son, principalmente, que la cantidad de oxígeno necesaria para nitrificar parcialmente el amonio a nitrito es mucho menor en comparación con el proceso de nitrificación-desnitrificación tradicional y que ambos procesos se desarrollan a partir de biomasa autotrófica, es decir, sin la necesidad de la adición de fuentes externas de materia orgánica biodegradable.

El efluente generado a partir de estos dos procesos se trata mediante el secado térmico para eliminar el elevado contenido de sales, que producen un residuo sólido. La eliminación de sales presentes en el lixiviado se realiza, principalmente, con procesos de separación basados en tecnologías de filtración. Sin embargo, esto genera importantes volúmenes de concentrados, lo que implica elevados costes económicos para su posterior gestión y tratamiento. En este sentido, el proceso de secado térmico es una alternativa sostenible para el tratamiento de estos efluentes con bajas concentraciones de nitrógeno y materia orgánica pero con elevadas concentraciones de sales, utilizando como fuente de energía la propia combustión del biogas generada en el vertedero (Bae *et al.*, 1998).

En consecuencia, la combinación de los tratamientos de nitrificación parcial y anammox con el proceso de secado térmico, representa una alternativa técnica, económica y ambiental con importantes ventajas respecto a los actuales tratamientos físico-químicos (*stripping* amoníaco, oxidación química,...) y biológicos tradicionales (nitrificación-desnitrificación). En este sentido, se llevó a cabo un estudio económico medioambiental con la finalidad de evaluar y comparar el coste económico ambiental de un tratamiento convencional de lixiviados (oxidación húmeda con peróxido seguida del *stripping* del amoníaco) con la combinación de los procesos de nitrificación parcial, anammox y secado térmico. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el coste medioambiental para un tratamiento convencional es de 0.02566 € por litro de contaminante. En cambio, para el proyecto **CLONIC**, la eliminación de un litro de contaminante supone un coste de 0.01331 €, lo que significa obtener un ahorro del 48% (Vives *et al.*, 2007)

El proyecto **CLONIC** ha sido reconocido por la Unión Europea como uno de los mejores proyectos de investigación relacionados con el agua dentro del marco del programa LIFE.

El presente trabajo, enmarcado en el proyecto **CLONIC**, corresponde al estudio llevado a cabo en relación a la puesta en marcha, enriquecimiento y operación del proceso anammox para su posterior aplicación al tratamiento de lixiviados de vertedero.

1.7 Proceso anammox

1.7.1 Antecedentes y características del proceso anammox

La eliminación biológica de nitrógeno de las aguas residuales es, habitualmente, llevada a cabo mediante el proceso combinado de nitrificación-desnitrificación. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, la aplicación de este proceso para el tratamiento de afluentes con una elevada carga de nitrógeno amoniacal y una baja concentración de materia orgánica biodegradable incrementa considerablemente los costes económicos. Por una parte, el proceso de nitrificación necesita un elevado aporte de oxígeno para oxidar el amonio a nitrato ($4.57 \text{ g O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ oxidado). Por otra parte, para llevar a cabo el proceso de desnitrificación es necesario la adición de materia orgánica ($4.6 \text{ g DBO}_5 \cdot \text{g}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$ reducido), incrementando así el coste por la adición de reactivos químicos.

Una nueva alternativa es el proceso **anammox** (*anaerobic ammonium oxidation*), previa nitrificación parcial del amonio. En este proceso, las bacterias anammox oxidan el amonio bajo condiciones anaerobias, utilizando el nitrito como aceptor de electrones, para producir nitrógeno gas (Strous *et al.*, 1997a; Jetten *et al.*, 1999; Strous, 2004).

La característica principal del sistema anammox es que no necesita materia orgánica biodegradable para desnitrificar debido a que las bacterias implicadas en el proceso son quimiolitotróficas, es decir, obtienen el carbono necesario para su crecimiento a partir del carbono inorgánico (Strous *et al.*, 1997a; Jetten *et al.*, 1999). Además, para el tratamiento previo de nitrificación parcial se requiere un menor consumo de oxígeno. Estas dos características se pueden considerar como una ventaja respecto al proceso de nitrificación-desnitrificación. Al mismo tiempo, la biomasa generada por la biomasa anammox ($0.066 \text{ mol C} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+$ eliminado) es menor que la producida por los procesos convencionales ($0.105 \text{ mol C} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+$ eliminado), disminuyendo notablemente los costes de operación y de tratamiento de fangos.

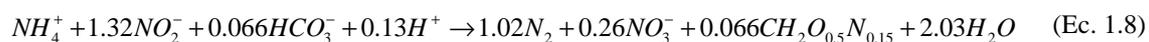
Este nuevo proceso es una prometedora alternativa para el tratamiento de aguas residuales con elevadas concentraciones de amonio y bajas concentraciones de materia orgánica biodegradable (baja relación C:N), tales como lixiviados de vertedero, efluentes de digestores anaerobios o purines de cerdo. En la Tabla 1.6 se detallan algunos ejemplos de aguas residuales de distinta procedencia en las que se ha probado la eficiencia del proceso anammox en planta piloto.

Tabla 1.6 Contenido de nitrógeno amoniacal en diferentes corrientes residuales tratadas por el proceso anammox.

Afluente	NH_4^+ (g N- NH_4^+ ·L ⁻¹)	Referencia
	2.0	Strous <i>et al.</i> (1997a)
Efluente digestores anaerobios	1.2	Van Dongen <i>et al.</i> (2001)
	0.6	Fux <i>et al.</i> (2002)
Lixiviados de vertedero	0.3	Siegrist <i>et al.</i> (1998)
	4.3	Ahn <i>et al.</i> (2004)
Purines de cerdo	0.2	Hwang <i>et al.</i> (2005)
Conservera de pescado	1.0	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2006)

Broda (1977), fue el primero que postuló, a partir de cálculos termodinámicos, la posible existencia en la naturaleza de microorganismos capaces de realizar la oxidación anaerobia del amonio, la cual se creía que sólo podía llevarse a cabo en condiciones aerobias. En 1995, Mulder *et al.* confirmaron experimentalmente la teoría desarrollada por Broda, al observar, en un reactor de lecho fluidizado de la planta de tratamiento de aguas residuales de *Gist-Brocades* (Delft, Países Bajos), la eliminación simultánea de amonio y nitrato en condiciones anaerobias, que directamente se transformaban en nitrógeno gas. Este nuevo sistema de desnitrificación, patentado en el año 1992 (EP-0-327-184-A1), se denominó **anammox**.

Posteriormente, Van de Graaf *et al.* (1995) demostraron que el proceso anammox es un proceso biológico ya que la concentración de biomasa responsable de esta oxidación es proporcional a la velocidad de consumo de amonio y nitrito. Además, determinaron que el aceptor de electrones era el nitrito y no el nitrato. Strous *et al.* (1998) propusieron, a partir de trabajos experimentales en un SBR (*Sequencing Batch Reactor*), la estequiometría del proceso anammox (Ecuación 1.8):



Como se puede observar en esta ecuación, la relación molar nitrito:amonio en el afluente debe ser de 1.32 moles de NO_2^- por mol de NH_4^+ . Para conseguir esta relación en las aguas

residuales susceptibles de ser tratadas por el proceso anammox es necesaria una etapa previa, donde se oxide parcialmente el amonio a nitrito (nitritación parcial). De este modo, la aplicación del proceso combinado de nitritación parcial y anammox permite disminuir la energía necesaria para llevar a cabo los procesos, reduciendo los costes totales (Dapena-Mora, 2007).

El proceso anammox no elimina completamente el nitrógeno, ya que a parte del nitrógeno gas generado ($1.02 \text{ moles } \text{N}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+ \text{ eliminado}$) se obtiene una pequeña cantidad de nitrato ($0.26 \text{ moles } \text{NO}_3^- \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+ \text{ eliminado}$). Esta producción de nitrato se debe a la oxidación de una parte del nitrito en condiciones anaerobias (Strous *et al.*, 1998). La energía obtenida en esta reacción se utiliza para la fijación del CO_2 que permite el crecimiento de nuevas células. Al mismo tiempo, según la estequiometría de la reacción, se produce un consumo de protones ($0.13 \text{ moles } \text{H}^+ \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+ \text{ eliminado}$) que provoca un aumento de pH debido a la actividad de la biomasa anammox.

Por otro lado, el crecimiento de la biomasa anammox es muy lento, con una baja velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{\text{max}}=0.065 \text{ d}^{-1}$) y, por consiguiente, un tiempo de duplicación ($t_{1/2}=\ln 2/\mu_{\text{max}}$) de 11 días (Strous *et al.*, 1998; STOWA, 2001). Sin duda, este es el punto crítico para enriquecer los microorganismos anammox y llegar a aplicar el proceso a escala industrial. Si se compara con la velocidad específica de crecimiento de las bacterias nitrificantes, éstas presentan velocidades diez veces superiores ($\mu_{\text{max}}=0.77 \text{ d}^{-1}$ para las *Nitrosomonas* y $\mu_{\text{max}}=1.08 \text{ d}^{-1}$ para las *Nitrobacter*).

Este lento crecimiento de las bacterias anammox está relacionado con la baja velocidad específica de consumo de amonio, $0.04 \mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, siete veces menor que la velocidad específica de las bacterias amonio oxidantes, $0.3 \mu\text{mol NH}_4^+ \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Strous *et al.*, 1998). En este sentido, la baja velocidad de crecimiento de las bacterias anammox requiere períodos de puesta en marcha elevados. El tiempo necesario para poner en marcha y enriquecer la biomasa anammox puede oscilar entre los 2 y los 6 meses, dependiendo del inóculo escogido, de la tecnología utilizada y del afluente a tratar. Una vez realizada la puesta en marcha del proceso, las bacterias anammox adquieren un color rojizo debido al aumento de la actividad de la biomasa anammox y del citocromo C.

Al mismo tiempo, Strous (2000) determinó que esta velocidad específica máxima depende del pH y de la temperatura y que la actividad de las bacterias anammox está influenciada por la especie enriquecida, el afluente tratado y la configuración del proceso llevado a cabo. Además, calculó la energía de activación ($70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ NH}_4^+$) y la entalpía libre o energía libre de Gibbs

($\Delta G^\circ = -357 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{NH}_4^+$) del proceso anammox, similares a las que presentan los organismos quimiolitotróficos aerobios ($\Delta G^\circ = -315 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{NH}_4^+$, Wiesmann, 1994).

1.7.2 Microbiología del proceso anammox

A partir de estudios con técnicas moleculares de amplificación del ADN con PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y posterior secuenciación, las bacterias anammox se identificaron y clasificaron dentro del Dominio Bacteria, pertenecientes al Filo Planctomycetes y en el Orden de los Planctomycetales (Fuerst, 1995; Strous *et al.*, 1999a). Las bacterias anammox carecen de peptidoglicano en su pared celular, tienen un único compartimento (*anammoxosoma*) y se dividen por gemación, en contraste con la división por fisión binaria de la mayoría de bacterias (Van Niftrik *et al.*, 2004; Fuerst, 2005).

Hasta el momento se han identificado diversos géneros de bacterias que realizan el proceso anammox: *Candidatus Brocadia*, *Candidatus Kuenenia* y *Candidatus Anammoxoglobus*, encontrados en plantas de tratamiento de aguas residuales, y *Candidatus Scalindua*, localizado en ambientes marinos, como el Mar Negro, la corriente de Benguela y/o el Mar de Arabia. Dentro de cada género se han descubierto diferentes especies, las cuáles se detallan en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7 Relación de las especies anammox localizadas en diferentes ambientes.

Localización	Especie	Referencia
Plantas tratamiento aguas residuales	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	Strous <i>et al.</i> (1999a)
	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>	Kartal <i>et al.</i> (2004)
	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	Schmid <i>et al.</i> (2000)
	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i>	Kartal <i>et al.</i> (2007b)
Ambientes marinos	<i>Ca. Scalindua sorokinii</i>	Kuypers <i>et al.</i> (2003)
	<i>Ca. Scalindua brodae</i>	Schmid <i>et al.</i> (2003)
	<i>Ca. Scalindua wagneri</i>	Schmid <i>et al.</i> (2003)
	<i>Ca. Scalindua arabica</i>	Woebken <i>et al.</i> (2008)

Los géneros *Ca. Brocadia* y *Ca. Kuenenia* son los más hallados en la mayoría de estudios y enriquecimientos realizados por los diferentes investigadores a lo largo de estos últimos años. La diferencia principal entre las especies *Ca. Brocadia anammoxidans* y *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* es que a pH=8 y 40°C la especie *Ca. Brocadia anammoxidans* tiene una actividad específica más elevada, $55 \text{ nmol N}_2\cdot\text{mg proteina}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Jetten *et al.*, 1999), que la especie *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*, $26 \text{ nmol N}_2\cdot\text{mg proteina}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Egli *et al.*, 2001), a pH=8 y 37°C.

Cabe resaltar que la diferencia de temperatura de cada estudio puede influir en las actividades específicas obtenidas. Por otro lado, el género *Kuenenia* tiene una tolerancia al nitrito y al fosfato superior a la del género *Brocadia* (Egli *et al.*, 2001).

Recientemente se ha secuenciado el genoma de la especie *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* (<http://www.genoscope.cns.fr>) fruto de la colaboración de diversos investigadores (Strous *et al.*, 2006). No obstante, aún no se ha conseguido aislar las bacterias anammox en un cultivo puro.

1.7.3 Bioquímica del proceso anammox

El proceso anammox está fuertemente estimulado por dos intermedios químicos: la hidroxilamina (NH_2OH) y la hidracina (N_2H_4) (Strous *et al.*, 1999b; Jetten *et al.*, 2005b). Jetten *et al.* (2001) determinaron que las bacterias anammox consumían rápidamente estos compuestos durante los diez primeros minutos de la reacción. En la misma línea, Van de Graaf *et al.* (1997) expusieron que cuando se adicionaba hidracina, ésta se consumía rápidamente por la biomasa anammox.

Posteriormente, Strous *et al.* (1999b) añadieron hidroxilamina e hidracina para restablecer el proceso anammox, después de producirse la inhibición del sistema por la acumulación de nitrito. En este sentido, Ahn and Kim (2004) añadieron estos intermedios para estimular la biomasa anammox y restaurar el proceso ante la inhibición provocada por la acumulación de nitrito. Si nos centramos en la ruta metabólica del proceso anammox (Figura 1.5), la combinación de amonio e hidroxilamina forma el compuesto hidracina, que finalmente es oxidado a nitrógeno gas.

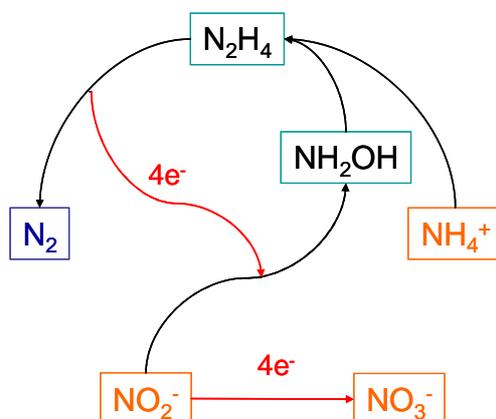


Figura 1.5 Ruta metabólica del proceso anammox a partir de los intermedios de reacción: hidroxilamina (NH_2OH) e hidracina (N_2H_4) (Schalk *et al.*, 2000).

Esta oxidación produce $4e^-$ que se utilizan para realizar la reducción de nitrito a hidroxilamina y empezar de nuevo la reacción anammox. Durante esta reacción, una parte del nitrito es oxidada a nitrato generando los electrones necesarios para el crecimiento autotrófico reduciendo el CO_2 (Van de Graaf *et al.*, 1996). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que hasta que la hidroxilamina no está completamente consumida, no empieza a disminuir la concentración de hidracina durante el proceso anammox (Kartal *et al.*, 2008).

La hidracina, compuesto intermedio producido durante el metabolismo del proceso anammox, es un compuesto tóxico para los microorganismos anammox si se acumula durante largos períodos de tiempo (Schalk *et al.*, 1998). Para evitar esta elevada toxicidad, las bacterias anammox contienen un orgánulo intracelular llamado *anammoxosoma*. La hidracina queda confinada en el interior de la membrana *anammoxosoma* evitándose la inhibición del proceso. En la Figura 1.6 se representan los componentes celulares de las bacterias anammox.

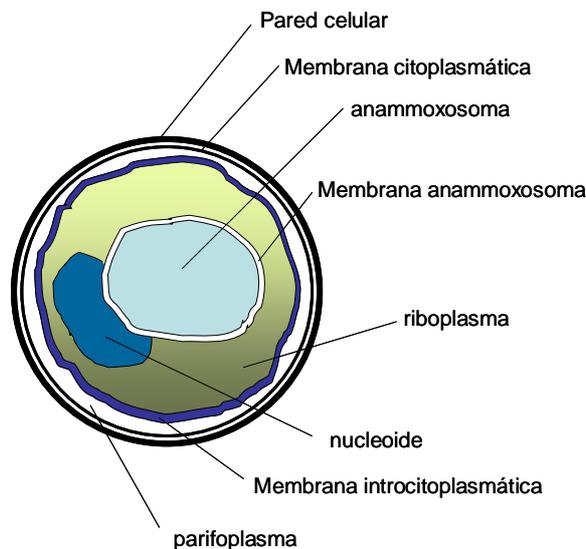


Figura 1.6 Esquema de los componentes celulares presentes en las bacterias anammox (Van Niftrik *et al.*, 2004).

El *anammoxosoma* representa, aproximadamente, el 30% del volumen interno de la célula y está rodeado por una membrana lipídica escalonada (*membrana anammoxosoma*) con múltiple concatenación de anillos de ciclobutano, muy compacta e inusual, únicamente encontrada en bacterias anammox (Sinninghe Damsté *et al.*, 2004; Van Niftrik *et al.*, 2004). La reacción catabólica del proceso anammox tiene lugar en el interior del *anammoxosoma* (Sinninghe Damsté *et al.*, 2002). El material nuclear (*nucleoide*) de la célula está contenido en el interior de una doble membrana (*introcitoplasmática*), típica de los Planctomycetes. Además del *anammoxosoma*, hay otros dos compartimentos separados por membranas presentes en el citoplasma: el *riboplasma* que contiene ribosomas con las proteínas asociadas y el *pariflasma*.

Un posible mecanismo bioquímico del proceso anammox se presenta en la Figura 1.7 (Van Niftrik *et al.*, 2004), donde se observa como el amonio (NH_4^+) se combina con la hidroxilamina (NH_2OH) para formar hidracina (N_2H_4) mediante la enzima hidracina hidrolasa (hh).

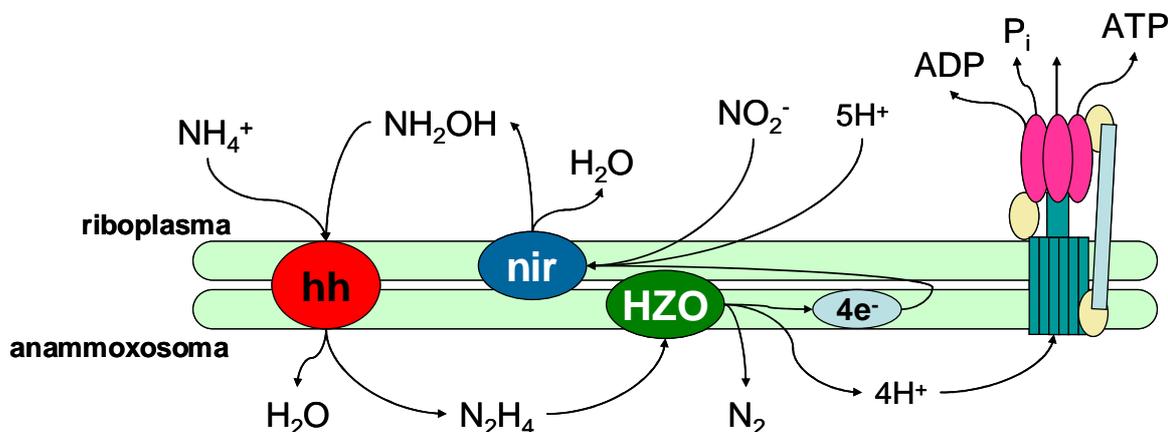


Figura 1.7 Mecanismo de la reacción anammox en la membrana del *anammoxosoma*. HZO: hidracina oxidasa; hh: hidracina hidrolasa; nir: nitrito reductasa. (Adaptado de Van Niftrik *et al.*, 2004).

La hidracina es oxidada a nitrógeno gas (N_2) por la enzima hidracina oxidasa (HZO). Esta oxidación tiene lugar en el interior del *anammoxosoma*, donde se generan 4H^+ y 4e^- y el producto final es nitrógeno gas (Sinninghe Damsté *et al.*, 2002). En el *riboplasma*, estos 4e^- son utilizados junto con 5H^+ por la enzima nitrito reductasa (nir) para reducir el nitrito (NO_2^-) a hidroxilamina y empezar de nuevo el proceso anammox (Kuenen and Jetten, 2001; Schmidt *et al.*, 2003; Van Niftrik *et al.*, 2004).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en el metabolismo de las bacterias anammox la hidroxilamina no funciona como intermediario. Según Strous *et al.* (2006), es el óxido nítrico (NO) el que actúa como intermediario del proceso anammox.

1.7.4 Localización de las bacterias anammox

Las investigaciones realizadas tanto en sistemas naturales como en sistemas de tratamiento de aguas residuales evidenciaron, a partir de los balances de materia realizados, que el proceso anammox estaba relacionado con las pérdidas de nitrógeno detectadas en estos sistemas. En este sentido, se puede afirmar que los microorganismos anammox se encuentran en sistemas naturales tales como lagos, estuarios o fosas marinas (Dalsgaard and Thamdrup, 2002), aunque en concentraciones muy bajas, y en diferentes sistemas de tratamiento de aguas residuales (Siegrist *et al.*, 1998).

Mulder *et al.* (1995) observaron en un reactor de lecho fluidizado la conversión de amonio y nitrato a nitrógeno gas en condiciones anaerobias. Posteriormente, Siegrist *et al.* (1998) encontraron bacterias anammox en un reactor biológico rotativo de contacto que trataba lixiviados de vertedero. Egli *et al.* (2001) enriquecieron bacterias anammox a partir de un inóculo procedente de un sistema de tratamiento de lixiviados que contenían elevadas concentraciones de amonio y bajas concentraciones de materia orgánica biodegradable. En este sentido, Helmer-Madhok *et al.* (2002) detectaron pérdidas de nitrógeno en reactores aeróbicos que operaban con biomasa fijada. En estos casos, en la parte más interna del *biofilm*, donde la concentración de oxígeno disuelto es nula, es donde se manifiesta la actividad de las bacterias anammox.

La mayoría de estos sistemas en donde se ha detectado la presencia de bacterias anammox trabajaban con elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal, combinando zonas aerobias y anóxicas y a temperaturas elevadas (Siegrist *et al.*, 1998; Egli *et al.*, 2001; Helmer *et al.*, 2001; Hippen *et al.*, 2001). Estas condiciones aumentaban la probabilidad de detectar a las bacterias anammox.

Los microorganismos anammox juegan un papel importante en el ciclo biogeoquímico global del nitrógeno (Jetten *et al.*, 2002, 2005a). Estas bacterias están presentes en diversidad de ecosistemas como estuarios, fosas marinas y en el océano ártico (Jetten *et al.*, 2003). Diversos investigadores determinaron que la biomasa anammox contribuía hasta en un 50% en la producción de N₂ gas a partir de los ecosistemas marinos, como el Mar Negro (Kuypers *et al.*, 2003; Dalsgaard *et al.*, 2005). Además, mediante balances de materia y realizando el seguimiento de la trazabilidad a través del isótopo ¹⁵N, se comprobó que la contribución del proceso anammox en la producción total de nitrógeno gas (N₂) se situaba entre un 30 y 70% (Jetten *et al.*, 2005a).

1.7.5 Factores que afectan a la actividad de las bacterias anammox

El proceso anammox es sensible a alteraciones de los diferentes parámetros que intervienen en el sistema y a la presencia de tóxicos e inhibidores, lo que puede retardar la puesta en marcha del proceso. A continuación, se presenta la influencia de los parámetros fisicoquímicos que intervienen en el proceso (pH, temperatura, oxígeno disuelto, entre otros), así como los efectos de la concentración de sustrato (amonio y nitrito), producto (nitrato) y materia orgánica sobre la actividad de la biomasa anammox.

1.7.5.1 Efecto del pH

La actividad de las bacterias anammox puede verse afectada por el pH. Según Jetten *et al.* (1999), el rango de pH activo para llevar a cabo el proceso anammox está entre 6.7 y 8.3, con un pH óptimo de 8 para la especie *Ca. Brocadia anammoxidans*, en el que se obtiene la mayor tasa de eliminación de amonio y nitrito. En la Tabla 1.8 se presenta la actividad de la biomasa anammox (*Ca. Kuenenia stuttgartiensis*) obtenida a partir de ensayos en *batch* realizados a 37°C utilizando el amonio y el nitrito como sustratos.

Tabla 1.8 Efecto del pH sobre la actividad de las bacterias anammox (Egli *et al.*, 2001)

Valor pH	Actividad biomasa anammox ($\text{nmol N}_2 \cdot (\text{mg proteína} \cdot \text{min})^{-1}$)	
6.0	Actividad nula	0
6.5	Actividad nula	0
7.0	Actividad media	14.8
7.5	Actividad máxima	24
8.0	Actividad máxima	26.5
8.5	Actividad observada	nd*
9.0	Actividad observada	nd*

*no determinado

Según Egli *et al.* (2001), la máxima actividad anammox observada se obtuvo a valores de pH de 7.5 y 8.0 (24.0 y $26.5 \text{ nmol N}_2 \cdot (\text{mg proteína} \cdot \text{min})^{-1}$, respectivamente). Sin embargo, no se observó actividad anammox a valores de pH inferiores a 6.5, pero si que se observó a valores de pH superiores a 8.5. En este sentido, Ahn *et al.* (2004) operaron un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente o *UASB* (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) con purines de cerdo y obtuvieron un efluente con un valor de pH de 9.3 sin observarse inhibición del proceso anammox. En cambio, Fux *et al.* (2004) observaron la pérdida completa de la actividad anammox a un pH de 9.3.

1.7.5.2 Efecto de la temperatura

Strous *et al.* (1999b) calcularon las velocidades de eliminación de sustrato y de generación de nitrato a diferentes temperaturas. Estos autores observaron que la temperatura óptima para llevar a cabo el proceso anammox oscilaba entre 37 y 43°C. En este sentido, para determinar la temperatura óptima a la que operan los microorganismos anammox, Egli *et al.* (2001) llevaron a cabo estudios en *batch* a diferentes temperaturas (entre 10 y 45°C). La máxima actividad anammox observada fue a 37°C. Por otro lado, no se observó actividad anammox a una

temperatura de 45°C y la actividad a 11°C era un 24% de la observada a 37°C. Entre 20 y 37°C se determinó una actividad anammox inferior a la obtenida a 37°C.

1.7.5.3 Efecto de la concentración de oxígeno disuelto

Strous *et al.* (1997b) determinaron, a través de ensayos en *batch*, que a concentraciones superiores al 0.5% de oxígeno disuelto de saturación, la biomasa anammox era inhibida. La actividad de las bacterias anammox se recuperaba cuando se restablecían las condiciones anaerobias en el interior del reactor, aportando argón y/o CO₂ al sistema. Del mismo modo, Egli *et al.* (2001), observaron que una vez eliminadas concentraciones de 0.25, 0.5 y 1% de oxígeno disuelto de saturación, la actividad anammox era recuperada totalmente. Según estos investigadores, esto indicaba una inhibición reversible del proceso después de mantener la biomasa anammox en contacto con oxígeno.

1.7.5.4 Efecto de la velocidad de agitación

El mecanismo de cómo las fuerzas hidrodinámicas influyen en la formación y estructura de *biofilms* y gránulos no está todavía descrito. Sin embargo, la velocidad de agitación es un parámetro a tener en cuenta a la hora de poner en marcha y enriquecer un reactor anammox. Arrojo *et al.* (2006) determinaron el efecto del estrés mecánico causado por la velocidad de agitación en la biomasa granular anammox enriquecida en un SBR. Entre 60 y 180 revoluciones por minuto (rpm) no se observó la inhibición del proceso anammox. En cambio, a velocidades de agitación superiores a 250 rpm la actividad específica de la biomasa anammox decrecía un 40% debido a la desestabilización del sistema provocada por la muerte celular y la ruptura de los gránulos. Al romperse el gránulo la retención de la biomasa en el sistema disminuía, provocando su pérdida por el efluente y en consecuencia una menor eliminación de nitrógeno, la acumulación de nitrito y la inhibición del proceso.

1.7.5.5 Efecto de la concentración de sustrato y producto

Strous *et al.* (1999b) determinaron que las bacterias anammox no eran inhibidas por elevadas concentraciones de amonio y nitrato (1 g N·L⁻¹). Sin embargo, en este mismo estudio se comprobó que el proceso era inhibido por la presencia de nitrito cuando la concentración era superior a 100 mg N-NO₂⁻·L⁻¹. En la Tabla 1.9 se presenta la concentración de nitrito a la cuál se inhibe el proceso anammox según diferentes estudios realizados.

Tabla 1.9 Relación de las concentraciones de nitrito inhibitorias para el proceso anammox.

Género	NO ₂ ⁻ (mg N-NO ₂ ⁻ ·L ⁻¹)	Referencia
<i>Candidatus Brocadia</i>	70	Van Dongen <i>et al.</i> (2001)
	100	Strous <i>et al.</i> (1999b)
	140	Jetten <i>et al.</i> (2005a)
<i>Candidatus Kuenenia</i>	60	Fux <i>et al.</i> (2002)
	60	Arrojo <i>et al.</i> (2006)
	180	Van de Graaf <i>et al.</i> (1996)
	180	Egli <i>et al.</i> (2001)
<i>Candidatus Scalindua</i>	100-140	Schmidt <i>et al.</i> (2004)
	180	Schmidt <i>et al.</i> (2003)

Analizando las concentraciones de nitrito que inhiben el proceso anammox (Tabla 1.9) se deduce que los géneros *Ca. Kuenenia* y *Scalindua* tienen una tolerancia más elevada al nitrito que el género *Ca. Brocadia*. Sin embargo, cuando más elevada es la concentración de biomasa anammox se produce una mayor degradación de nitrito y por lo tanto una menor acumulación e inhibición del proceso.

1.7.5.6 Efecto de la materia orgánica

La mayoría de corrientes de aguas residuales susceptibles de ser tratadas mediante la combinación de los procesos de nitrificación parcial y anammox contienen una fracción de materia orgánica, ya sea biodegradable o no. La entrada de la fracción biodegradable de esta materia orgánica en un reactor anammox puede provocar el desarrollo de la biomasa heterotrófica desnitrificante. En condiciones anóxicas y en presencia en el medio de nitrito y nitrato, la materia orgánica biodegradable se consume por los microorganismos desnitrificantes heterotróficos para producir nitrógeno gas. En este sentido, diversos estudios han confirmado el efecto de la materia orgánica, tanto positivo (Güven *et al.*, 2005; Jianlong and Jing, 2005; Kartal *et al.*, 2007b; Sabumon, 2007) como negativo (Toh and Ashbolt, 2002; Ahn, 2006), sobre la biomasa anammox.

Los microorganismos anammox son poco competitivos por el sustrato, mientras que los organismos heterotróficos tienen una elevada afinidad (Jetten *et al.*, 1999; Ahn and Kim, 2004; Chamchoi *et al.*, 2008). De este modo, hay una competencia por el nitrito entre la biomasa anammox y los microorganismos heterotróficos desnitrificantes en presencia de materia orgánica biodegradable. No obstante, la desnitrificación heterotrófica está limitada por la disponibilidad de materia orgánica biodegradable.

Strous *et al.* (1997a) demostraron la viabilidad de la coexistencia de los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica para tratar aguas residuales con presencia de materia orgánica biodegradable. En este contexto, Ahn *et al.* (2004) investigaron la contribución de los organismos autotróficos y heterotróficos en la eliminación de nitrógeno y materia orgánica mediante balances de carbono y nitrógeno. Estos investigadores trataron purines de cerdo con una relación C:N de 11 g DQO·g⁻¹ T-N en un reactor UASB, obteniendo una conversión de nitrógeno de 0.66 kg N·m⁻³·d⁻¹ con una carga de materia orgánica de 6 kg DQO·m⁻³·d⁻¹. Además, calcularon que el 80% del nitrito eliminado se realizaba a través del proceso anammox, mientras que el restante se eliminaba mediante el proceso de desnitrificación heterotrófica. Sin embargo, Ahn (2006) determinaron que la coexistencia de la biomasa anammox y las bacterias desnitrificantes heterotróficas durante la puesta en marcha del proceso disminuía la eliminación anaerobia del amonio.

Estudios recientes han determinado la eliminación de materia orgánica por parte de las bacterias anammox y los microorganismos heterotróficos. Según Güven *et al.* (2005) diversos ácidos orgánicos (acetato y propionato) fueron oxidados por las bacterias anammox y las bacterias desnitrificantes heterotróficas. El consumo de propionato se produjo al mismo tiempo que la eliminación de amonio y nitrito por parte de la biomasa anammox. En este mismo estudio, se determinó que el número de bacterias anammox y desnitrificantes heterotróficas no varió significativamente durante 150 días. Esto indicó que las bacterias anammox y los organismos desnitrificantes heterotróficos competían satisfactoriamente por el propionato.

En este sentido, Kartal *et al.* (2007b) descubrieron una nueva especie anammox, *Ca. Anammoxoglobus propionicus*, que podía competir con los organismos desnitrificantes heterotróficos por la oxidación del propionato en presencia de amonio, nitrito y nitrato. Posteriormente, Kartal *et al.* (2008) demostraron, mediante diversos experimentos en *batch*, que otra especie, *Ca. Brocadia fulgida*, oxidaba acetato a una velocidad elevada. Sin embargo, la biomasa anammox no incorporaba directamente este acetato. Esta misma especie era capaz de oxidar otros compuestos orgánicos como por ejemplo el formiato y el propionato. De este modo, se concluyó que las bacterias anammox tenían un metabolismo mucho más versátil del que hasta la fecha se conocía (Güven *et al.*, 2005; Kartal *et al.*, 2007a; 2007b; 2008).

En la Tabla 1.10 se muestra una relación de las velocidades de oxidación de los diferentes ácidos orgánicos (formiato, acetato y propionato) por parte de diferentes especies anammox. Las velocidades de oxidación de formiato y acetato por la especie *Ca. Brocadia fulgida* eran más elevadas que las que presentaban las otras especies. Además, la velocidad de oxidación del propionato por parte de la biomasa *Ca. Brocadia fulgida* fue, aproximadamente, tres veces más

elevada que las especies *Ca. Brocadia anammoxidans* y *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* pero la mitad que la especie *Ca. Anammoxoglobus propionicus*.

Tabla 1.10 Velocidades de oxidación de ácidos orgánicos ($\mu\text{mol}\cdot(\text{g proteína}\cdot\text{min})^{-1}$) de las diferentes especies anammox (Kartal *et al.*, 2008).

	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> *	<i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i> *	<i>Ca. Anammoxoglobus propionicus</i> *	<i>Ca. Brocadia fulgida</i>
Formiato	6.5±0.6	5.8±0.6	6.7±0.6	7.6±0.6
Acetato	0.57±0.05	0.31±0.03	0.79±0.07	0.95±0.04
Propionato	0.12±0.01	0.12±0.01	0.64±0.05	0.31±0.07

* Velocidades de oxidación tomadas de Kartal *et al.* (2007b)

No obstante, diversos estudios demostraron los efectos negativos de determinados compuestos orgánicos sobre el proceso anammox. De este modo, Toh and Ashbolt (2002) demostraron que el proceso anammox se inhibía por la adición de elevadas cargas de fenol procedentes de las aguas residuales de una fábrica de tratamiento de carbón. Una vez el fenol fue eliminado de este afluente, se recuperó la actividad de las bacterias anammox. Así mismo, Güven *et al.* (2005) indicaron que algunos alcoholes, como el etanol y el metanol, inhibían el proceso anammox. Concretamente, el metanol inhibió completa e irreversiblemente el sistema anammox a una concentración de 0.5 mM (6 mg C-CH₃OH·L⁻¹).

1.7.6 Tecnologías aplicadas para operar reactores anammox

Debido al lento crecimiento de las bacterias anammox, las tecnologías utilizadas en este proceso se caracterizan por tener una buena retención de biomasa. En este sentido, las tecnologías desarrolladas para llevar a cabo este proceso se pueden dividir en sistemas de biopelículas con biomasa fijada sobre un soporte inerte y procesos de biomasa en suspensión. La mayoría de procesos que operan con biomasa en suspensión trabajan con biomasa granular, aunque también pueden operar con fangos activos o células libres en suspensión (Van der Star *et al.*, 2008). La formación de agregados en forma de gránulos incrementa la retención de la biomasa y la velocidad de sedimentación de las bacterias, permitiendo una mayor concentración de biomasa en el reactor y minimizando su pérdida a través del afluente (Beun *et al.*, 2000).

En la Tabla 1.11 se presenta una relación de las tecnologías utilizadas para operar reactores anammox. En esta tabla se detallan las características más importantes de estos sistemas: reactor o tecnología utilizada, tipo de biomasa y material de soporte utilizado, así como el tipo de afluente, escala de trabajo y las concentraciones de sustrato utilizadas. Además, se presentan la carga de nitrógeno aplicada y eliminada y la actividad específica de las bacterias anammox.

Tabla 1.11 Tecnologías y condiciones aplicadas para operar reactores anammox.

Tipo reactor	Tipo biomasa (Material de soporte)	Aplicación (Afluente/escala/[N-NH ₄ ⁺]/[N-NO ₂] ⁻) (g·L ⁻¹)	Carga aplicada (kg N·m ⁻³ ·d ⁻¹)	Carga eliminada (kg N·m ⁻³ ·d ⁻¹)	Actividad específica (kg N·kg SSV ⁻¹ ·d ⁻¹)	Referencia
SBR	Granular	S/lab/0.26/0.20	-	0.32	0.25 ⁽¹⁾	Sliekers <i>et al.</i> (2002)
	Fangos activos/Fangos activos + zeolitas	S/lab/0.21/0.24	0.6	0.6	-	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2004a)
	Fangos activos	S/lab/-/-	0.75	0.6	0.03	Third <i>et al.</i> (2005)
	Granular	S/lab/0.37/0.37	0.75	0.7	0.65	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2004b)
		PS/ind/0.55/0.60	0.75	0.75	0.8	Van Dongen <i>et al.</i> (2001)
		S/lab/0.42/0.42	1.0	0.9	1.30	Strous <i>et al.</i> (1998)
	Fangos activos	NP/ind/-/-	-	0.9	0.16 ⁽¹⁾	Fux <i>et al.</i> (2003)
		S/lab/0.40/0.50	1.4	1.15	0.18	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2004c)
		NP/ind/0.42/0.42	2.6	2.4	0.30 ⁽¹⁾	Fux <i>et al.</i> (2002)
	Lecho fijo	Biofilm/PVC (R1)	S/lab/0.22/0.26	0.42	0.35	-
Biofilm/polipropileno (R3)		S/lab/0.37/0.40	0.44	0.35	-	
Biofilm/Bola vidrio		S/lab/0.84/0.84	1.3	1.1	-	Strous <i>et al.</i> (1997a)
Biofilm/PVC (R2)		NP/lab/0.40/0.40	-	3.5	-	Fux <i>et al.</i> (2004)
Biofilm/Gel polietilenglicol		S/lab/0.2/0.2	4.2	3.4	-	Isaka <i>et al.</i> (2007)
Lecho fluidizado	Biofilm/Arena	PL/lab/0.13/-	-	1.5	0.003 ⁽²⁾	Mulder <i>et al.</i> (1995)
		DF/lab/2.1/0.84	-	1.5	0.15	
		S/lab/0.84/0.84	-	1.8	0.18	Strous <i>et al.</i> (1997a)
		S/lab/0.42/0.42	-	3.0	0.5	Jetten <i>et al.</i> (1997)
		S/lab/0.42/0.49	5.2	4.8	-	Van de Graaf <i>et al.</i> (1996)

⁽¹⁾ kg N·kg SST⁻¹·d⁻¹; ⁽²⁾ kg N-NH₄⁺·kg SSV⁻¹·d⁻¹; ⁽³⁾ g N·m⁻²·d⁻¹

Tipo de reactor: (SBR) *Sequencing Batch Reactor*

Tipo de afluente: (S) Sintético; (PS) Afluente proceso SHARON; (NP) Afluente nitrificación parcial; (DF) Afluente digestor fangos; (PL) Afluente planta levaduras; (P) Purines cerdo; (IP) Afluente industria papel; (L) Lixiviado

Escala de trabajo: (lab) *escala laboratorio*; (ind) *escala industrial*; (real) *escala real*

Tipo reactor	Tipo biomasa (Material de soporte)	Aplicación (Afluente/escala/[N-NH ₄ ⁺]/[N-NO ₂] ⁻ (g·L ⁻¹))	Carga aplicada (kg N·m ⁻³ ·d ⁻¹)	Carga eliminada (kg N·m ⁻³ ·d ⁻¹)	Actividad específica (kg N·kg SSV ⁻¹ ·d ⁻¹)	Referencia
UASB	Granular	IP/lab(R2)/0.06/0.07	0.52	0.5	-	Schmidt <i>et al.</i> (2004)
		P/lab/2.16/2.5	1.02	0.7	0.08	Ahn <i>et al.</i> (2004)
		P/lab/0.21/0.32	1.4	0.7	0.1	Hwang <i>et al.</i> (2005)
		S/lab/0.51/0.7	-	2.9	-	Imajo <i>et al.</i> (2004)
		DF/ind/1.0/1.4	7.0	6.4	-	Imajo <i>et al.</i> (2004)
RBC	Biofilm	S/lab/-/-	-	1.4	-	Egli <i>et al.</i> (2001)
	Biofilm/Discos PVC	S/lab/0.53/0.4	0.30	-	0.30	Pynaert <i>et al.</i> (2002)
		L/real/0.3/-	-	0.4	-	Siegrist <i>et al.</i> (1998)
MBBR	Biofilm/Aro Kaldnes	DF-NP/ind/0.6/-	0.42	0.19	-	Szatkowska <i>et al.</i> (2007)
		DF/lab/-/-	2.4	1.1	-	Hippen <i>et al.</i> (2001)
		DF/lab/-/-	4.8 ⁽³⁾	-	2.0 ⁽³⁾	Seyfried <i>et al.</i> (2001)
Gas-lift	Granular	S/lab/0.9/1.1	2.0	1.8	0.9	Dapena-Mora <i>et al.</i> (2004b)
		S/lab/1.36/1.36	10.7	8.9	-	Sliekers <i>et al.</i> (2003)
MBR	Granular	S/lab/0.39/0.39	0.8	0.7	0.45	Trigo <i>et al.</i> (2006)
	Biofilm	S/lab/0.2/-	0.87	0.77	-	Gong <i>et al.</i> (2007)
	Fangos activos	S/lab/1.68/1.68	1.46	1.28	-	Van der Star <i>et al.</i> (2008)

⁽¹⁾ kg N·kg SST⁻¹·d⁻¹; ⁽²⁾ kg N-NH₄⁺·kg SSV⁻¹·d⁻¹; ⁽³⁾ g N·m⁻²·d⁻¹

Tipo de reactor: (UASB) *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*; (RBC) *Rotating Biological Contactor*; (MBBR) *Moving Bed Biofilm Reactor*; (MBR) *Membrane Bioreactor*

Tipo de afluente: (S) Sintético; (PS) Afluente proceso SHARON; (NP) Afluente nitrificación parcial; (DF) Afluente digester fangos; (PL) Afluente planta levaduras; (P) Purines cerdo; (IP) Afluente industria papel; (L) Lixiviado

Escala de trabajo: (lab) *escala laboratorio*; (ind) *escala industrial*; (real) *escala real*

Las tecnologías utilizadas para operar un reactor anammox con un sistema de biomasa fijada son: reactores biológicos rotativos de contacto (RBC, *Rotating Biological Contactor*), reactores MBBR (*Moving Bed Biofilm Reactor*), reactores de lecho fijo y reactores de lecho fluidizado. Por un lado, los reactores RBC utilizan discos de PVC (Cloruro de polivinilo) como material de soporte (Siegrist *et al.*, 1998; Pynaert *et al.*, 2002). Mediante este tipo de reactor, Egli *et al.* (2001) eliminaron $1.4 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ tratando un afluente sintético. Por otro lado, Hippen *et al.* (2001) utilizaron los sistemas MBBR, con aros *Kaldnes* como material de soporte, para tratar efluentes de digestores de fangos con una carga de nitrógeno de $2.4 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ eliminando una carga de $1.1 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$.

Por otro lado, los reactores de lecho fijo y de lecho fluidizado fueron las otras dos tecnologías utilizadas para operar reactores anammox con biomasa fijada. Strous *et al.* (1997a) eliminaron $1.1 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ en un reactor de lecho fijo tratando un afluente sintético con unas concentraciones de amonio y nitrito de $0.84 \text{ g N}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, utilizando bolas de vidrio como soporte. Fux *et al.* (2004) operaron con un afluente de nitrificación parcial, tratando $3.5 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ con biomasa anammox fijada en un soporte de PVC. Así mismo, Isaka *et al.* (2007) eliminaron una media de $3.4 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ de un afluente sintético con biomasa anammox adherida a un soporte gelificado de polietilenglicol. En referencia a los sistemas de lecho fluidizado, se utilizó arena como material de soporte para fijar la biomasa anammox. En este sentido, Strous *et al.* (1997a) trataron un afluente de digestores de fangos y eliminaron $1.5 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. Van de Graaf *et al.* (1996) y Jetten *et al.* (1997) consiguieron eliminar una elevada carga de nitrógeno, 4.8 y $3.0 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente, tratando un afluente sintético.

En cuanto a las configuraciones de reactor utilizadas por los investigadores para operar reactores anammox con biomasa en suspensión granular se destacan: reactores SBR (*Sequencing Batch Reactor*), reactores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), reactores *gas-lift* y reactores biológicos de membranas (MBR, *Membrane Bioreactor*).

Se ha de destacar que la tecnología SBR ha sido una de las más utilizadas para operar reactores anammox. Strous *et al.* (1998) demostraron que es un sistema apropiado para realizar el enriquecimiento de bacterias anammox. Estos investigadores eliminaron $0.9 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ con biomasa granular anammox a partir de un afluente sintético y obtuvieron una actividad específica elevada ($1.3 \text{ kg N}\cdot\text{kg SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). A parte de Strous *et al.*, la tecnología SBR ha sido escogida por diversos investigadores para llevar a cabo el proceso anammox.

En este sentido, Dapena-Mora *et al.* (2004c) enriquecieron un SBR con biomasa anammox a partir de una mezcla de lodos procedentes de tres estaciones depuradoras de agua residual

(EDAR). A los dos meses ya se apreció un consumo de amonio y nitrito, para finalizar el estudio eliminando $1.15 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. Además, Dapena-Mora *et al.* (2004b) trataron, en un SBR con biomasa granular anammox, un afluente sintético con una carga de nitrógeno de $0.75 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, obteniendo un porcentaje de eliminación de nitrito del 99% y una actividad específica de $0.65 \text{ kg N}\cdot\text{kg SSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Por su parte, Fux *et al.* (2002) eliminaron una carga de nitrógeno de $2.4 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ en un reactor SBR de 1.6 m^3 de capacidad tratando efluentes de digestores anaerobios procedentes de un sistema de nitrificación parcial. La biomasa anammox generada en este estudio se utilizó para inocular un reactor industrial de 500 m^3 de capacidad (Wett, 2006). Mientras que Van Dongen *et al.* (2001) enriquecieron la biomasa granular anammox, llegando a tratar $0.75 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ de un afluente procedente del tratamiento de elevadas cargas de nitrógeno a través de proceso SHARON (*Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite*).

Otra configuración de reactor utilizada para realizar la aplicación del proceso anammox fue la tecnología basada en reactores UASB, muy apropiada para la formación de gránulos. Esta tecnología se caracterizó por tener una buena retención de biomasa, aunque se puede mejorar la distribución del sustrato. Ahn *et al.* (2004) eliminaron $0.7 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ tratando purines de cerdo con una relación C:N de $11 \text{ g COD}\cdot\text{g}^{-1} \text{ T-N}$. Imajo *et al.* (2004) obtuvieron una elevada eliminación de nitrógeno tratando retornos de digestores anaerobios de una EDAR municipal ($6.4 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$).

Los reactores *gas-lift* son otra opción para operar el proceso anammox con biomasa granular. Dapena-Mora *et al.* (2004b) enriquecieron biomasa anammox a partir de un afluente sintético, llegando a tratar $1.8 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ en un reactor *gas-lift* utilizando argón 100% para mantener la biomasa en suspensión. Pero la tasa de eliminación de nitrógeno más elevada fue conseguida por Sliemers *et al.* (2003), que eliminaron $8.9 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ tratando un afluente sintético que contenía $1.36 \text{ g N}\cdot\text{L}^{-1}$ en forma de amonio y nitrito, respectivamente.

Por último, los reactores biológicos de membranas también han sido utilizados para aplicar el proceso anammox. Trigo *et al.* (2006) trataron un afluente sintético en un MSBR (*Membrane Sequencing Batch Reactor*), eliminando $0.7 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. Van der Star *et al.* (2008) consiguieron eliminar $1.28 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ al tratar un efluente sintético que contenía $1.46 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$.

Finalmente, comentar que se ha puesto en marcha la primera planta real (*full-scale*) con biomasa granular anammox en Rotterdam (Holanda), tratando una carga de N de $10 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$

en un reactor de 70 m³. Sin embargo, se tardaron tres años y medio en poner la planta a pleno rendimiento (Abma *et al.*, 2007; Van der Star *et al.*, 2007).

1.7.7 Proceso combinado de nitrificación parcial y anammox

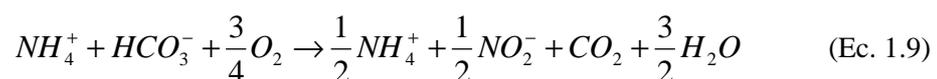
La nitrificación parcial seguida del proceso anammox es una alternativa técnica y económicamente viable al tratamiento convencional de nitrificación-desnitrificación cuando el agua residual a tratar presenta una elevada carga de nitrógeno amoniacal y una baja concentración de materia orgánica biodegradable, con una relación C:N inferior a la necesaria para realizar la desnitrificación.

Para llevar a cabo el proceso se debe tener en cuenta, por un lado la etapa previa al proceso anammox (nitrificación parcial) y por otro lado que la integración de ambos procesos sea mediante una única etapa o separando los dos procesos (dos etapas).

1.7.7.1 Nitrificación parcial

Para llevar a cabo la producción de nitrito vía nitrificación parcial, deben aplicarse unas condiciones de operación que eviten el desarrollo de las bacterias nitrito oxidantes, las cuáles realizan el proceso de nitratación (conversión de nitrito a nitrato). El pH, la temperatura, el TRH, la concentración de oxígeno disuelto y la relación molar amonio:bicarbonato son algunos de los parámetros que se han de controlar para obtener un efluente con una relación molar nitrito:amonio óptima para ser tratada por el proceso anammox (Strous *et al.*, 1998; Jenicek *et al.*, 2004). Además, la eficacia del proceso de nitrificación parcial está relacionada con las concentraciones de amoníaco libre (NH₃) y ácido nitroso (HNO₂) obtenidas durante el proceso, debido a la posible inhibición de las bacterias amonio y nitrito oxidantes por estos compuestos (Anthonisen *et al.*, 1976; Ganigué *et al.*, 2007).

Uno de los principales parámetros de control para convertir parcialmente el amonio a nitrito es la relación molar amonio:bicarbonato del afluente a tratar (Ecuación 1.9).



Como se observa en la Ecuación 1.9, para obtener un 50% de conversión de amonio a nitrito se necesita 1 mol de HCO₃⁻ por 1 mol de NH₄⁺ oxidado. En este sentido, para conseguir una conversión de 1.32 moles de NO₂⁻ por 1 mol de NH₄⁺ (proceso anammox) se debe ajustar la

cantidad de bicarbonato presente en el afluente tratado por el proceso de nitrificación parcial a 1.14 moles $\text{HCO}_3^- \cdot \text{mol}^{-1} \text{NH}_4^+$ oxidado (Ganigué *et al.*, 2008).

Por otro lado, operando a temperaturas elevadas (35°C) y con un tiempo de retención hidráulico (TRH) bajo se consigue controlar el crecimiento de las bacterias amonio oxidantes y nitrito oxidantes, dado que las primeras presentan velocidades específicas máximas de crecimiento más elevadas (Figura 1.8; Van Kempen *et al.*, 2001).

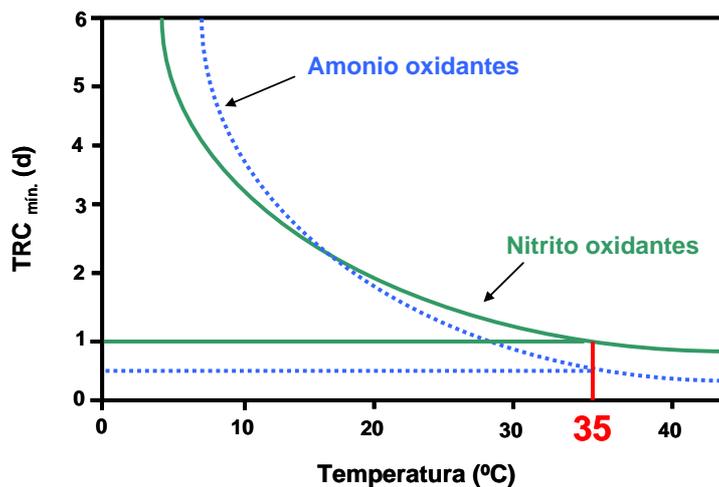


Figura 1.8 Efecto de la temperatura sobre el TRC_{mínimo} de las bacterias amonio y nitrito oxidantes.

Los sistemas convencionales (nitrificación-desnitrificación) operan a una temperatura entre 5 y 20°C. A estas temperaturas el crecimiento de las bacterias nitrito oxidantes es más rápido que el de las amonio oxidantes. En cambio, a temperaturas superiores a 25°C, las bacterias amonio oxidantes tienen un tiempo de retención celular (TRC) mínimo inferior a las bacterias nitrito oxidantes, lo que favorece el crecimiento de las primeras y la eliminación de las bacterias oxidantes de nitrito. Concretamente, a 35°C la μ_{max} de las bacterias amonio oxidantes es el doble que las bacterias nitrito oxidantes (1.0 d⁻¹ y 0.5 d⁻¹, respectivamente).

Otro parámetro a considerar para llevar a cabo el proceso de nitrificación parcial es el pH, ya que influye en el equilibrio entre las formas iónicas y no iónicas del amonio (Ecuación 1.10) y nitrito (Ecuación 1.11).



Teniendo en cuenta la temperatura, el pH del medio y el equilibrio entre las especies (Ecuaciones 1.10 y 1.11), pueden calcularse las concentraciones de amoníaco libre (NH_3) y de ácido nitroso (HNO_2) según las Ecuaciones 1.12 y 1.13

$$[N - \text{NH}_3] = \frac{[N - \text{NH}_4^+]}{1 + \left(\frac{10^{-\text{pH}}}{K_e^{\text{NH}}} \right)} \quad (\text{Ec. 1.12})$$

$$[N - \text{HNO}_2] = \frac{[N - \text{NO}_2^-]}{1 + \left(\frac{K_e^{\text{NO}}}{10^{-\text{pH}}} \right)} \quad (\text{Ec. 1.13})$$

donde $K_e^{\text{NH}} = e^{-6344/(273+T)}$ y $K_e^{\text{NO}} = e^{-2300/(273+T)}$

Aunque estas especies son las que asimilan los microorganismos nitrificantes, pueden llegar a inhibir el proceso de nitrificación (Anthonisen *et al.*, 1976 Ganigué *et al.* 2007). En este sentido, diversos estudios (Anthonisen *et al.*, 1976; Turk and Mavinic, 1989) demostraron que las bacterias amonio oxidantes y nitrito oxidantes se inhiben por NH_3 en el rango de $10\text{-}150 \text{ mg N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ y $0.1\text{-}10 \text{ mg N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Estudios recientes (Hellinga *et al.*, 1999; Van Hulle *et al.*, 2007) han demostrado que las bacterias amonio oxidantes presentan inhibición a bajas concentraciones de ácido nitroso libre (constante de inhibición= $2.04 \text{ mg N-HNO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$). En este sentido, Ganigué *et al.* (2007) han calculado las constantes de inhibición para las bacterias amonio oxidantes, obteniendo unos valores de $605.84 \pm 87.18 \text{ mg N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ y $0.49 \pm 0.09 \text{ mg N-HNO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

1.7.7.2 Procesos de una etapa

La integración de los procesos de nitrificación parcial y anammox combinando dos tipos de bacterias autotróficas (amonio oxidantes y anammox) en un solo reactor ha sido aplicada por diversos investigadores en sistemas que operan con biomasa fijada. Por un lado, las bacterias amonio oxidantes convierten parcialmente el amonio a nitrito bajo condiciones de oxígeno limitantes en la parte externa de la biopelícula. Por otro lado, el nitrito producido junto con el amonio restante penetran hacia la parte más interna del *biofilm* donde son convertidos en nitrógeno gas (N_2) por las bacterias anammox en condiciones anaerobias.

En esta línea, Third *et al.* (2001) demostraron mediante el sistema *CANON* (*Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite*) la eliminación de amonio en la parte externa del *biofilm* y la presencia de actividad anammox en la parte más interna, debido a que el oxígeno era consumido por los organismos nitrificantes aerobios, manteniendo así, las condiciones anaerobias en el interior de la biopelícula. Este proceso ha sido utilizado por diversos investigadores para llevar a cabo los procesos de nitrificación parcial y anammox en un solo reactor (Kuai and Verstraete, 1998; Hippen *et al.*, 2001; Helmer-Madhok *et al.*, 2002; Gaul *et al.*, 2005; Cema *et al.*, 2006; Furukawa *et al.*, 2006; Gut, 2006).

1.7.7.3 Procesos de dos etapas

La combinación de los procesos de nitrificación parcial y anammox en dos etapas ha sido utilizado por diversos investigadores para realizar el tratamiento de aguas residuales con una baja relación C:N. En este sentido, Hellings *et al.* (1998) desarrollaron el proceso SHARON (*Single reactor system for High Ammonium Removal Over Nitrite*) como etapa previa al proceso anammox. El proceso SHARON opera sin retención de biomasa (quimioestado), de manera que el TRH es igual al TRC o edad del fango. Así, trabajando a temperaturas elevadas (35°C) y con TRH relativamente bajos (1 d) se favorece el crecimiento de las bacterias amonio oxidantes (responsables del paso de amonio a nitrito) frente a las bacterias nitrito oxidantes (responsables del paso de nitrito a nitrato) (Figura 1.8).

Además, el proceso SHARON necesita trabajar con un afluente que contenga una relación molar amonio:bicarbonato de, aproximadamente, 1.0 (Ecuación 1.9) para obtener una relación molar nitrito:amonio óptima para ser tratada en el proceso anammox. Van Dongen *et al.* (2001) trataron efluentes de digestores anaeróbicos en un reactor continuo de tanque agitado (RCTA) de 10L mediante el proceso SHARON para convertir el 53% del amonio presente en el afluente. Posteriormente, este efluente obtenido se trató mediante el proceso anammox. Se ha de matizar que la entrada de bacterias amonio oxidantes no afectó al proceso anammox.

Ganigüé *et al.* (2007), mediante el proceso de nitrificación parcial en un reactor SBR (PN-SBR, *Partial Nitrification-SBR*), trataron lixiviados de vertedero para obtener un efluente con una relación molar nitrito:amonio de 1.32. Estos investigadores obtuvieron una conversión entre un 40 y 60 % del amonio presente en el afluente ($1.5 \text{ kg N-NH}_4^+ \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$), trabajando a 36°C, con una concentración de oxígeno disuelto de $2 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ y con un TRH de 1.5 días. La conversión parcial del amonio necesaria para ser tratada por el proceso anammox se conseguía mediante el control de la alcalinidad disponible y el valor de pH en el interior del reactor.

Por otro lado, el sistema anammox también participa en el proceso *DEAMOX* (*DE*nitrifying *AM*monium *OX*idation) (Kalyuzhnyi *et al.*, 2006). En una primera etapa se produce una mineralización anaeróbica del nitrógeno orgánico. A continuación, en un reactor nitrificante, el amonio es oxidado a nitrato. En la etapa final se produce nitrito a partir del nitrato utilizando el sulfuro como donador de electrones. Posteriormente, este nitrito y el amonio recirculado de la primera etapa son eliminados por la biomasa anammox mediante un sistema anaerobio de biomasa fijada que trata un afluente sintético.

Como se ha comentado anteriormente, el menor consumo de oxígeno durante el proceso de nitrificación parcial y la no necesidad de adicionar materia orgánica para desnitrificar (proceso anammox) representan un ahorro económico importante respecto al tratamiento tradicional de nitrificación-desnitrificación (Fux and Siegrist, 2004). Así, en la Figura 1.9 se observa como la combinación del proceso de nitrificación parcial y anammox permite ahorrar un 40% de oxígeno disuelto y un 100% de materia orgánica (Fux *et al.*, 2002). Además, la cantidad de biomasa generada es mucho menor, disminuyendo así los costes asociados al tratamiento de fangos.

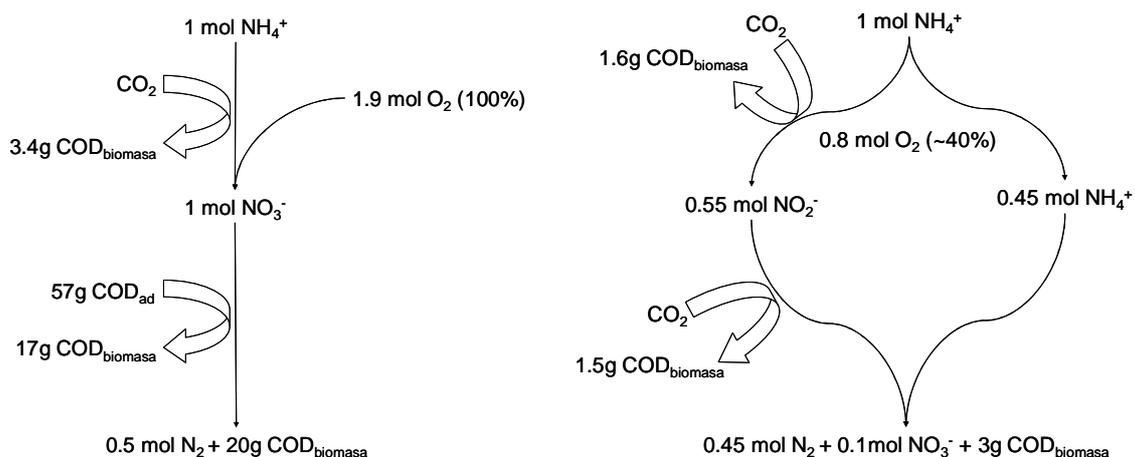


Figura 1.9 Comparativa del consumo de oxígeno y de materia orgánica, así como de la cantidad de biomasa generada entre el proceso convencional de nitrificación-desnitrificación (izquierda) y el proceso combinado de nitrificación parcial y anammox (derecha). (Adaptado de Fux *et al.*, 2002).

Así, Van Dongen *et al.* (2001) estimaron un coste económico de entre $0.7\text{-}1.1 \text{ €}\cdot\text{kg}^{-1} \text{N}_{\text{eliminado}}$ aplicando el sistema combinado de nitrificación parcial y anammox. En cambio, mediante el proceso de nitrificación-desnitrificación convencional se producía un gasto económico entre $2.3\text{-}4.5 \text{ €}\cdot\text{kg}^{-1} \text{N}_{\text{eliminado}}$.

Sin embargo, uno de los inconvenientes del proceso combinado de nitrificación parcial y anammox es mantener la temperatura por encima de 30°C , ya que implica elevados costes energéticos y económicos. Para disminuir estos costes asociados, el proceso de nitrificación

parcial se aplica, principalmente, en el tratamiento de efluentes de digestores anaerobios, los cuáles operan a elevadas temperaturas (30-40°C) (Hellings *et al.*, 1998; Van Dongen *et al.*, 2001).

1.8 La tecnología SBR aplicada al proceso anammox

El Reactor Discontinuo Secuencial (RDS) o *Sequencing Batch Reactor* (SBR), es un sistema de tratamiento de fangos activados que opera de manera discontinua a través de un procedimiento de llenado y vaciado en el cuál se mezcla el agua residual con la biomasa en suspensión. Esta tecnología utiliza un único reactor en el cuál se repite continuamente un ciclo o secuencia con diferentes operaciones (llenado, reacción, purga, sedimentación y vaciado) en una escala temporal determinada, tal y cómo se observa en la Figura 1.10.

La etapa de llenado se puede realizar de manera estática o dinámica (en agitación) y puede ser simple o múltiple, dependiendo de los objetivos del proceso de depuración (Puig, 2008). Durante la etapa de reacción, normalmente en agitación, la biomasa degrada los compuestos contaminantes controlando las condiciones de operación en función de la finalidad del tratamiento. La etapa de purga es muy importante en la operación de un SBR ya que regula la concentración de microorganismos en el interior del reactor. Durante la sedimentación, los microorganismos se separan del agua depurada que se evacua en la etapa de vaciado.

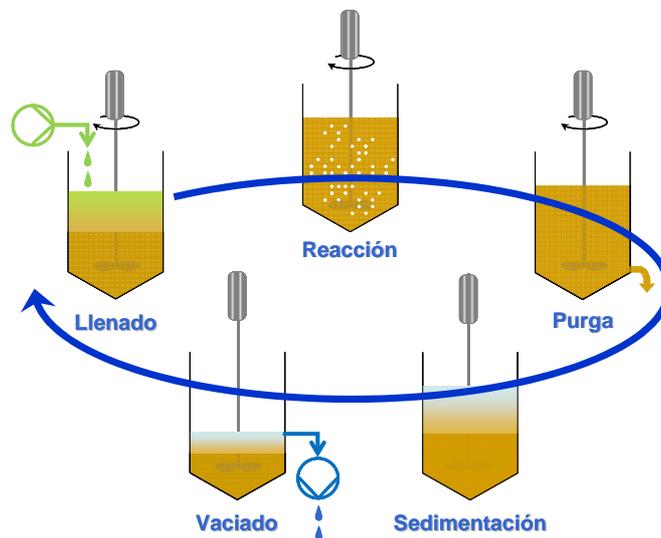


Figura 1.10 Etapas de un ciclo de operación típico en un reactor SBR.

La tecnología SBR apareció antes que los tratamientos convencionales de fangos activos en continuo con la finalidad de eliminar únicamente la materia orgánica del agua residual. Durante la segunda década del siglo XX aparecieron los primeros SBR (Arden and Lockett, 1914), pero dificultades a nivel operativo provocaron el estancamiento de esta tecnología. Sin embargo, a

partir de los años setenta, Irvine and Busch (1979) iniciaron la investigación de estos sistemas desarrollando nuevos conocimientos, unificando una única terminología e implementando modernas estrategias de control. En este sentido, la automatización de las operaciones ha conseguido que la implementación y el desarrollo de la tecnología SBR sean mucho más sencillos. Las primeras aplicaciones de los sistemas SBR se realizaron en depuradoras de aguas residuales urbanas, principalmente, en Estados Unidos y Canadá. Irvine *et al.* (1983) manifestaron que la tecnología SBR era una alternativa viable a los procesos convencionales de fangos activados en continuo para el tratamiento de materia orgánica, de nitrógeno y de fósforo en aguas residuales domésticas.

La principal ventaja que presenta la tecnología SBR, respecto a los sistemas convencionales, es que todas las operaciones (llenado, reacción, purga, sedimentación y vaciado) tienen lugar en un mismo reactor, reduciendo la inversión económica en decantadores y otros equipos. Sin embargo, los costes económicos asociados al mantenimiento, la instrumentación y el control del proceso son más elevados que los procesos convencionales de fangos activos (Puig, 2008).

Centrándonos en la aplicación de la tecnología SBR en el proceso anammox, Strous *et al.* (1998) indicaron que es una tecnología apropiada para realizar el enriquecimiento de las bacterias anammox debido a su simplicidad, a la homogeneidad y distribución de la mezcla de reacción (sustratos, productos y agregados), a que posee un eficaz sistema de retención de biomasa y a la estabilidad y fiabilidad del proceso durante largos períodos de operación. A parte de Strous *et al.*, la tecnología SBR ha sido escogida por diversos investigadores (Jetten *et al.*, 1999; Van Dongen *et al.*, 2001; Fux *et al.*, 2002, 2003; Dapena-Mora *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c; entre otros) para operar con el proceso anammox.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El elevado contenido de nitrógeno amoniacal en los lixiviados de vertedero, así como la baja disponibilidad de materia orgánica biodegradable en este tipo de efluente no son condiciones adecuadas para la aplicación del sistema convencional de nitrificación-desnitrificación. Con el objetivo de reducir el coste económico y el impacto ambiental, así como solventar los actuales problemas del tratamiento de lixiviados, se han de desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de este tipo de aguas residuales. Así, el proceso **anammox** (*anaerobic ammonium oxidation*) introduce una nueva forma de eliminar el nitrógeno de las aguas residuales, basada en la oxidación biológica del amonio a nitrógeno gas en condiciones anaerobias utilizando el nitrito como aceptor de electrones. En este sentido, el objetivo principal de esta tesis doctoral es **el estudio de la operación y aplicación del proceso anammox para la eliminación del nitrógeno amoniacal de los lixiviados de vertederos.**

Para la consecución del objetivo principal de esta tesis, es importante destacar la dificultad de disponer de un fango enriquecido con biomasa anammox. Por esta razón, los objetivos específicos se han centrado en dos grandes aspectos:

1. Puesta en marcha de un reactor SBR enriquecido con biomasa anammox para el tratamiento de altas cargas nitrogenadas.
2. Aplicación del proceso anammox al tratamiento de lixiviados de vertedero.

Para la puesta en marcha de un reactor anammox, se ha partido de los resultados previos obtenidos por el grupo de investigación de Ecología Microbiana Molecular de la Universidad de Girona, que han permitido, mediante técnicas moleculares, la detección, la identificación y la cuantificación de la biomasa anammox en inóculos de diferentes orígenes. Partiendo de este punto, esta tesis pretende:

- Identificar las condiciones de operación de un reactor SBR para el enriquecimiento de la biomasa anammox. En concreto, se considera clave el poder:
 - Seleccionar de forma adecuada el inóculo para una puesta en marcha satisfactoria.
 - Identificar y definir las condiciones de operación del reactor SBR: el ciclo de operación, el mantenimiento de las condiciones anaerobias, la composición del alimento, la estrategia de alimentación para el correcto enriquecimiento de la

biomasa y el seguimiento de la evolución del proceso, mediante técnicas de análisis químico y de detección molecular.

- Verificar la presencia de la actividad anammox a partir del estudio estequiométrico de los diferentes compuestos (reactivos y productos) que intervienen en el proceso. En concreto, se pretende confirmar la actividad anammox mediante la comparación de las relaciones estequiométricas de:
 - Nitrito consumido frente a amonio consumido
 - Nitrato producido frente a amonio consumido
 - Consumo de alcalinidad frente al consumo de amonio

Una vez conseguido el enriquecimiento de la biomasa anammox, esta tesis pretende además, aplicar esta tecnología al tratamiento de lixiviados de vertedero. Así, los objetivos que se plantean en este punto son:

- Poner en marcha un reactor anammox para el tratamiento de lixiviados de vertedero, estableciendo las condiciones de operación y la estrategia de seguimiento del proceso a partir de los resultados obtenidos en el punto anterior.
- Evaluar la estequiometría de la reacción anammox e identificar los posibles efectos de la presencia de materia orgánica biodegradable en la actividad de la biomasa anammox.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Instalación experimental

3.1.1 Planta Piloto 20L

La planta piloto SBR (*Sequencing Batch Reactor*) o reactor secuencial por cargas que se utilizó para la puesta en marcha y el enriquecimiento de las bacterias anammox estaba ubicada en el Laboratorio de Ingeniería Química y Ambiental (LEQUIA) de la Universidad de Girona (UdG). El reactor, de acero inoxidable (A-316) y de forma cilíndrica (51 cm de altura y 21.5 cm de diámetro interno), tenía un volumen máximo de trabajo de 20L y se mantuvo completamente cerrado y sellado para evitar la entrada de aire (Figura 3.1). Este reactor disponía de cinco salidas laterales por una de las cuales se realizaba el vaciado del efluente mediante una bomba peristáltica (*Watson Marlow*[®] 505S) y la recogida de las muestras necesarias para el seguimiento del proceso.

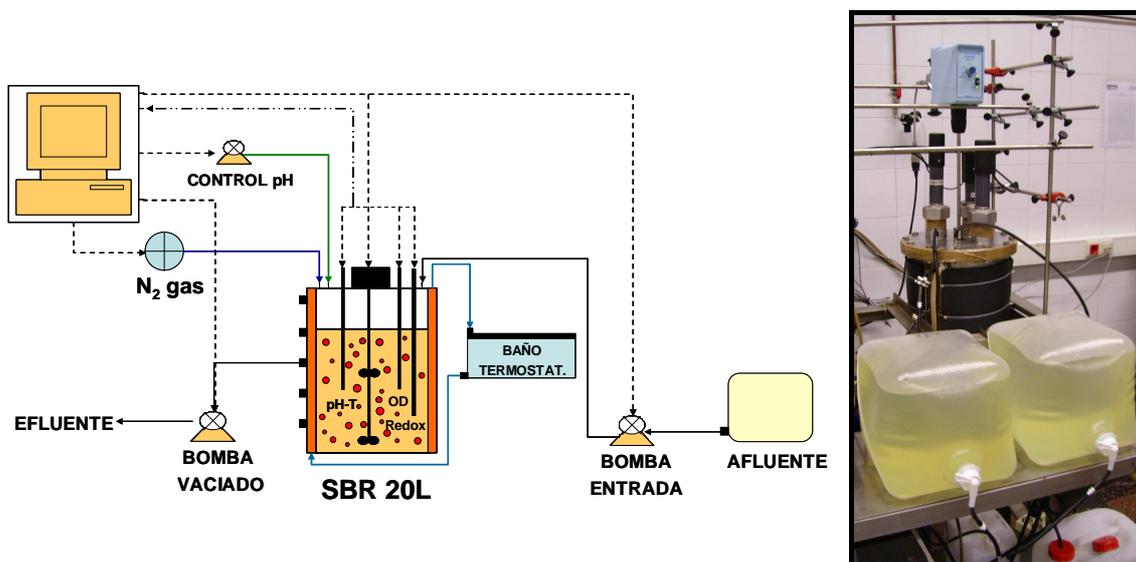


Figura 3.1 Esquema planta piloto (izquierda). Fotografía reactor SBR 20L (derecha).

Tal y como se muestra en el esquema general de la Figura 3.1, el alimento se introducía por la parte superior del reactor mediante una bomba peristáltica (*Watson Marlow*[®] 302S). El sistema de agitación consistía en un agitador mecánico de doble hélice marina con tres palas cada una que mantenían el reactor homogeneizado. La velocidad de agitación (100-150 rpm) era lo suficientemente lenta para mantener la biomasa en suspensión sin provocar una agitación excesiva para evitar el estrés físico y/o la entrada de aire en el interior del reactor. La

temperatura se controlaba a $36.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ mediante un baño termostatzado que recirculaba agua caliente a través de la camisa del reactor. Por otro lado, a través de un control automático, el pH se mantenía entre 7.5-8.2 unidades mediante la adición de ácido clorhídrico 1M. Además, a través de la línea de nitrógeno que disponía el laboratorio, se inyectaba nitrógeno gas (N_2) para desplazar el aire que podría haber entrado en el reactor durante la etapa de vaciado del sistema.

La planta piloto SBR estaba equipada con una serie de sondas (*Endress-Hauser*[®]) que permitían la monitorización *online* del pH (*CPF-81*), la temperatura (*CPF-81*), el oxígeno disuelto (*OXIMAX-W COS 41*) y el potencial redox (*CPF-82*). El sistema de monitorización y control constaba de los correspondientes transmisores (*CPM-223*; *Endress-Hauser*[®]), las diferentes placas de adquisición de datos *Advantech* (*PCI-1711*, *PCLD-8710* y *PCLD-885*) y el ordenador. En la Figura 3.2 se presenta una vista general del panel de control y el interior de éste con los diferenciales, los transmisores y las placas de adquisición de datos y de relés.

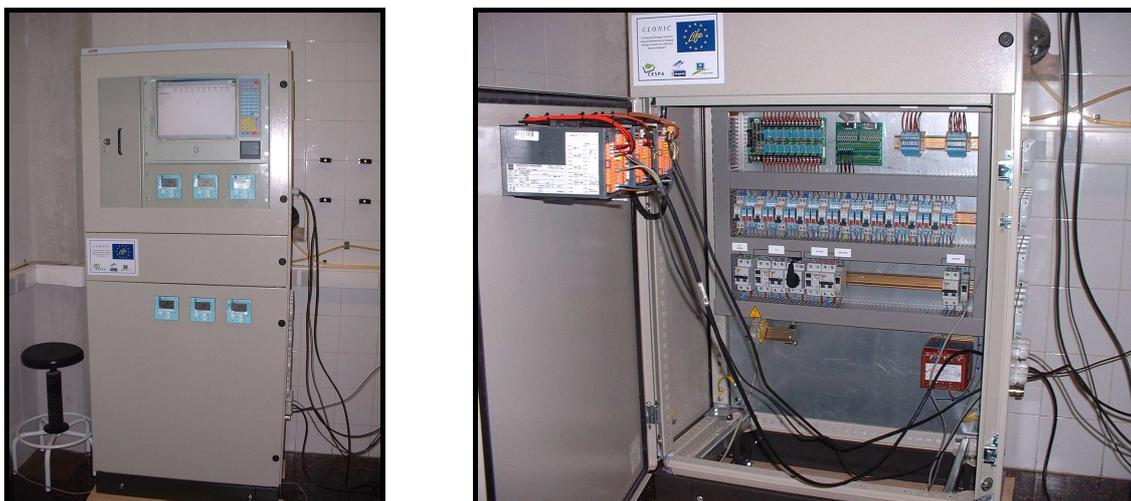


Figura 3.2 Fotografía general del panel de control (izquierda) y del interior del cuadro de control (derecha).

A partir de las sondas se obtenía una señal analógica que era amplificada por los transmisores y transformada por la placa correspondiente en formato digital. Concretamente, la placa de adquisición de datos *Advantech PCI-1711* adquiría los datos procedentes de las sondas (señales analógicas 4-20 mA) a través de la placa terminal de entradas (E) y salidas (S) *Advantech PCLD-8710*. Estos datos se guardaban automáticamente y podían ser tratados para estudiar la evolución del proceso anammox. En este sentido, se implementó un programa para la monitorización de las variables, el almacenamiento de los datos y el control del proceso SBR. Este programa, desarrollado mediante el programa informático *LabVIEW*[®], permitía diseñar un plan de trabajo para la automatización de la planta piloto y monitorizar los datos obtenidos *online*, así como realizar el control del pH y de la temperatura, supervisando en todo momento el proceso anammox. Además, la monitorización de los parámetros operacionales (pH,

temperatura, oxígeno disuelto y redox), permitía consultar los datos *online* relacionados con el proceso. Por otro lado, a través de la placa de relés *Advantech PCLD-885* se activaban las bombas y válvulas instaladas en la planta piloto. En la Figura 3.3 se presentan las principales pantallas del programa SBR utilizado para la monitorización y el control del proceso.

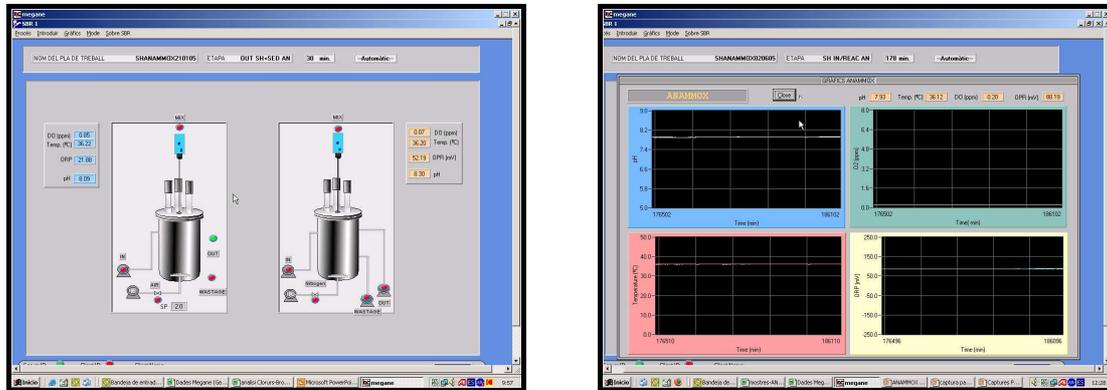


Figura 3.3 Pantalla principal del programa SBR (izquierda). Pantalla del seguimiento de los parámetros operacionales del proceso anammox (derecha).

Además, el programa SBR permitía al usuario de la planta piloto intervenir manualmente sobre el proceso, modificando el estado de las bombas y/o las válvulas de los sistemas de bombeo y aireación y recuperar el proceso después de una parada accidental.

3.1.1.1 Procedimiento experimental

La puesta en marcha y el enriquecimiento de las bacterias anammox se realizó en tres períodos experimentales:

1. Arranque del proceso anammox.
2. Enriquecimiento del proceso anammox con baja carga de nitrógeno.
3. Enriquecimiento del proceso anammox con alta carga de nitrógeno.

Estos tres períodos se caracterizaron, principalmente, por la relación molar nitrito:amonio en el afluente ($0.76, 1.00$ y 1.32 moles $\text{N-NO}_2^- \cdot \text{mol}^{-1} \text{N-NH}_4^+$, respectivamente) y por el incremento gradual de la carga de nitrógeno aplicada (0.01 - 1.60 $\text{kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$).

El volumen mínimo de trabajo utilizado fue de 13L, mientras que el volumen máximo de trabajo, al final de la etapa de alimentación, osciló entre 14.3 (arranque del proceso anammox) y 15.8L (enriquecimiento con alta carga de nitrógeno). Durante el período de arranque del proceso se alimentaron 1.3L por ciclo. Esto significa que se trabajó con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 3.6 días. Posteriormente, durante el segundo período se alimentaron entre

2.1 y 2.8 L por ciclo, operando con un TRH entre 2.4 y 1.9 días, respectivamente. Por último, en el tercer período se alimentaron 2.8L de afluente sintético por ciclo lo que significó que se continuó operando con un TRH de 1.9 días hasta la finalización del estudio.

El reactor operaba con ciclos de 8 horas y cada ciclo constaba de cinco etapas que se repetían sucesivamente (Figura 3.4):

1. Inyección de nitrógeno gas (4 minutos)
2. Alimentación continua y reacción con agitación lenta (356 minutos)
3. Reacción con agitación lenta (80 minutos)
4. Sedimentación (20 minutos)
5. Vaciado (20 minutos)

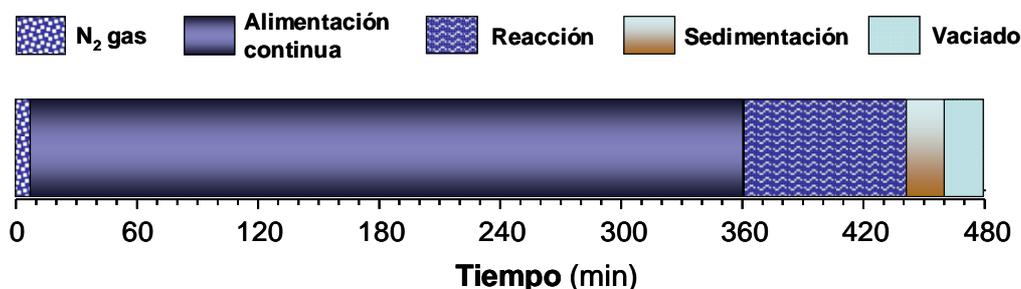


Figura 3.4 Configuración del ciclo de trabajo utilizado para operar el proceso anammox.

Durante los primeros 4 minutos de cada ciclo se inyectaba nitrógeno gas a través de la cúpula del reactor para desplazar el posible aire que podía entrar durante la etapa del vaciado. Posteriormente, el reactor se alimentaba continuamente con medio sintético durante 356 minutos. Al mismo tiempo que se alimentaba el reactor, la biomasa se mantenía en suspensión mediante un sistema de agitación lento que permitía la homogeneización de la mezcla de reacción. En esta etapa se añadía al reactor HCl 1M para mantener el pH entre 7.5-8.2.

A continuación, la etapa de reacción (80 minutos) se utilizaba para eliminar completamente el amonio y nitrito introducido en la fase de alimentación continua. Finalmente, la biomasa se dejaba sedimentar durante 20 minutos y en los últimos 20 minutos del ciclo el efluente se evacuaba del interior del reactor mediante una bomba peristáltica.

3.1.1.2 Inóculo

El inóculo escogido para llevar a cabo el enriquecimiento de las bacterias anammox consistió en una mezcla de lodos activos procedentes de la estación depuradora de aguas

residuales (EDAR) de *Sils-Vidreres* (Girona), de una planta de tratamiento de lixiviados de vertedero (*Orís*, Barcelona) y de *Ecoparc*, una planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos situada en Barcelona. Estas dos últimas plantas trataban elevadas cargas de nitrógeno bajo condiciones aeróbicas/anóxicas y trabajaban a elevadas temperaturas (30-40°C).

3.1.1.3 Afluente: Medio Sintético

El enriquecimiento de bacterias anammox en la planta piloto de 20L se realizó alimentando un afluente sintético. Los compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) fueron adicionados al medio sintético en forma de las sales correspondientes: NH_4Cl , NaNO_2 y NaNO_3 . Las concentraciones de estos compuestos dependían de la evolución del proceso anammox durante su puesta en marcha. En la Tabla 3.1 se presentan las cantidades de los compuestos de nitrógeno, así como la fuente de alcalinidad, fósforo y micronutrientes utilizados para preparar el medio sintético.

Tabla 3.1 Composición del afluente sintético.

Compuestos de N	Período 1	Período 2	Período 3	Compuesto	Cantidad	Unidades
Tiempo (días)	0-78	79-225	226-365	NaHCO_3	1.05	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
NH_4Cl ($\text{g NH}_4\text{Cl}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.057-0.094	0.084-0.955	0.955-4.972	KH_2PO_4	0.00625	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
NaNO_2 ($\text{g NaNO}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	0.047-0.103	0.109-1.297	1.297-8.717	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
NaNO_3 ($\text{g NaNO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	0.193-1.218	0.171-0.211	0-0.164	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
				EDTA·2H ₂ O	0.0125	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
				HCl	1.25	$\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$
				Elementos traza*	1.25	$\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$

*Van de Graaf *et al.* (1996)

El medio sintético se preparaba en bolsas colapsables (*Collapsible Containers; Cole Parmer, Ref. CZ-06100-40*) para evitar la transferencia de aire desde el exterior. Una vez preparado, se inyectaba nitrógeno gas y se cerraba herméticamente. Por otro lado, todos los reactivos utilizados, tanto para la preparación del medio sintético (*PRS, Purísimo*) como para realizar la determinación analítica (*PA, Para Análisis*) se suministraron por la casa comercial *Panreac Química S.A.*

3.1.2 Fermentador 2L

Para el estudio del tratamiento de lixiviados de vertedero mediante el proceso anammox se utilizó un fermentador de vidrio encamisado, cilíndrico y con una capacidad máxima de 2L (*BIOSTAT B PLUS-SARTORIUS AG*). El fermentador estaba herméticamente cerrado lo que

permitía mantener las condiciones anaeróbicas en su interior. Además, se evitaba la entrada de luz mediante su completo aislamiento. En la Figura 3.5 se muestra una fotografía del fermentador y la unidad de control.



Figura 3.5 Fotografía fermentador SBR 2L utilizado para el tratamiento de lixiviados.

El lixiviado, tratado previamente por el proceso de nitrificación parcial (Ganigué *et al.*, 2007), se alimentaba mediante una bomba peristáltica por la parte superior del reactor. El sistema de agitación consistía en una doble hélice marina de tres palas cada una que mantenían la biomasa en suspensión mediante una velocidad de agitación de 50-70 rpm. La temperatura, controlada mediante la recirculación de agua caliente a través de la camisa del fermentador, se mantuvo a $36.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ durante todo el estudio.

El pH del fermentador se controlaba a 7.50 ± 0.05 mediante un controlador PID (Proporcional-Integral-Derivativo) con la adición de ácido clorhídrico 1M a través de una bomba peristáltica. Además, se inyectaba nitrógeno gas a través de la cúpula del reactor para desplazar el aire que podía entrar en el fermentador durante la etapa de vaciado.

El fermentador estaba equipado con las sondas de pH, temperatura, oxígeno disuelto y redox que permitían monitorizar y controlar *online* el proceso anammox a través de los datos enviados a la unidad de control. Estos datos se almacenaban en el ordenador a través del sistema supervisor MFCS/DA (*MultiFermenter Control System/Data Acquisition*) para su posterior evaluación y tratamiento.

3.1.2.1 Procedimiento experimental

Igual que en la planta piloto de 20L, el fermentador 2L operaba con una configuración SBR. El ciclo de trabajo empleado era el mismo que el utilizado para realizar la puesta en marcha y el enriquecimiento de las bacterias anammox (Figura 3.4). El tratamiento de lixiviados a través del proceso anammox se llevó a cabo en dos períodos:

1. Estabilización del proceso anammox con medio sintético (Período 1).
2. Aplicación de lixiviados al proceso anammox (Período 2).

Por un lado, durante el primer período, la biomasa anammox se adaptó a las nuevas condiciones, incrementándose gradualmente la carga de nitrógeno aplicada. Por otro lado, la aplicación de lixiviados (Período 2) se realizó, también, de forma progresiva a medida que el amonio y nitrito eran eliminados. Los volúmenes máximo y mínimo de trabajo en el fermentador anammox fueron de 1.95 y 1.6L, respectivamente. En este sentido, se alimentaban 0.35L por ciclo, operando con un TRH de 1.9 días, aproximadamente. En cada ciclo del SBR, el volumen de intercambio era del 18%.

3.1.2.2 Inóculo

El fermentador se inoculó con 0.5L de biomasa anammox enriquecida en la planta piloto de 20L, siendo la concentración de sólidos en suspensión volátiles inicial de $0.6 \text{ g SSV}\cdot\text{L}^{-1}$. Las bacterias anammox pertenecían a la especie *Candidatus Brocadia anammoxidans*.

3.1.2.3 Afluente: Medio Sintético y Lixiviado tratado

El afluente sintético utilizado para adaptar la biomasa anammox (Período 1) se preparaba del mismo modo que el utilizado para enriquecer las bacterias anammox (Tabla 3.1). Sin embargo, las concentraciones de los compuestos nitrogenados fueron inferiores a las tratadas en el reactor de 20L. Las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato se detallan en el Capítulo 5 (*Aplicación del proceso anammox para el tratamiento de lixiviados*).

Por otro lado, para preparar el lixiviado se diluía el lixiviado tratado previamente por el proceso de nitrificación parcial. Una vez realizada la dilución correspondiente, se ajustaba la relación molar nitrito:amonio de esta solución para obtener 1.32 moles de N-NO_2^- por mol de N-NH_4^+ , aproximadamente. Este lixiviado pretratado, diluido y ajustado contenía materia orgánica ($\text{DQO}=125\text{-}1062 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), principalmente no biodegradable ($\text{DBO}_5=10\text{-}90 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$).

3.2 Métodos analíticos

La metodología analítica utilizada durante todo el estudio experimental seguía los protocolos del *Standard Methods* (APHA, 2005). En la Tabla 3.2 se presenta un cuadro resumen con la relación de los métodos analíticos utilizados.

Tabla 3.2 Relación de los métodos analíticos utilizados.

Compuesto	Método (APHA, 2005)	Técnica utilizada
Amonio	4500-NH ₃ .B-C	Destilación + Titración con H ₂ SO ₄
Nitrito y Nitrato	4110B	Cromatografía iónica
TKN	4500-Norg.B	Destilación + Titración con H ₂ SO ₄
DQO	5220B	Reflujo + Titración con SAF
DBO	-	Método Manométrico
Cl, COT y CT	S310	Combustión + Determinación IR
SST	2540D	Filtración + Secado a 103°C
SSV	2540E	Filtración + Secado a 550°C
IVF	2710D	Sedimentación
AEA *	-	Determinación N ₂ gas generado

* Actividad Específica Anammox

La carga de nitrógeno aplicada o *Nitrogen Loading Rate* (NLR, kg N·m⁻³·d⁻¹) se calculaba como la suma diaria de la concentración de amonio y nitrito en el afluente por el volumen máximo del reactor (m³). La carga de nitrógeno en el efluente (kg N·m⁻³·d⁻¹) se determinaba a partir de la suma de la concentración de amonio y nitrito en el efluente por el volumen máximo de reactor (m³) y por día.

A continuación se detallan las técnicas analíticas utilizadas para realizar la determinación de los compuestos necesarios para el seguimiento del proceso anammox.

3.2.1 Determinación de Sólidos en Suspensión Totales (SST)

Mediante un filtro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro y 1.0 µm de diámetro de poro, previamente pesado (P_{tara}), se filtraba al vacío un volumen de muestra conocido (mL). La muestra sólida filtrada se dejaba secar en una estufa a 103°C durante 24 horas. Finalmente, la muestra se dejaba enfriar en el desecador y se determinaba el peso. Los SST se determinaban

por diferencia entre este peso y la tara, teniendo en cuenta el volumen de muestra filtrado (Ecuación 3.1):

$$SST = \frac{(P_{estufa} - P_{tara}) * 10^6}{V} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde SST viene dado en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, el peso en g y el volumen en mL.

3.2.2 Determinación de Sólidos en Suspensión Volátiles (SSV)

Una vez determinados los SST, se realizaba la determinación de los SSV. Después de secar la muestra en la estufa, se introducía en la mufla a una temperatura de 550°C durante 1 hora. A continuación se dejaba enfriar, primero en la estufa y después en el desecador. Finalmente, la muestra se pesaba y se calculaban los SSV por la diferencia entre el peso obtenido después de secar la muestra en la estufa y después de secarla en la mufla, teniendo en cuenta el volumen de muestra filtrado inicialmente (Ecuación 3.2):

$$SSV = \frac{(P_{estufa} - P_{mufla}) * 10^6}{V} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

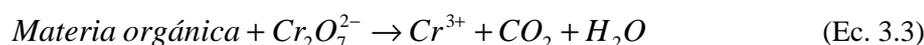
donde SSV viene dado en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, el peso en g y el volumen en mL.

3.2.3 Determinación de compuestos de carbono

La concentración de la materia orgánica se calculaba mediante la Demanda Química de Oxígeno (DQO), la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO_5 y DBO_{30}) y el Carbono Orgánico Total (COT). Además, se determinaba el carbono inorgánico (CI) y el carbono total (CT).

3.2.3.1 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La DQO se determinaba mediante una modificación del método del dicromato y por reflujo abierto, donde se medía la cantidad de materia orgánica en la muestra que era susceptible de ser oxidada por un oxidante fuerte, en este caso el dicromato (Ecuación 3.3).



-Procedimiento experimental:

En un tubo de DQO se añadían, en este orden, 10 mL de muestra (o agua destilada, en caso del blanco), 5 mL de la solución de $K_2Cr_2O_7$ 0.04M y 15 mL de la solución de Ag_2SO_4 con H_2SO_4 . A continuación se colocaba el condensador en la parte superior del tubo y se dejaba reaccionar en el digestor durante 2 horas a $130^\circ C$. Una vez digerida la muestra, se dejaba enfriar y se añadían 40 mL de agua destilada a través del condensador para arrastrar la fracción de materia orgánica contenida en las paredes del tubo. Seguidamente, esta solución se dejaba enfriar y se valoraba con el SAF (Sulfato Amonio Ferroso o *Sal de Mohr*), previamente estandarizado, utilizando como indicador la ferroina. La DQO se calculaba mediante la Ecuación 3.4:

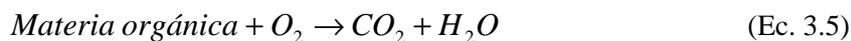
$$DQO_{muestra} = \frac{N_{SAF} * (V_{blanco} - V_{val.muestra}) * 8000}{V_{muestra}} \quad (Ec. 3.4)$$

donde la DQO se expresó en $mg\ O_2 \cdot L^{-1}$, N_{SAF} =Normalidad del SAF, V_{blanco} =Volumen de SAF consumido durante la valoración del blanco (mL), $V_{val.muestra}$ =Volumen de SAF consumido durante la valoración de la muestra (mL) y $V_{muestra}$ =Volumen de muestra (mL) teniendo en cuenta la dilución realizada.

3.2.3.2 Determinación de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO)

El método utilizado para la determinación de la DBO_5 y DBO_{30} era manométrico y se realizaba mediante el sistema *OXITOP*. Con esta técnica se medía la cantidad de oxígeno requerido para la degradación biológica de la materia orgánica en un período de tiempo determinado. Debido a que los compuestos reducidos de nitrógeno podían interferir en la determinación de la DBO se añadía *alil tiourea* a la muestra inicial.

El sistema *OXITOP* para determinar la DBO_n se basaba en la medida de la diferencia de presión que se producía al consumirse el O_2 y absorberse el CO_2 que se formaba en la oxidación de la materia orgánica según las siguientes reacciones (Ecuaciones 3.5 y 3.6):



En función del valor de DBO esperado, se necesitaba un volumen de muestra u otro. Para valores de DBO elevados se tomaba un volumen de muestra menor que para valores de DBO inferiores. En este sentido, la cantidad de *alil tiourea* adicionada también dependía del valor de DBO esperado.

El cálculo de la DBO en $\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ se realizaba a partir de la Ecuación 3.7:

$$DBO = \frac{M_{O_2}}{R \cdot T_m} * \left(\frac{V_{tot} - V_{muestra}}{V_{muestra}} + \alpha \frac{T_m}{T_o} \right) * \Delta P(O_2) \quad (\text{Ec. 3.7})$$

donde M_{O_2} =Peso molecular del oxígeno ($32 \cdot 10^3 \text{ mg}\cdot\text{mol}^{-1}$), R =constante de los gases ideales ($83.144 \text{ L}\cdot\text{hPa}\cdot(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$), $T_o=273.15^\circ\text{K}$, T_m =Temperatura de análisis (293.15°K), V_{tot} =Volumen total en la botella de análisis (mL), $V_{muestra}$ =Volumen de muestra (mL), α =coeficiente de absorción de Bunsen (0.03103) y $\Delta P(O_2)$ =Diferencia en la presión parcial del oxígeno.

3.2.3.3 Determinación del Carbono Orgánico Total (COT), del Carbono Inorgánico (CI) y del Carbono Total (CT)

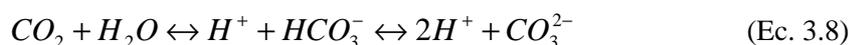
La determinación analítica del COT, del CI y del CT se realizaba mediante el método de combustión infrarrojo con un analizador de carbono orgánico total *Shimadzu TOC-VC SH*.

La muestra se inyectaba en una cámara de reacción caliente rellena con un catalizador oxidante (óxido de cobalto). En primer lugar, se medía el carbono total mediante vaporización de la muestra y oxidación del carbono orgánico e inorgánico a CO_2 y H_2O . Después, el CO_2 obtenido de esta oxidación, tanto del carbono orgánico como inorgánico, se transportaba mediante corrientes transportadoras de gas y se medía mediante un analizador infrarrojo no dispersivo.

Posteriormente, el carbono inorgánico se analizaba, separadamente, inyectando una muestra en una cámara de reacción rellena de cuarzo y cubierta con ácido fosfórico. En estas condiciones únicamente se oxidaba el carbono inorgánico, mientras que el carbono orgánico permanecía inalterado. El CO_2 de la oxidación del carbono inorgánico también se medía por infrarrojos. Finalmente, una vez determinado el CT y el CI, por diferencia entre ambos se determinaba el COT. Las unidades utilizadas en estas determinaciones fueron $\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.2.4 Determinación de la alcalinidad

La alcalinidad se determinaba por valoración de la muestra con una solución estandarizada de un ácido fuerte (HCl 0.1 N) mediante dos puntos de equivalencia (pH=8.2 y 4.3), indicados por el cambio de color de los dos indicadores ácido-base utilizados (fenoftaleina y naranja de metilo, respectivamente). Para realizar la determinación de la alcalinidad se utilizaba un valorador automático *Titrimo 719S Metrohm*. La alcalinidad determinada se debía a la presencia de los aniones carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-) y se expresaba en $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. En la Ecuación 3.8 se presentan los equilibrios entre las diferentes especies carbonatadas.



-Procedimiento experimental:

En un vaso de precipitados de 250 mL se adicionaba un volumen de muestra conocido (entre 5 y 50 mL) y agua destilada hasta llegar a 100 mL. Esta solución se valoraba con una solución de HCl 0.1N. El blanco se preparaba con 100 mL de agua destilada. La alcalinidad total ($\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) se calculaba según la Ecuación 3.9:

$$\text{ALK} = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_{\text{blanco}}) * 1000 * 50}{V_{\text{muestra}}} * N_{\text{HCl}} \quad (\text{Ec. 3.9})$$

donde, ALK= Alcalinidad total en $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, N_{HCl} =Normalidad del HCl, V_{HCl} =Volumen de HCl consumido durante la valoración de la muestra (mL), V_{blanco} =Volumen de HCl consumido durante la valoración del blanco (mL) y V_{muestra} =Volumen de muestra analizado (mL) teniendo en cuenta la dilución realizada.

3.2.5 Determinación de la concentración de amonio (N-NH_4^+)

La concentración de nitrógeno en forma de amonio se determinaba mediante una destilación del amonio (*Destilador BÜCHI B-324*) y su posterior valoración (*Titrimo 719S Metrohm*) con ácido sulfúrico. El principio básico del proceso de destilación se basaba en convertir el amonio en amoniaco libre mediante una reacción de desplazamiento. Posteriormente, por arrastre con vapor, la muestra se recogía mediante la solubilización en medio ácido (H_3BO_3). Antes de empezar la destilación era necesaria la adición de una base fuerte (NaOH) para elevar el pH por encima de 11.

-Procedimiento experimental:

En un tubo de destilación se colocaban 25 mL de muestra o agua destilada (para el blanco). El tubo se colocaba en el destilador y se procedía a efectuar la reacción de desplazamiento formando amoníaco libre. A continuación, se recuperaba el NH₃ por arrastre con vapor y se solubilizaba en medio ácido (H₃BO₃). Finalmente, la muestra recogida se valoraba automáticamente con ácido sulfúrico mediante una valoración con punto final (pH=4.65). La concentración de nitrógeno en forma de amonio (mg N-NH₄⁺·L⁻¹) se calculaba mediante la Ecuación 3.10:

$$N - NH_4^+ = \frac{(V_{H_2SO_4} - V_{blanco}) * 1000 * 14}{V_{muestra}} * N_{H_2SO_4} \quad (\text{Ec. 3.10})$$

donde N_{H₂SO₄}=Normalidad del H₂SO₄, V_{H₂SO₄}=Volumen de H₂SO₄ consumido durante la valoración de la muestra (mL), V_{blanco}=Volumen de H₂SO₄ consumido durante la valoración del blanco (mL) y V_{muestra}=Volumen de muestra analizado (mL) teniendo en cuenta la dilución realizada.

3.2.6 Determinación del Nitrógeno Kjeldahl Total (TKN)

El Nitrógeno Kjeldahl Total se determinaba a partir de una modificación del método semi-micro-Kjeldahl, donde a partir de la digestión de la muestra se transformaba todo el nitrógeno orgánico a nitrógeno amoniacal y posteriormente mediante la destilación y valoración del destilado se determinaba el nitrógeno total presente en la muestra.

-Procedimiento experimental:

En un tubo de destilación se colocaban 50 mL de muestra o agua destilada (para el blanco), 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y una pastilla del catalizador de Selenio. A continuación, se tapaba el tubo con el colector y se realizaba la digestión de la muestra en dos etapas, 45 minutos a 250°C y 45 minutos como máximo a 420°C, hasta obtener una solución transparente o de color paja.

Una vez finalizada la digestión, la solución se dejaba enfriar y se adicionaban 50 mL de agua destilada. La destilación y posterior valoración de la muestra se realizaba de la misma manera que la determinación del nitrógeno amoniacal (*Apartado 3.2.5*).

3.2.7 Determinación de la concentración de nitrito y nitrato

La determinación de la concentración de nitrito (N-NO_2^-) y nitrato (N-NO_3^-) se realizaba mediante cromatografía iónica (761 Compact IC Metrohm). Las muestras se inyectaban automáticamente a través del inyector automático 831 Compact Autosampler. La columna utilizada para la separación de los iones a determinar era de intercambio aniónico (Metrosep A Supp 5-250). Además, se utilizaba una pre-columna (Metrosep A Supp 5 Guard) para minimizar la entrada de sustancias no deseables en la columna. En la Figura 3.6 se presenta un cromatograma completo del análisis realizado mediante la técnica de cromatografía iónica.

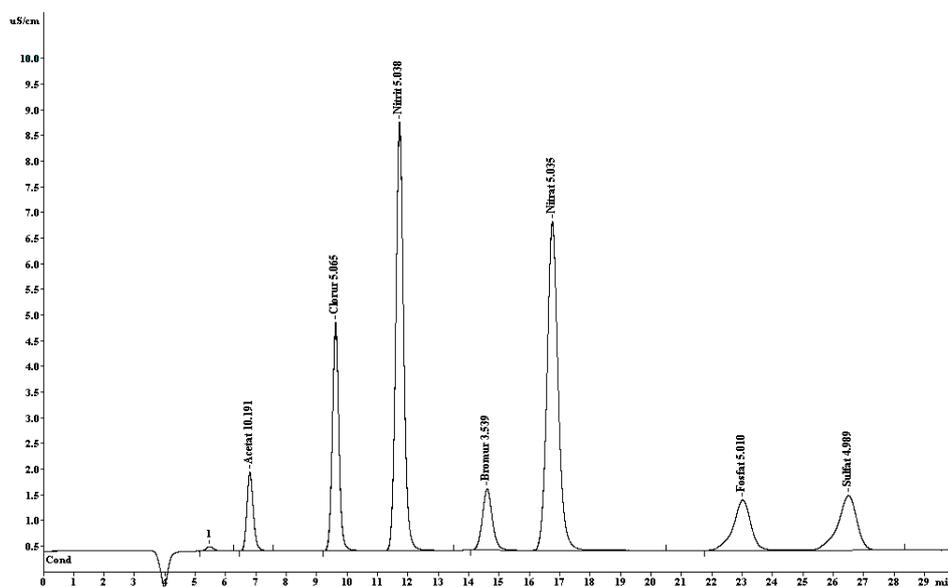


Figura 3.6 Cromatograma de una muestra patrón.

El método utilizado requería un flujo isocrático constante. La fase móvil utilizada contenía una solución tampón de carbonato:bicarbonato (H_2CO_3 1mM: HCO_3^- 3.2mM). El flujo de trabajo era de $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y la presión máxima y mínima eran de 14.6 y 0.3 MPa, respectivamente. El volumen inyectado de muestra a través del loop de inyección era de $20 \mu\text{m}$ y la conductividad de trabajo de $50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Con estas condiciones de trabajo, el tiempo de retención del anión nitrito era de 12 minutos y el del anión nitrato era de 17 minutos, aproximadamente.

-Procedimiento experimental:

En primer lugar, se dejaba circular fase móvil durante 30 minutos para estabilizar y adaptar el cromatógrafo y la columna a las condiciones de trabajo. Una vez estabilizado el equipo, se inyectaban los patrones de calibración y seguidamente las muestras a analizar. Antes de inyectar las muestras era necesario filtrarlas a través de un filtro de nylon de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. El cálculo de la concentración de nitrógeno en forma de nitrito ($\text{mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$) y de nitrato

(mg N-NO₃⁻·L⁻¹) se realizaba automáticamente a partir de la interpolación del área obtenida en la recta de calibrado.

3.2.8 Determinación de la actividad específica de las bacterias anammox

La determinación de la Actividad Específica de la biomasa Anammox (AEA) se realizaba mediante ensayos en *batch*. Estos experimentos se basaban en los ensayos desarrollados por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela (Dapena-Mora, 2007; Dapena-Mora *et al.*, 2007).

Para calcular la actividad de la biomasa anammox se utilizaba un presurímetro (*Centrepoint Electronics*) que medía el voltaje debido a la presión generada por el nitrógeno gas producido durante el proceso anammox en viales cerrados herméticamente. A partir de esta presión generada (mm Hg) se determinaba la AEA como la cantidad de nitrógeno en forma de N₂ gas producido por gramo de biomasa y por día (g N-N₂·g SSV⁻¹·d⁻¹).

-Procedimiento experimental:

En un vaso de precipitados de 250 mL se recogían aproximadamente, 100 mL de biomasa anammox. Este contenido se traspasaba a una probeta de 100 mL, se dejaba decantar y se retiraba el sobrenadante. La biomasa anammox se lavaba con una solución de tampón fosfato (0.143 g KH₂PO₄·L⁻¹ + 0.747 g K₂HPO₄·L⁻¹), es decir, se llenaba la probeta con esta solución, se dejaba decantar y se retiraba el sobrenadante. Esta acción se repetía tres veces. Posteriormente, el pH se ajustaba a 7.8 con una solución de NaOH 1M o HCl 1M y se enrasaba la probeta con la solución de tampón fosfato a 48 mL.

El contenido de la probeta se traspasaba al vial donde se realizaba el ensayo. Este vial se cerraba herméticamente con el tapón, el septum y el teflón para evitar las pérdidas de presión. A continuación, se pinchaba el septum con una aguja para eliminar el gas del interior del vial y a través de otra aguja se introducía nitrógeno gas por la cúpula para desplazar el oxígeno presente en el interior del vial.

Posteriormente, para aclimatar la biomasa anammox a las condiciones de trabajo (T=35°C y agitación lenta=150 rpm) se introducía el vial en un agitador orbital (*Bottmingen Infors AG CH-4103*) durante 30 min. Pasado este tiempo, se retiraba el vial del agitador, se pinchaba con una aguja para dejar salir el gas acumulado de su interior y se adicionaban 1 mL de una solución 0.25 M N-NH₄⁺ (3.5 g N-NH₄⁺·L⁻¹) y 1 mL de una solución 0.25 M N-NO₂⁻ (3.5 g N-NO₂⁻·L⁻¹)

para tener una concentración inicial de 70 mg N·L⁻¹ de nitrógeno en forma de amonio y nitrito, respectivamente.

Una vez adicionado el amonio y nitrito correspondiente se volvía a colocar el vial en el agitador orbital (t=0) y a partir de este momento, cada 30 minutos aproximadamente, se realizaba la medida del voltaje generado por la presión de gas. A partir de la pendiente de la recta de calibrado obtenida en la calibración del presurímetro, se convertían los valores de voltaje expresados en mV en unidades de presión (mm Hg). Los datos obtenidos se ajustaban a una recta, la pendiente de la cual era la variación de la presión de gas respecto al tiempo (mm Hg·min⁻¹). A partir de esta pendiente, se determinaba la actividad específica de la biomasa anammox como la cantidad de nitrógeno gas producido por gramo de biomasa y por día.

-Cálculos realizados:

Inicialmente, las unidades de la pendiente de la recta de calibrado (mm Hg·min⁻¹) se convertían a unidades del sistema internacional (atm·d⁻¹):

$$\alpha = \frac{mm\ Hg}{min} \times \frac{1\ atm}{760\ mm\ Hg} \times \frac{1440\ min}{1\ d} = \frac{atm}{d}$$

A continuación, se calculaban los moles de nitrógeno gas producido por unidad de tiempo (d):

$$\frac{moles\ N - N_2}{d} = \alpha \left(\frac{atm}{d} \right) \times \frac{V_G}{R \cdot T} = \alpha \left(\frac{atm}{d} \right) \times \frac{L}{\frac{atm \cdot L}{mol \cdot K} \times K}$$

donde **V_G** es el volumen de la fase gas (L) calculado por la diferencia entre el volumen total y el volumen en la fase líquida; **R** es la constante de los gases ideales (0.082 atm·L·(K·mol)⁻¹) y **T** es la temperatura (°K).

Finalmente, la actividad específica de la biomasa anammox (g N-N₂·g SSV⁻¹·d⁻¹) se calculaba aplicando el siguiente factor de conversión:

$$AEA \left(\frac{g\ N - N_2}{g\ SSV \cdot d} \right) = \frac{moles\ N - N_2}{d} \times \frac{28\ g\ N - N_2}{1\ mol\ N - N_2} \times \frac{1}{\frac{g\ SSV}{L} \times V_L (L)}$$

donde **V_L** es el volumen de la fase líquida (L) y g SSV·L⁻¹ es la concentración de sólidos en suspensión volátiles utilizada para el ensayo.

3.2.9 Técnicas moleculares: PCR y FISH

La detección de las bacterias anammox se determinaba a partir de las siguientes técnicas moleculares: *Polymerase Chain Reaction* (PCR) y *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH). La pareja de cebadores específicos para las bacterias anammox utilizada para realizar la amplificación de la PCR eran Pla46f-Amx368r y Amx368f-Amx820r (Neef *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 2000, 2003, 2005). En la Tabla 3.3 se presentan estos cebadores, indicando la secuencia a la que codifican y su especificidad (Kartal *et al.*, 2007b).

Tabla 3.3 Relación de los cebadores utilizados en este estudio.

Encebador	Secuencia (5'-3')	Especificidad	Referencia
Pla 46	GGATTAGGCATGCAAGTC	Planctomycetales	Neef <i>et al.</i> (1998)
Amx 368	CCTTTCGGGCATTGCGAA	Organismos anammox	Schmid <i>et al.</i> (2003)
Amx 820	AAAACCCCTCTACTTAGTGCC	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i> <i>Ca. Kuenenia stuttgartiensis</i>	Schmid <i>et al.</i> (2000)

El ADN (ácido desoxirribonucleico) amplificado con la pareja de cebadores Pla46f-Amx368r se secuenciaba siguiendo el método descrito por Sanger *et al.* (1977). Esta secuencia se verificaba a través del programa *Chromas* 1.45 (Connor McCarthy, Australia) y, posteriormente, se comparaba con la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mediante la herramienta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) para identificarla con las secuencias con una homología más elevada (Sánchez-Melsió *et al.*, 2008).

Los análisis realizados mediante la técnica FISH se efectuaban como describen Amann *et al.* (1995) y Daims *et al.* (1999). Para ello se utilizaban las sondas Amx820-Cy3 (específica para *Ca. Brocadia anammoxidans* y *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*) y Eub338-(I-II-III)-Cy5 que hibridaban con el rRNA de la mayor parte de las bacterias presentes en la muestra. La muestra que contenía la sonda marcada se examinaba mediante un microscopio de rastreo láser confocal (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscope*; Leica TCS 4D). El área analizada que contenía células de bacterias anammox (Cy3 para Amx820) fue cuantificada como el porcentaje del área teñida por Eub338-(I-II-III)-Cy5. Esta cuantificación de las bacterias anammox se realizaba respecto al número total de microorganismos presentes en la muestra (*Eubacteria*).

CAPÍTULO 4

PUESTA EN MARCHA DEL PROCESO ANAMMOX

4. PUESTA EN MARCHA DEL PROCESO ANAMMOX

El objetivo de este capítulo es desarrollar una metodología adecuada para poner en marcha un reactor anammox mediante la tecnología SBR, con la finalidad de enriquecer las bacterias anammox a partir de una mezcla de fangos activos procedentes de diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales.

4.1 Estudios previos: Localización de las bacterias anammox

La premisa más importante a la hora de poner en marcha un reactor anammox es escoger un inóculo que contenga microorganismos anammox, aunque sea en muy baja concentración. Con este propósito se escogieron diferentes tipos de inóculos. Éstos pueden dividirse en dos grupos: los procedentes de sistemas naturales y los procedentes de sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Entre los primeros, había sedimentos marinos de la Manga del Mar Menor (Murcia), sedimentos de un lago de agua dulce en Toplitzsee (Alpes austriacos) y sedimentos de una laguna de agua salada (Massona, *Aiguamolls* de l'Empordà). El segundo grupo lo constituían sedimentos procedentes de la zona anóxica de un Sistema de Humedales Construidos (SHC) que realizaba el tratamiento terciario de las aguas residuales procedentes de la depuradora de Empuriabrava (Girona) y fangos activos procedentes de dos estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) municipales (Sils-Vidreres y Taradell), de una planta de tratamiento de lixiviados de vertedero (Orís, Barcelona) y de un reactor que operaba mediante la tecnología SBR, ubicado en el Laboratorio de Ingeniería Química y Ambiental (LEQUIA) de la Universidad de Girona (UdG), que trataba aguas residuales municipales para eliminar materia orgánica y nitrógeno.

Estos inóculos se escogieron en base a las características del sistema o lugar de procedencia. Por un lado, de los procedentes de sistemas naturales se priorizaron zonas caracterizadas por su ambiente anóxico, con elevada salinidad y con presencia de compuestos de nitrógeno. Por otro lado, los inóculos procedentes de los sistemas de tratamiento de aguas residuales se consideraron sistemas que eliminaran nitrógeno, con alternancia de fases aerobias y anóxicas y temperaturas elevadas (entre 30 y 38°C), exceptuando los que procedían de las EDARs municipales, que trabajaban a temperatura ambiente.

Inicialmente, para cada uno de los inóculos se realizaron pruebas mediante las técnicas moleculares *Polymerase Chain Reaction* (PCR) y *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) para la detección de bacterias anammox, dando resultados negativos en todas las muestras. Sin embargo, debido a la posibilidad de que los inóculos seleccionados contuvieran bacterias anammox, se llevaron a cabo los enriquecimientos en *batch* de estos inóculos. Este trabajo se realizó con la colaboración del Grupo de Investigación de Ecología Microbiana Molecular, perteneciente al Instituto de Ecología Acuática (IEA) de la Universidad de Girona.

De esta manera, se iniciaron ocho enriquecimientos en discontinuo con biomasa procedente de los diferentes orígenes (Cáliz, 2005; Sànchez-Melsió, 2006). Estos ensayos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 500 mL, completamente cerrados, a una temperatura de 37°C y a un valor de pH entre 6.7 y 8.3, controlado mediante la adición de ácido (HCl 1M) o base (NaOH 1M) (Sànchez-Melsió *et al.*, 2008). En la Tabla 4.1 se presenta la relación de estos inóculos.

Tabla 4.1 Relación y resultados obtenidos de los inóculos escogidos (Cáliz, 2005; Sànchez-Melsió, 2006).

Procedencia	Nombre	Fecha inicio	Día* detección Balance N	Día* análisis PCR	Día* Detección FISH
Sistemas naturales	Manga del Mar	Agosto 2003	nd ⁽¹⁾	-	-
	Menor				
	Toplitzsee (Alpes)	Agosto 2003	nd ⁽¹⁾	-	-
	Massona	Diciembre 2003	450	480	nd ⁽²⁾
Sistemas de tratamientos de aguas residuales	SBR (LEQUIA-UdG)	Agosto 2003	180	180	180
	SHC	Diciembre 2003	120	120	nd ⁽²⁾
	EDAR Taradell	Diciembre 2003	nd ⁽¹⁾	-	-
	EDAR Sils-Vidrerres	Julio 2005	250	300	300
	Orís	Febrero 2005	280	330	nd ⁽²⁾

* Desde el día que se inició el *batch*; ⁽¹⁾ no detectado al cabo de un año y medio de enriquecimiento; ⁽²⁾ no detectado el mismo día que se realizó la PCR.

En esta tabla se presenta la fecha del inicio de cada enriquecimiento, los días que tardaron en observarse actividad anammox a partir de la disminución del amonio y nitrito en el medio y si resultó positiva la detección de las bacterias anammox mediante las técnicas moleculares PCR y FISH.

El primer enriquecimiento positivo detectado fue el del inóculo procedente de los fangos activos del SBR ubicado en el Laboratorio de Ingeniería Química y Ambiental de la UdG (LEQUIA-UdG). Este reactor había sido inoculado con lodos procedentes de la EDAR

municipal de Sils-Vidreres y alternaba fases aerobias y anóxicas con el objetivo de eliminar materia orgánica y nitrógeno de aguas residuales municipales. En el momento de iniciar el enriquecimiento con este inóculo, estos fangos llevaban tres meses en un reactor de vidrio bajo condiciones anóxicas, con una velocidad de agitación lenta y con un control de las concentraciones de los compuestos de nitrógeno mediante adiciones puntuales de amonio, nitrito y nitrato. Posteriormente, los inóculos procedentes de la laguna de agua salada (Massona), del Sistema de Humedales Construidos (SHC), del sistema de tratamiento de lixiviados del vertedero de Orís y de la EDAR de Sils-Vidreres también dieron resultados positivos. De esta manera, se comprobó que las bacterias anammox estaban presentes en la mayoría de los inóculos escogidos.

Los enriquecimientos en los que se detectó actividad anammox mediante el consumo de amonio y nitrito y la producción de nitrato se analizaron mediante técnicas de biología molecular. Mediante la técnica PCR se identificó la especie *Ca. Brocadia anammoxidans* como la responsable de la actividad anammox en todos los reactores inoculados (GenBank: *accession number* AB054006). Además, se realizó el análisis de la biomasa anammox mediante la técnica molecular FISH utilizando la sonda Amx820 (Amann *et al.*, 1995; Daims *et al.*, 1999), específica para *Ca. Brocadia anammoxidans* y *Ca. Kuenenia stuttgartiensis*.

Sin embargo, no todas las muestras que habían dado un resultado positivo con la técnica PCR fueron detectadas por la técnica FISH en el momento en que se detectó actividad anammox. Únicamente las muestras SBR (LEQUIA-UdG) y EDAR Sils-Vidreres dieron un resultado positivo. En el resto (Massona, SHC y Orís) no se detectaron células anammox debido, posiblemente, a que el número de bacterias anammox presentes en estos enriquecimientos no era lo suficientemente elevado o a que la presencia de elevadas concentraciones de sales y otras sustancias que emitían autofluorescencia enmascaraban las células marcadas impidiendo la visualización de las bacterias a través de la técnica FISH (Sánchez-Melsió, 2006).

Así mismo, a partir del seguimiento de los compuestos de nitrógeno, los enriquecimientos procedentes de la Manga del Mar Menor, de Toplitzsee y de la EDAR de Taradell no mostraron actividad anammox ni fueron detectadas mediante las técnicas de biología molecular.

4.2 Condiciones de operación del proceso SBR-anammox

Para llevar a cabo el proceso anammox se utilizó un reactor SBR de 20L de capacidad máxima, encamisado para mantener la temperatura deseada y equipado con una serie de sondas

que permitían monitorizar el pH, la temperatura, el oxígeno disuelto y el potencial redox. La Tabla 4.2 presenta las condiciones de operación utilizadas para operar el reactor anammox.

Tabla 4.2 Relación de las condiciones de operación aplicadas para poner en marcha el proceso anammox.

Parámetro	Condición aplicada	Rango
Tecnología SBR	Ciclos	Ciclo 8 horas
Oxígeno disuelto	Anaerobiosis	<0.1 mg O ₂ ·L ⁻¹
Agitación	Lenta	100-150 rpm
Alimentación	Continua	6 horas
Relación molar NO ₂ ⁻ :NH ₄ ⁺	Aumento gradual	0.76-1.32 mol·mol ⁻¹
Carga Nitrógeno aplicada	Aumento progresivo	0.01-1.60 kg N·m ⁻³ ·d ⁻¹
Presencia NO ₃ ⁻	Evitar reducción sulfato	0-30 mg N-NO ₃ ⁻ ·L ⁻¹
pH	Control automático	7.5-8.2
Temperatura	Condiciones mesofílicas	36.0±0.3°C

A continuación se explican detalladamente estas condiciones aplicadas en el reactor SBR para la puesta en marcha y enriquecimiento del proceso.

4.2.1 Configuración del ciclo de operación

La configuración de trabajo del SBR se basó en ciclos fijos de 8 horas que se repetían continuamente. El ciclo de trabajo aplicado (Figura 3.4; *Materiales y Métodos*) constaba de cinco etapas distribuidas de la siguiente forma:

- 1) Inyección de nitrógeno gas (4 minutos)
- 2) Alimentación continua y reacción con agitación lenta (356 minutos)
- 3) Reacción con agitación lenta (80 minutos)
- 4) Sedimentación (20 minutos)
- 5) Vaciado (20 minutos)

En primer lugar, se inyectaba nitrógeno para desplazar el aire del interior del reactor. En la fase de alimentación (Etapa 2), el reactor se alimentaba continuamente (*fed batch strategy*) para que las bacterias anammox dispusieran de sustrato durante toda la etapa y al mismo tiempo se evitaba la inhibición del proceso por acumulación de nitrito. La etapa de reacción (Etapa 3) permitía completar la eliminación de amonio y nitrito, siempre que la velocidad de consumo de

estos compuestos fuera lo suficientemente elevada. Finalmente, se realizaban las típicas etapas de sedimentación y vaciado.

4.2.2 Condiciones anaerobias

Para mantener las condiciones anaerobias en el reactor se adoptaron una serie de medidas que minimizaban la entrada de aire en el reactor. En primer lugar, para evitar la difusión de oxígeno, se utilizaron conducciones y conexiones de neopreno. En segundo lugar, el medio sintético utilizado como afluente del sistema anammox se preparaba en bolsas colapsables, en las que se burbujeaba nitrógeno gas para minimizar el contenido de oxígeno en su interior. Finalmente, durante los primeros 4 minutos del ciclo de trabajo se inyectaba N_2 gas por la cúpula del reactor para desplazar el oxígeno que pudiera haber entrado en el reactor durante la etapa de vaciado. Otro parámetro a controlar para evitar la entrada de aire, fue la velocidad de agitación de la mezcla de reacción, que debía ser suficiente para mantener la biomasa en suspensión pero lenta para minimizar la aireación superficial. En este sentido, la concentración de oxígeno disuelto en el interior del reactor se mantuvo por debajo de $0.1 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ durante todo el estudio.

4.2.3 Características del alimento sintético

Según la estequiometría del proceso anammox (Ecuación 1.8, *Introducción*), la relación molar nitrito:amonio del alimento debe de ser de $1.32 \text{ moles NO}_2^- \cdot \text{mol}^{-1} \text{NH}_4^+$. Sin embargo, durante la puesta en marcha del proceso debe prestarse especial atención a la concentración de nitrito, ya que es un inhibidor del proceso anammox (Strous *et al.*, 1999b). Así, durante la puesta en marcha del proceso, se propuso alimentar el reactor con una relación molar nitrito:amonio en el afluente de 0.76 para evitar una posible acumulación de nitrito. Esta relación se incrementa hasta el valor estequiométrico de 1.32 cuando la biomasa anammox estaba completamente desarrollada. Además, el aumento de la carga de nitrógeno aplicada se realizó gradualmente para evitar su acumulación en el interior del reactor. Las concentraciones de amonio y nitrito en el afluente se aumentaban cuando la concentración de nitrito en el efluente del reactor anammox era inferior a $15 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1}$.

El medio sintético utilizado para operar el proceso anammox contenía amonio, nitrito, nitrato, fuente de carbono (bicarbonato), fósforo y solución de micronutrientes (*Capítulo 3, Materiales y Métodos*). Las concentraciones iniciales de amonio y nitrito fueron de 10 y 15 $\text{mg N} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente, incrementándose a lo largo del estudio hasta alcanzar unas concentraciones de $1300 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ y $1768 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Además, a este alimento se le

añadía nitrato para prevenir la formación de ácido sulfhídrico (H_2S), compuesto tóxico para las bacterias anammox. En este sentido, si no hubiera nitrato disponible en el medio, las bacterias sulfato-reductoras utilizarían el sulfato (SO_4^{2-}) como donador de electrones, reduciéndolo a ácido sulfhídrico.

4.2.4 Parámetros operacionales: pH y temperatura

El intervalo de pH óptimo para operar un reactor anammox está entre 6.7 y 8.3 unidades de pH (Jetten *et al.*, 1999; Egli *et al.*, 2001). Según la Ecuación 1.8 (*Introducción*), se produce un consumo de protones (H^+) que provoca un aumento del pH que es necesario corregir para evitar posibles inhibiciones del proceso. Por lo tanto, se implementó un control automático del pH. Durante la etapa de alimentación continua y reacción del ciclo de operación (Figura 3.4; *Materiales y Métodos*), se adicionaba ácido clorhídrico 1M para mantener el valor del pH entre 7.5 y 8.2 unidades. Por otro lado, la temperatura de operación, controlada a partir de la recirculación de agua caliente a través de la camisa del reactor, se mantuvo a $36.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ durante todo el estudio.

4.2.5 Inóculo del SBR-anammox

El reactor anammox se inoculó con biomasa procedente de diferentes orígenes: la EDAR de *Sils-Vidreres (Girona)*, la planta de tratamiento de lixiviados de vertedero de *Orís (Vic, Barcelona)* y la planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos *Ecoparc (Barcelona)*. Exceptuando los lodos procedentes del *Ecoparc*, en los otros dos casos se habían obtenido resultados positivos mediante los ensayos en *batch* realizados previamente (*Apartado 4.1*). Los lodos procedentes de *Ecoparc* se incluyeron en el inóculo escogido para la puesta en marcha del proceso porque esta planta operaba con unas condiciones que favorecían la presencia de la biomasa anammox: alternancia de fases aerobias y anóxicas, cargas de nitrógeno elevadas y temperatura de operación entre 30 y 38°C . Cabe resaltar que no se utilizó el inóculo enriquecido con biomasa anammox de los estudios previos.

El volumen de lodos fue el mismo para los tres inóculos seleccionados. Una vez inoculado el reactor, la concentración inicial de Sólidos Suspensión Totales (SST) y Sólidos Suspensión Volátiles (SSV) en el interior del reactor fue de 2.48 y $1.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Así, la relación $\text{SSV}\cdot\text{SST}^{-1}$ fue de 0.71. Igual que en los experimentos en *batch*, al iniciarse la puesta en marcha del proceso anammox, no se detectó la presencia de bacterias anammox mediante las técnicas moleculares PCR y FISH en la mezcla de lodos escogida.

4.3 Puesta en marcha y enriquecimiento de las bacterias anammox

El reactor SBR operó durante un año, realizándose el seguimiento de los parámetros fisicoquímicos más significativos del proceso. Según los resultados obtenidos durante la puesta en marcha del proceso anammox se distinguieron tres períodos de operación (Tabla 4.3):

- Período 1. Arranque del proceso anammox.
- Período 2. Enriquecimiento del proceso anammox con baja carga de nitrógeno.
- Período 3. Enriquecimiento del proceso anammox con alta carga de nitrógeno.

Tabla 4.3 Condiciones de operación y características del afluente sintético durante los tres períodos.

	Unidades	Período 1 Arranque	Período 2 Enriquecimiento Baja Carga N	Período 3 Enriquecimiento Alta Carga N
Tiempo	días	0-78	79-225	226-365
NO₂⁻:NH₄⁺ afluente	mol·mol ⁻¹	0.76	1.00	1.32
Carga N aplicada	kg N·m ⁻³ ·d ⁻¹	0.01-0.02	0.02-0.25	0.25-1.60
NH₄⁺ afluente	mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹	14.9-24.5	21.9-250.0	250.0-1301.4
NO₂⁻ afluente	mg N-NO ₂ ⁻ ·L ⁻¹	9.6-20.9	22.2-263.1	263.1-1768.6
NO₃⁻ afluente	mg N-NO ₃ ⁻ ·L ⁻¹	200.6-31.8	34.8-28.2	27.0-0
Eliminación NH₄⁺	%	0-53	53-79	79-99.9
Eliminación NO₂⁻	%	0-56	56-96	96-99.5
TRH⁽¹⁾	días	3.6-2.4	2.4-1.9	1.9
pH	unidades pH	7.5-8.1	7.4-8.4	7.2-8.7

⁽¹⁾ Tiempo Retención Hidráulico

Estos tres períodos estaban caracterizados por la relación molar nitrito:amonio en el afluente (0.76, 1.0 y 1.32 moles N-NO₂⁻:mol N-NH₄⁺, respectivamente) y por el incremento exponencial de la carga de nitrógeno aplicada (desde 0.01 hasta 1.60 kg N·m⁻³·d⁻¹). La relación molar nitrito:amonio en el afluente durante el primer período (0-78 días) fue de 0.76 moles de NO₂⁻ por mol de NH₄⁺. Esta relación molar, inferior a la propuesta por Strous *et al.* (1998), mantenía el nitrito como compuesto limitante disminuyendo el riesgo de acumulación de este compuesto y por tanto la inhibición del proceso. Una vez puesto en marcha el proceso, esta relación se aumentó en cada período hasta trabajar con la relación estequiométrica de 1.32 (Ecuación 1.8) durante el tercer período de enriquecimiento con elevada carga de nitrógeno. Por otro lado, el afluente también contenía nitrato que fue reduciéndose a lo largo de los tres períodos a medida que se producía por el propio proceso anammox.

La puesta en marcha del proceso anammox se inició con una carga de N aplicada (amonio + nitrito) de $0.01 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, que fue incrementándose progresivamente a lo largo de los tres períodos. El incremento de la carga de nitrógeno aplicada se realizó aumentando las concentraciones de amonio y nitrito en el afluente y el volumen tratado por ciclo. En este sentido, el tiempo de retención hidráulico (TRH) disminuyó de 3.6 a 1.9 días a lo largo de los tres períodos (Tabla 4.3).

En la Figura 4.1 se presenta la evolución de la carga de N aplicada (amonio + nitrito) y de la carga de N en el efluente (amonio + nitrito) en $\text{kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ durante los tres períodos.

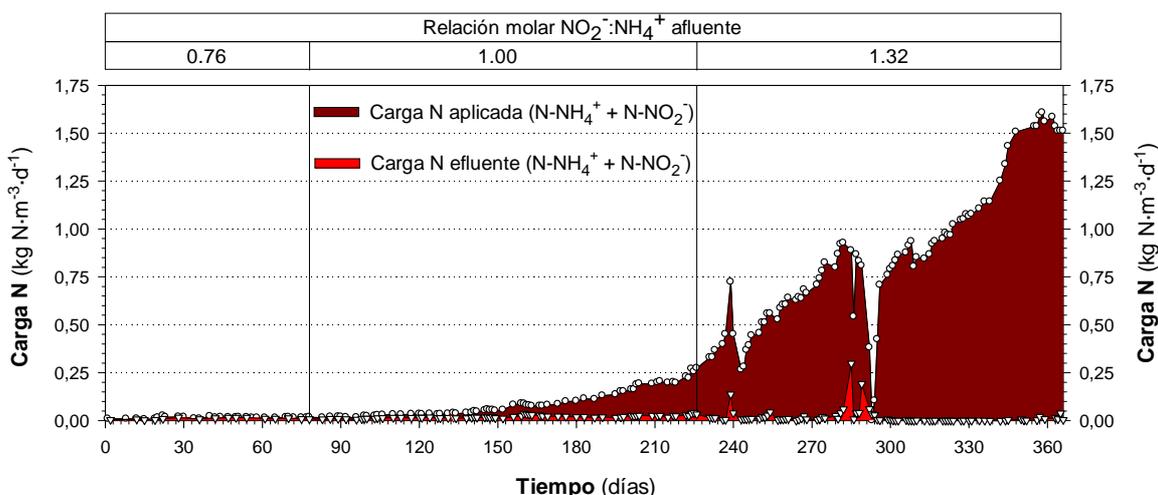


Figura 4.1 Evolución de la carga de nitrógeno aplicada y del nitrógeno descargado durante la puesta en marcha del proceso anammox.

Durante el período de arranque del proceso (0-78 días), la carga de N aplicada fue de $0.01\text{-}0.02 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. Aplicando esta baja carga de N se evitó la acumulación de nitrito en el interior del reactor. Una vez se detectó la actividad anammox a partir del consumo simultáneo de amonio y nitrito y de la detección positiva mediante la técnica molecular PCR, la carga de N se incrementó progresivamente de 0.02 a $0.25 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ entre los días 79 y 225 (enriquecimiento con baja carga de nitrógeno). A partir del día 226 (enriquecimiento con alta carga de nitrógeno), la carga de N aplicada se aumentó exponencialmente a medida que el amonio y el nitrito eran consumidos por la biomasa anammox, hasta tratar $1.60 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$. A continuación se explican detalladamente estos tres períodos.

4.3.1 Período 1: Arranque del proceso anammox (0-78 días)

Una vez inoculado el reactor SBR con la mezcla de fangos activos descrita anteriormente, se alimentó el reactor con un afluente sintético que contenía una concentración media de $15 \text{ mg N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$, $10 \text{ mg N-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$ y $200 \text{ mg N-NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabla 4.3) con una relación molar

nitrito:amonio de, aproximadamente, 0.76 moles de NO_2^- por mol de NH_4^+ . El TRH durante el arranque del proceso anammox disminuyó de 3.6 a 2.4 días (Tabla 4.3), alimentando entre 4 y $6.5 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$, respectivamente, con la finalidad de aumentar progresivamente la carga de N aplicada. En la Figura 4.2 se presenta la evolución de la carga de N aplicada (amonio + nitrito) y la carga de N en el efluente durante el primer período. Inicialmente la carga de nitrógeno aplicada fue de $0.01 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, incrementándose a aproximadamente $0.02 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ a partir del día 20. Durante este primer período, la carga de N aplicada fue prácticamente igual que la carga de N en el efluente.

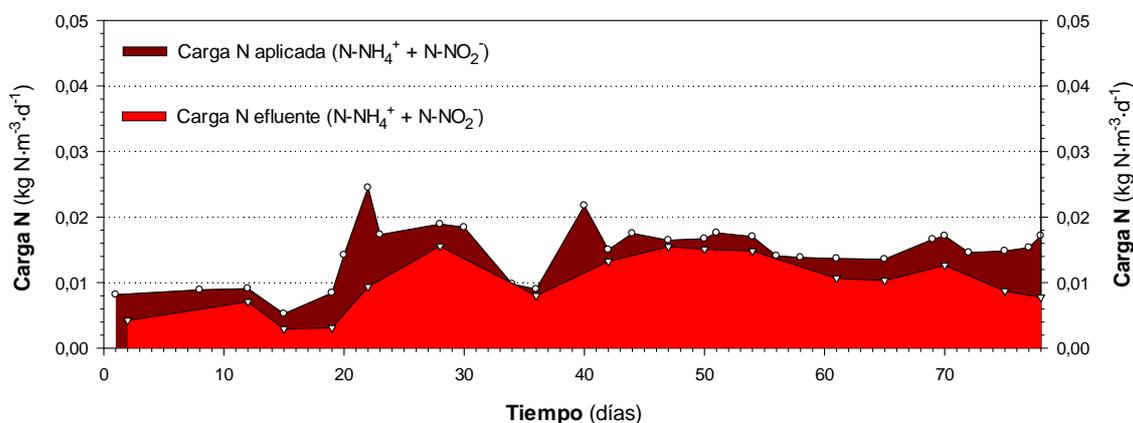


Figura 4.2 Evolución de la carga de nitrógeno aplicada y de la acumulación de nitrógeno durante el arranque del proceso anammox (Período 1).

En la Figura 4.3 se presenta la evolución de los compuestos nitrogenados (amonio, nitrito y nitrato) en el afluente y en el efluente durante este primer período.

Durante la primera semana se observó un aumento de la concentración de amonio en el efluente debido a que el nitrógeno orgánico (N_{org}), presente en la mezcla de lodos utilizada para inocular el reactor, se hidrolizó obteniéndose nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+). Una vez amonificado todo el nitrógeno orgánico (día 19), la concentración de amonio en el efluente se estabilizó manteniéndose prácticamente igual a la concentración presente en el medio sintético alimentado que se aumentó a partir del día 20 hasta la finalización del período ($25 \text{ mg N-NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$) (Figura 4.3A).

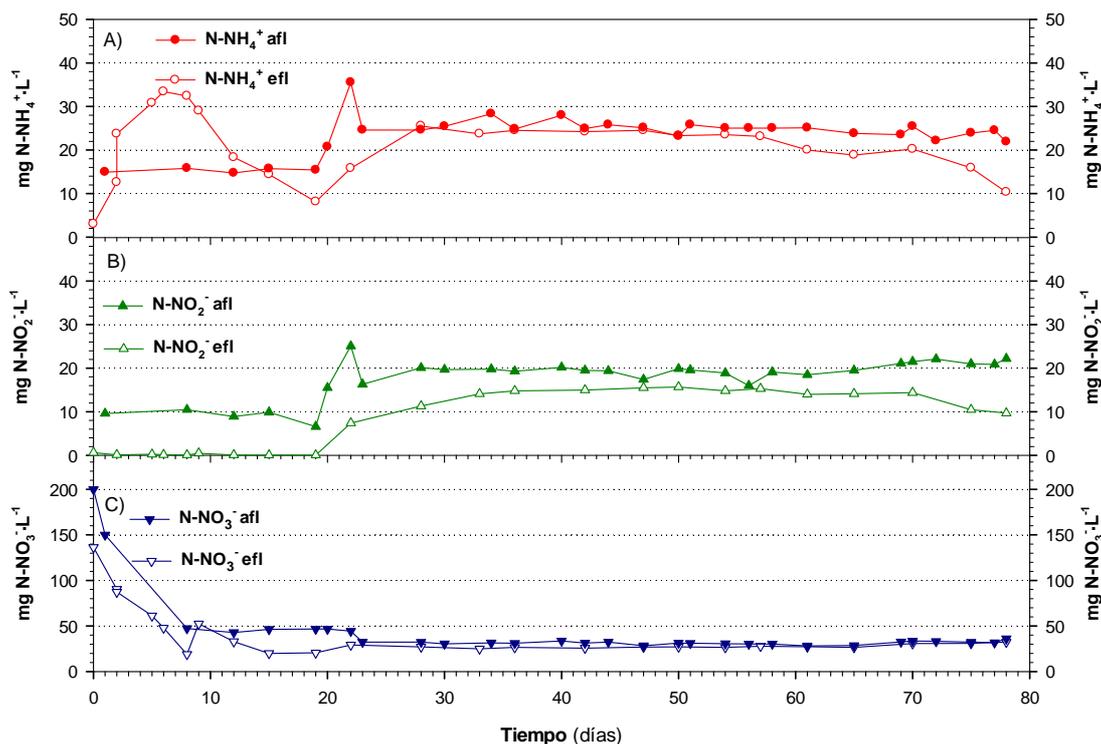


Figura 4.3 Evolución de los compuestos nitrogenados durante el primer período, arranque del proceso anammox (días 0-78)

Al mismo tiempo, el nitrito alimentado se consumió vía desnitrificación heterotrófica hasta el día 19, utilizando la materia orgánica biodegradable presente en el inóculo. A partir del día 20 se aumentó la concentración de nitrito en el alimento manteniéndola a 20 mg N-NO₂⁻·L⁻¹ hasta el final del período (Figura 4.3B).

En lo que concierne al nitrato, durante los primeros días de la puesta en marcha del reactor anammox (0-21 días), el nitrato del afluente actuó como aceptor de electrones consumiéndose rápidamente por desnitrificación heterotrófica (Figura 4.3C). Una vez eliminada la mayor parte de la materia orgánica biodegradable, la concentración de nitrato en el afluente se redujo de 150 mg N-NO₃⁻·L⁻¹ (día 1) hasta 50 mg N-NO₃⁻·L⁻¹ (día 8). A partir del día 23 y hasta la finalización del período se alimentó el reactor con 30 mg N-NO₃⁻·L⁻¹ (Figura 4.3C).

A partir del día 60 las concentraciones de amonio y nitrito en el efluente disminuyeron. Así, según la ecuación que describe el proceso anammox (Ecuación 1.8), la eliminación tanto de amonio como de nitrito fue el primer indicio de la actividad de las bacterias anammox en este primer período. En este sentido, el día 60 se realizó el análisis molecular de la biomasa presente en el SBR mediante la técnica molecular PCR. Este análisis resultó ser positivo y la especie detectada fue identificada como *Ca. Brocadia anammoxidans* (GenBank: *accession number* AB054006).

4.3.2 Período 2: Enriquecimiento del proceso anammox con baja carga de nitrógeno (79-225 días)

Debido a la disminución conjunta de amonio y nitrito en el interior del reactor anammox, a partir del día 80 se aumentó de forma gradual la carga de nitrógeno aplicada desde 0.02 a 0.25 $\text{kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (Figura 4.1; Tabla 4.3). En la Figura 4.4 se representa la carga de N aplicada y la carga de N en el efluente durante el Período 2.

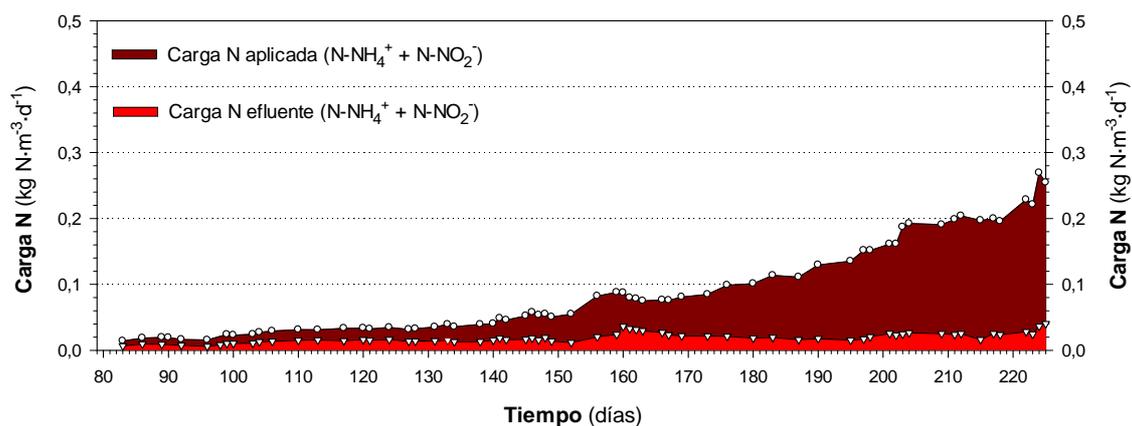


Figura 4.4 Evolución de la carga de nitrógeno aplicada y de la carga de nitrógeno en el efluente durante el segundo período.

En este período la relación molar nitrito:amonio se incrementó hasta 1.0 mol de NO_2^- por mol de NH_4^+ (Tabla 4.3), cercana a la propuesta en la Ecuación 1.8, para disminuir la limitación del proceso por nitrito. El incremento de la carga aplicada se llevó a cabo aumentando las concentraciones de amonio y nitrito en el afluente y disminuyendo progresivamente el TRH hasta 1.9 días (Tabla 4.3), tratando $8.4 \text{ L}\cdot\text{d}^{-1}$ de alimento sintético. Este aumento de carga se efectuaba cuando la concentración de nitrito en el efluente era inferior a $15 \text{ mg N}\cdot\text{NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$.

En la Figura 4.5 se presenta la evolución de los compuestos nitrogenados entre los días 79 y 225 (enriquecimiento con baja carga de nitrógeno). En esta figura se observa como a partir del día 100 las concentraciones de amonio y nitrito en el afluente aumentaron progresivamente (Figuras 4.5A y 4.5B), mientras que la concentración de nitrato en el alimento se redujo a $25 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ debido al aumento de la concentración por la biomasa anammox (Figura 4.5C).

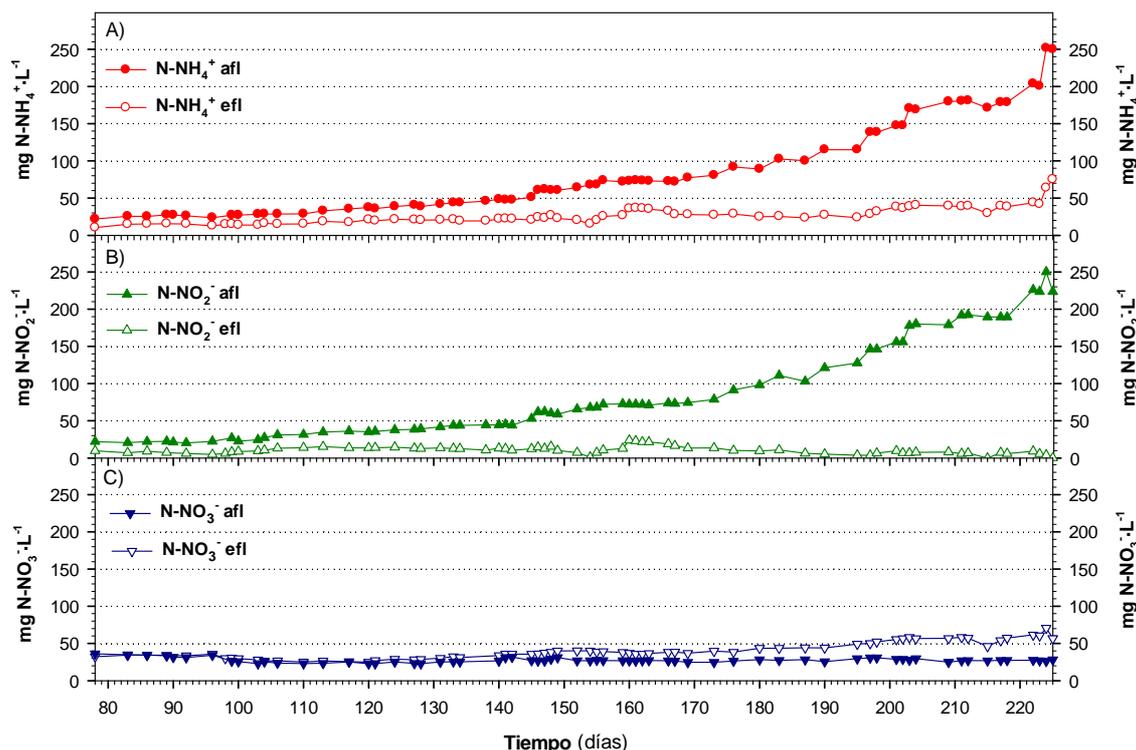


Figura 4.5. Evolución de los compuestos nitrogenados durante el segundo período (días 79-225).

A pesar de aumentar las concentraciones de amonio y nitrito en el afluente, las concentraciones en el efluente de estos dos compuestos se mantuvieron estables. Este consumo de amonio y nitrito (Figuras 4.5A y 4.5B), unido a la generación de nitrato (Figura 4.5C), confirmó la presencia de la biomasa anammox en el reactor SBR. Sin embargo, en la Figura 4.5A se observa la acumulación de amonio en el efluente debido a la aplicación de una relación molar nitrito:amonio inferior a la estequiométrica. Por esta razón, a partir del día 226 (Período 3) se aumentó esta relación a 1.32, correspondiente a la relación estequiométrica (Strous *et al.*, 1998).

4.3.3 Período 3: Enriquecimiento del proceso anammox con alta carga de nitrógeno (226-365 días)

En la Figura 4.6 se muestra la evolución de los compuestos nitrogenados en el afluente y en el efluente entre los días 226 y 365. Durante este período se trabajó con una relación molar nitrito:amonio en el afluente de 1.32 (Tabla 4.3). Al coincidir con la relación estequiométrica, las concentraciones de amonio (Figura 4.6A) y nitrito (Figura 4.6B) en el efluente eran prácticamente nulas durante todo el período. Por otro lado, a partir del día 232 se retiró el nitrato del alimento ya que la generación de éste por la actividad de las bacterias anammox provocó un aumento progresivo hasta alcanzar los casi 300 mg N·L⁻¹ en el efluente (Figura 4.6C).

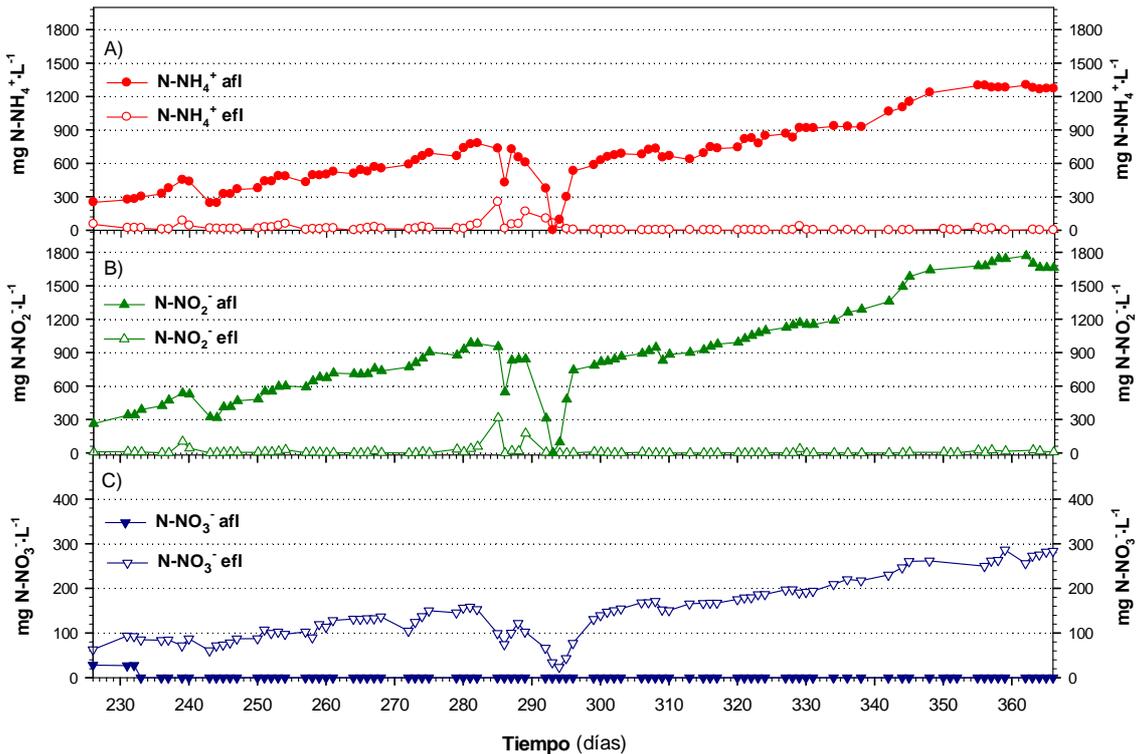


Figura 4.6 Evolución de los compuestos nitrogenados durante el tercer período (días 226-365).

El incremento de las concentraciones de amonio y nitrito en el afluente se realizó de manera gradual, llegándose a tratar $1300 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ y $1768 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ (Tabla 4.3, Figuras 4.6A y 4.6B). En este sentido, en la Figura 4.7 se representa el aumento de la carga de N aplicada, así como la carga de N en el efluente y la carga de N eliminada por parte de la biomasa anammox. Además, se observa como la carga de N aplicada es prácticamente igual a la carga de N eliminada, exceptuando los episodios de inhibición. En este período se llegaron a tratar $1.60 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, obteniéndose un porcentaje de eliminación de amonio y nitrito superior al 99% (Tabla 4.3).

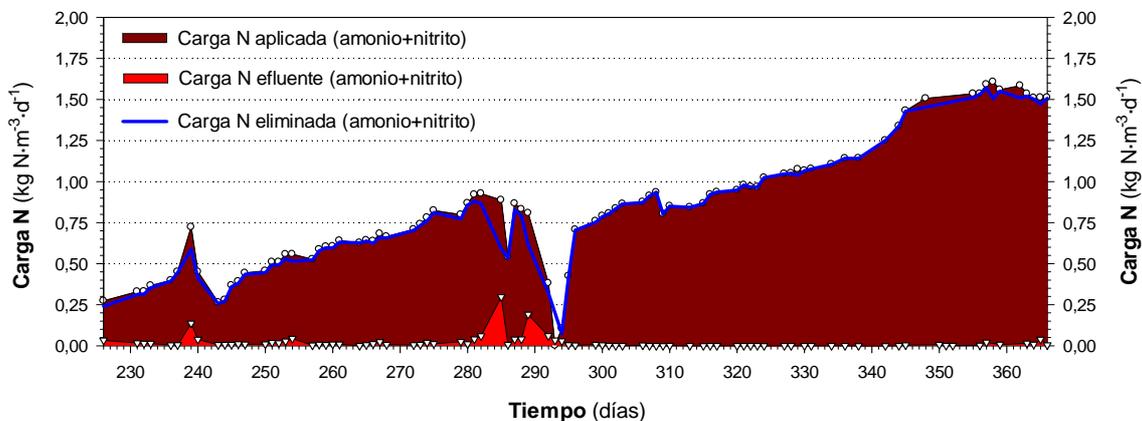


Figura 4.7 Evolución de la carga de N aplicada, de la carga de N en el efluente y de la carga de N eliminada durante el tercer período.

Por otro lado, la Figura 4.8 presenta la evolución del pH durante los tres períodos de operación. Como se ha comentado anteriormente, el valor de pH se controló automáticamente mediante la adición de HCl 1M para mantener el pH entre 7.5 y 8.2 unidades, aproximadamente (Períodos 1 y 2). A partir del tercer periodo la variabilidad del pH fue más acusada debido a una mayor actividad de las bacterias anammox. Así, en este periodo se obtuvieron valores de pH superiores a 8.5 unidades. Esto provocó la pérdida de actividad de la biomasa anammox entre los días 280 y 290 debido a la acumulación de amonio y nitrito el interior del reactor (Figuras 4.6A y 4.6B). Una vez restablecido el pH se disminuyó, por precaución, la carga de nitrógeno aplicada hasta recuperarse completamente la actividad anammox (Figura 4.7).

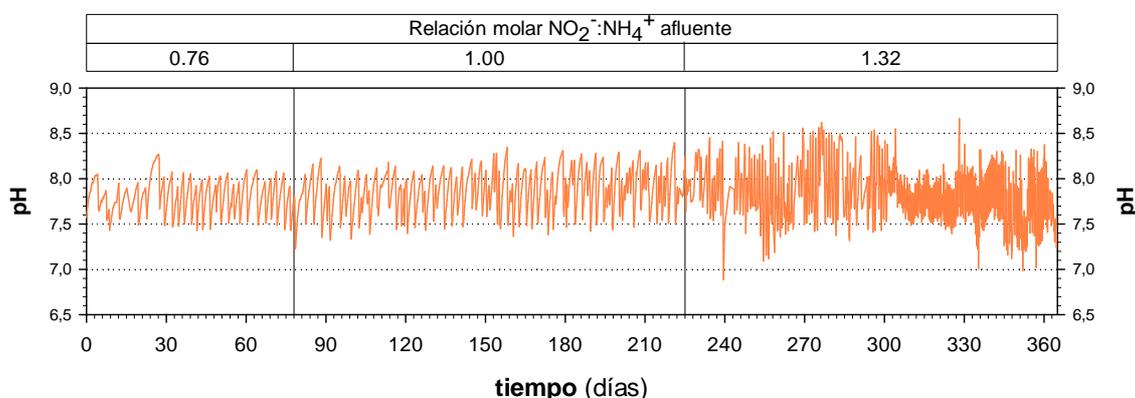


Figura 4.8 Evolución del pH durante los tres periodos de estudio.

El oxígeno disuelto, la temperatura y el potencial de oxidación-reducción fueron los otros parámetros que se monitorizaban en línea. El oxígeno disuelto se mantuvo siempre alrededor de $0.1 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, que era el valor mínimo que detectaba la sonda. La temperatura de trabajo se mantuvo en torno a $36.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$. El valor del potencial redox fue de 150 mV durante la mayor parte del estudio.

Por otro lado, en este tercer período se produjo la inhibición del proceso anammox en dos sucesos distintos. En un primer incidente, el día 239 se incrementó inesperadamente la carga de N aplicada (de 0.45 a $0.72 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) debido a un fallo en la bomba de alimentación (Figura 4.7). Debido a este aumento repentino de carga, se produjo la acumulación de $100 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 4.6B) y de $84 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 4.6A), aunque se mantuvo la carga de N eliminada de los días previos (Figura 4.7).

En un segundo incidente, ocasionado por un fallo en el sistema de control del pH, se trabajó durante 36 horas a valores de pH superiores a 8.5 unidades. Entre los días 280 y 290, debido a la inhibición del proceso se acumularon $313 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ y $252 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ en el interior del

reactor (Figuras 4.6A y 4.6B), observándose, además, una disminución de la concentración de nitrato en el efluente (Figura 4.6C) debido a la baja actividad de las bacterias anammox.

En este sentido, diversos estudios indicaban una completa pérdida de la actividad de estos microorganismos a concentraciones superiores a $100 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ (Strous *et al.*, 1999b; Schmidt *et al.*, 2003; Jetten *et al.*, 2005a). Por esta razón, cuando se acumuló nitrito en el reactor anammox, ya sea por sobrecarga (día 239) o por elevados valores de pH (día 285), el sistema se restableció disminuyendo la carga de N aplicada hasta que la concentración de nitrito en el efluente fue inferior a $15 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$. Exceptuando estos episodios de inhibición del proceso anammox, los porcentajes de eliminación de amonio y nitrito fueron superiores al 99% (Tabla 4.3), obteniéndose concentraciones prácticamente nulas de amonio y nitrito en el efluente del reactor anammox durante el tercer período (Figuras 4.6A y 4.6B).

4.3.4 Caracterización de las bacterias anammox

La biomasa responsable de llevar a cabo el proceso anammox presentó a partir del segundo período una estructura granular. Diversos autores han descrito que las bacterias anammox suelen crecer en biopelículas en un material de soporte (Siegrist *et al.*, 1998; Hippen *et al.*, 2001; Pynaert *et al.*, 2003; Cema *et al.*, 2007) o en forma de gránulos (Strous *et al.*, 1998; Sliemers *et al.*, 2003; Dapena-Mora *et al.*, 2004b; Van der Star *et al.*, 2007). La formación de gránulos permitió obtener velocidades de sedimentación elevadas, lo que minimizó la pérdida de biomasa anammox por el efluente durante la etapa de vaciado de cada ciclo.

El día 365 se efectuó la caracterización de esta biomasa. En la Figura 4.9 se presenta una fotografía donde se observa el aspecto granular de la biomasa anammox, así como su color rojo característico.



Figura 4.9 Fotografía de la biomasa granular anammox durante el ensayo realizado.

Durante la caracterización de esta biomasa se estimó el tamaño de gránulo (diámetro= $2.7\pm 0.7\text{mm}$) y se calculó el índice volumétrico de fangos (IVF) para comprobar las características de sedimentabilidad. Se determinó una $\text{IVF}_5=\text{IVF}_{10}= 34 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ y una relación entre la IVF_{10} y la IVF_{30} de 1. Los valores obtenidos de estos parámetros son típicos de una biomasa granular (Schwarzenbeck *et al.*, 2004). Por otro lado, las concentraciones de SST y SSV en el interior del reactor al finalizar el Período 3 eran de $2.1\pm 0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.8\pm 0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, mientras que la concentración media de SSV en el efluente era de $0.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Por otro lado, meses más tarde de realizar el estudio de la biomasa anammox se realizaron una serie de fotografías con el microscopio binocular *Zeiss STEREO Discovery V12+Cámara Nikon Coolpix-4500*. En la Figura 4.10 se presenta una de estas fotografías en la que se puede apreciar el aspecto granular de la biomasa. Cabe señalar que el tamaño de las bacterias anammox disminuyó después de realizarse este estudio.

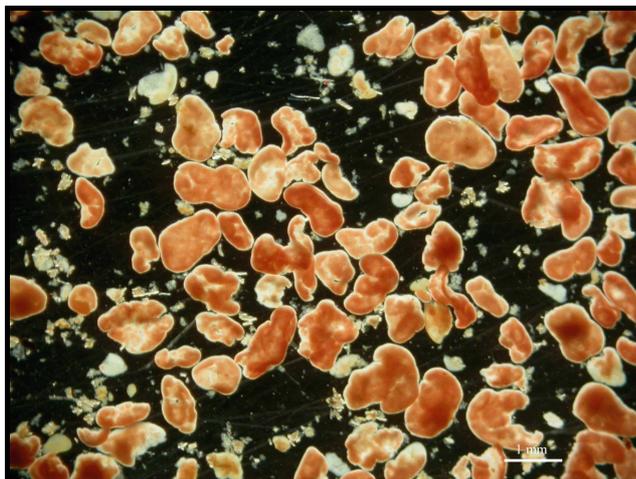


Figura 4.10 Fotografía de la biomasa granular anammox realizada meses después del enriquecimiento de las bacterias anammox. Escala: 1 mm.

4.4 Herramientas para realizar el seguimiento del proceso anammox

Durante la puesta en marcha y enriquecimiento de las bacterias anammox se utilizaron diferentes técnicas para el seguimiento y la evaluación del proceso.

4.4.1 Técnicas moleculares: PCR y FISH

La detección de los microorganismos anammox se realizó mediante las técnicas moleculares FISH y PCR, descritas en el capítulo de *Materiales y Métodos*. Mientras que la técnica FISH permitió detectar y cuantificar a las bacterias anammox, la técnica PCR identificó el género y la

especie de éstas. En este sentido, se tomaron muestras durante los tres períodos para estudiar la evolución del proceso. En la Tabla 4.4 se presentan los resultados obtenidos al aplicar estas técnicas y el porcentaje de bacterias anammox presentes en el reactor respecto al número total de microorganismos (*Eubacteria*). Inicialmente (día 0), se realizó el análisis molecular de la biomasa anammox presente en el inóculo, obteniendo resultados negativos tanto por la técnica PCR como por FISH.

Tabla 4.4 Resultado del análisis de la biomasa anammox mediante las técnicas moleculares PCR y FISH.

Período	Día de estudio	PCR	FISH	% Biomasa anammox
1	0	nd ⁽¹⁾	nd ⁽¹⁾	-
	60	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	nd ⁽¹⁾	-
2	152	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	+	40.2±7.1
3	245	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	+	nd ⁽¹⁾
	365	<i>Ca. Brocadia anammoxidans</i>	+	85.0±1.8

⁽¹⁾ no detectado

Al cabo de 60 días de iniciarse la puesta en marcha del proceso, el análisis realizado mediante la técnica molecular PCR, con cebadores que amplificaban a las bacterias anammox, resultó ser positivo. A partir de la posterior secuenciación directa del producto de PCR se obtuvo una homología del 98% respecto a *Ca. Brocadia anammoxidans* (GenBank: *accession number* AB054006), utilizando la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), mediante la herramienta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*). Esta homología fue considerada suficientemente elevada para verificar que la especie detectada por PCR era *Ca. Brocadia anammoxidans*. Por otro lado, mediante la técnica FISH, utilizando las sondas Amx820-Cy3 y Eub338-(I-II-III)-Cy5, no se detectó la presencia de bacterias anammox, posiblemente debido a la baja concentración de estos microorganismos en la muestra analizada. En este sentido, con muestras poco enriquecidas, la técnica PCR es más sensible que el análisis mediante la técnica FISH.

El día 152 (Período 2) se realizó un nuevo análisis microbiológico de la biomasa presente en el reactor, dando resultados positivos por ambas técnicas. Además, a partir del análisis molecular mediante la técnica FISH se determinó que el porcentaje de bacterias anammox respecto a la biomasa total (*Eubacteria*) era del 40.2±7.1%.

Finalmente, los días 245 y 365 (Período 3) se tomaron nuevas muestras para realizar el análisis molecular de la biomasa anammox (Tabla 4.4). En la Figura 4.11 se presenta la imagen FISH obtenida de la muestra del día 365.

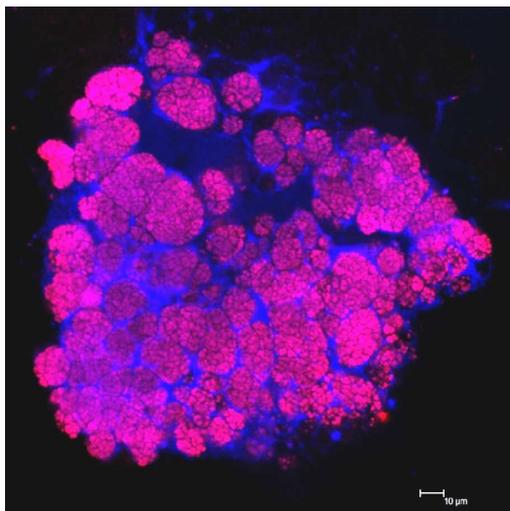


Figura 4.11 Microfotografía FISH generada con la sonda Amx820-Cy3 (color rosado) respecto al total de bacterias (Eubacteria, Eub338-(I-II-III)) el día 365 de estudio. Escala: 10 μm (López *et al.*, 2008)

Esta imagen, realizada con el microscopio de rastreo láser confocal (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscope*), permitió cuantificar el porcentaje relativo de la biomasa anammox respecto al total de microorganismos (*Eubacteria*), obteniéndose un $85.0 \pm 1.8\%$ de bacterias anammox. Por otro lado, la PCR confirmó que las bacterias anammox cultivadas en el reactor SBR seguían perteneciendo a la especie *Ca. Brocadia anammoxidans* (Tabla 4.4).

4.4.2 Relaciones estequiométricas. Consumo amonio versus consumo de nitrito y producción de nitrato

En primer lugar, se determinó el consumo de amonio y de nitrito y la generación de nitrato durante todo el procedimiento experimental (Figura 4.12), como mecanismo de seguimiento del proceso anammox.

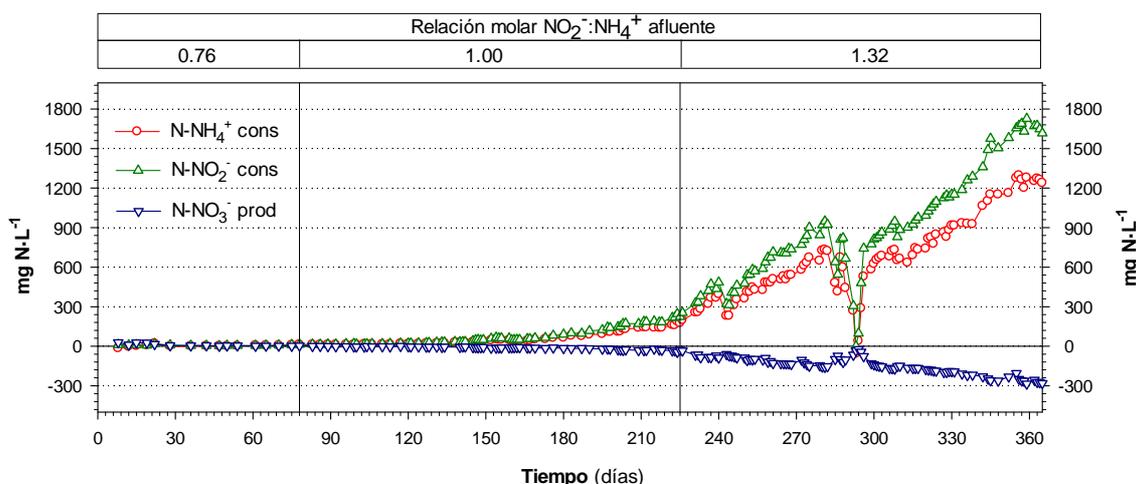


Figura 4.12 Evolución del consumo de amonio y nitrito y de la producción de nitrato durante todo el estudio.

A partir del día 170 se observó un consumo elevado de amonio y nitrito, así como una elevada producción de nitrato, exceptuando los episodios de inhibición del proceso, donde

disminuyó el consumo de amonio y nitrito y la producción de nitrato (días 280-290). Esto demostró el comportamiento característico del proceso anammox (Ecuación 1.8). La eliminación de nitrito por parte de las bacterias anammox durante el tercer período fue más elevada que la eliminación de amonio debido a que se consumieron 1.32 moles de NO_2^- por mol de NH_4^+ .

Para evaluar si la eliminación del nitrógeno era únicamente debida al proceso anammox, se realizó el seguimiento de las relaciones estequiométricas entre el nitrito y el amonio eliminado y entre el nitrato producido y el amonio eliminado a lo largo del período experimental, comparándolos con los valores teóricos según la estequiometría de la reacción anammox (Ecuación 1.8). En la Figura 4.13 se presentan estas relaciones estequiométricas, una vez detectada la actividad anammox a través del consumo simultáneo de amonio y nitrito (a partir del día 60).

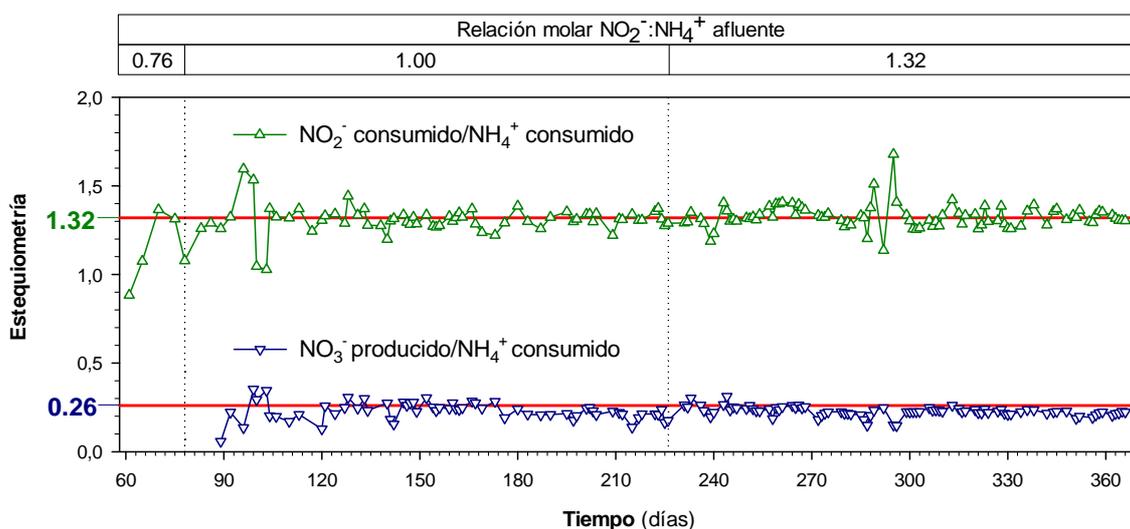


Figura 4.13 Relaciones estequiométricas durante el enriquecimiento de la biomasa anammox (días 60-365).

El seguimiento de estas relaciones se utilizó como parámetro de control para determinar el buen funcionamiento del proceso. La relación media obtenida a partir de los valores experimentales durante los períodos de enriquecimiento (Períodos 2 y 3) fue de 1.32 ± 0.05 moles de NO_2^- eliminados por mol de NH_4^+ eliminado y de 0.23 ± 0.05 moles de NO_3^- producidos por mol de NH_4^+ eliminado, valores muy próximos a los obtenidos por Strous *et al.* (1998) en la Ecuación 1.8 (1.32 y 0.26). Para corroborar estos resultados, en la Figura 4.14 se representa el consumo de nitrito y la producción de nitrato versus el consumo de amonio durante todo el estudio.

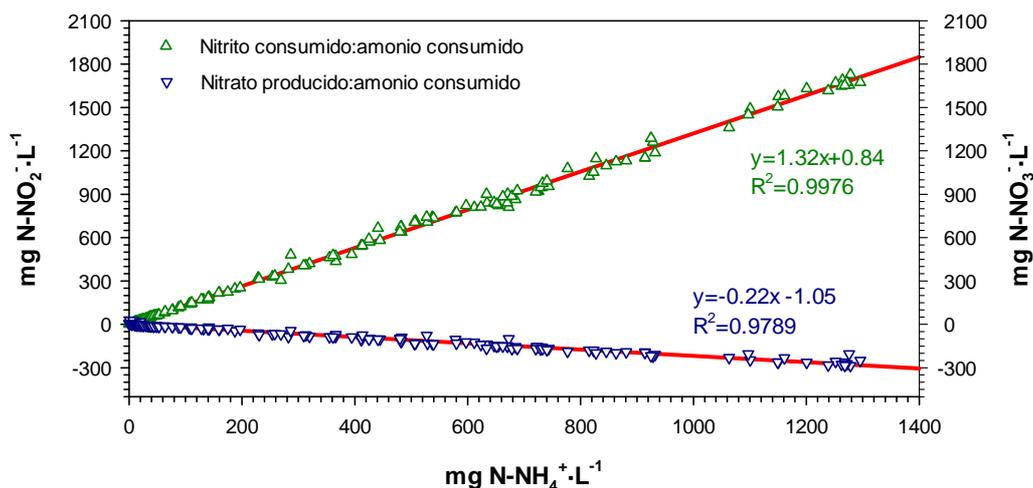


Figura 4.14 Correlación nitrito:amonio consumidos y nitrato producido:amonio consumido durante todo el estudio.

A partir de estos datos se calculó la recta de regresión para estas dos relaciones, donde la pendiente de cada una de ellas corresponde a las relaciones molares experimentales entre el nitrito:amonio consumidos y entre el nitrato producido:amonio consumido. Para la relación nitrito consumido:amonio consumido se obtuvo un valor de 1.32. Este valor es idéntico al propuesto por Strous *et al.* (1998). En cambio, para la relación nitrato producido:amonio consumido se obtuvo un valor de 0.22. Esta producción de nitrato inferior al valor estequiométrico (0.26; Ecuación 1.8) se pudo deber, posiblemente, a que una pequeña parte de este nitrato fuera consumida por la biomasa heterotrófica presente en el reactor anammox, utilizando la materia orgánica producida por la muerte de los microorganismos.

4.4.3 Análisis de un ciclo operacional. Determinación de las velocidades de reacción

Al inicio del tercer período (día 232), se realizó el estudio de las velocidades de consumo de amonio y nitrito y de la producción de nitrato por parte de las bacterias anammox durante un ciclo de operación de 8 horas. Las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el medio sintético alimentado este día eran $277.0 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, $342.0 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{L}^{-1}$ y $27.8 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$. Durante el ciclo de operación se alimentaban 2.8 L ($V_{\text{mín}}=13.0 \text{ L}$ y $V_{\text{máx}}=15.8\text{L}$) con un TRH de 1.9 días.

En la Figura 4.15 se representan los valores experimentales obtenidos para el amonio (círculo rojo), nitrito (triángulo verde) y nitrato (triángulo azul), así como las concentraciones teóricas de estos compuestos si no se produjera la reacción anammox (líneas discontinuas) teniendo en cuenta el cambio de volumen producido durante la etapa de alimentación.

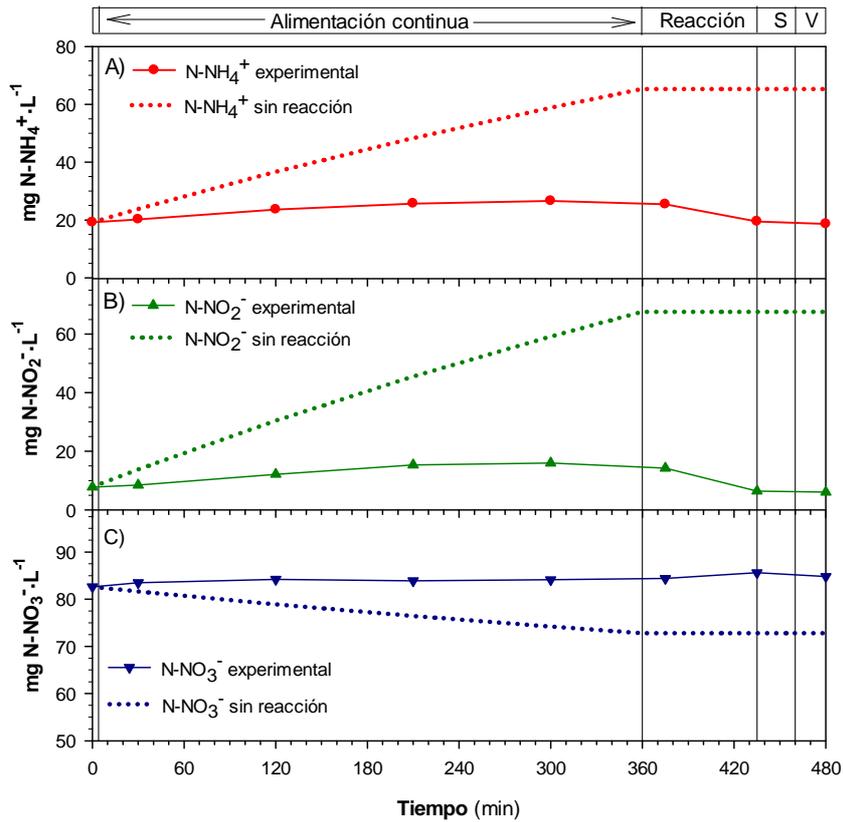


Figura 4.15 Evolución de los perfiles de amonio (A), nitrito (B) y nitrato (C) durante el ciclo operacional de 8 horas.

En la Figura 4.15 se observa como durante la fase de alimentación, las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el reactor se mantuvieron prácticamente estables (líneas continuas). A continuación, durante la etapa de reacción, se produjo una disminución de amonio y nitrito al dejar de alimentar el reactor. Finalmente, durante las etapas de sedimentación (S) y vaciado (V) no se observó, prácticamente, ningún cambio. A partir de los resultados experimentales obtenidos durante el ciclo de 8 horas se calculó el consumo de amonio y nitrito y la producción de nitrato en cada muestra tomada durante el ciclo (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Amonio y nitrito consumido y nitrato producido durante el ciclo operacional de 8 horas.

Tiempo Ciclo SBR	min	30	120	210	300	375	435	480
N-NH₄⁺ consumido	mg N·L ⁻¹	3.60	13.05	22.56	32.20	39.91	45.81	46.70
N-NO₂⁻ consumido	mg N·L ⁻¹	5.36	18.34	30.21	43.19	53.42	61.22	61.52
N-NO₃⁻ producido	mg N·L ⁻¹	1.86	5.29	7.46	9.90	11.58	12.78	12.00

Estos datos se representaron gráficamente como los consumos experimentales de amonio y nitrito y la producción de nitrato respecto el tiempo (Figura 4.16) y se calcularon la rectas de regresión para cada compuesto, la pendiente de las cuáles era la velocidad de eliminación de amonio y nitrito y la velocidad de generación de nitrato, respectivamente.

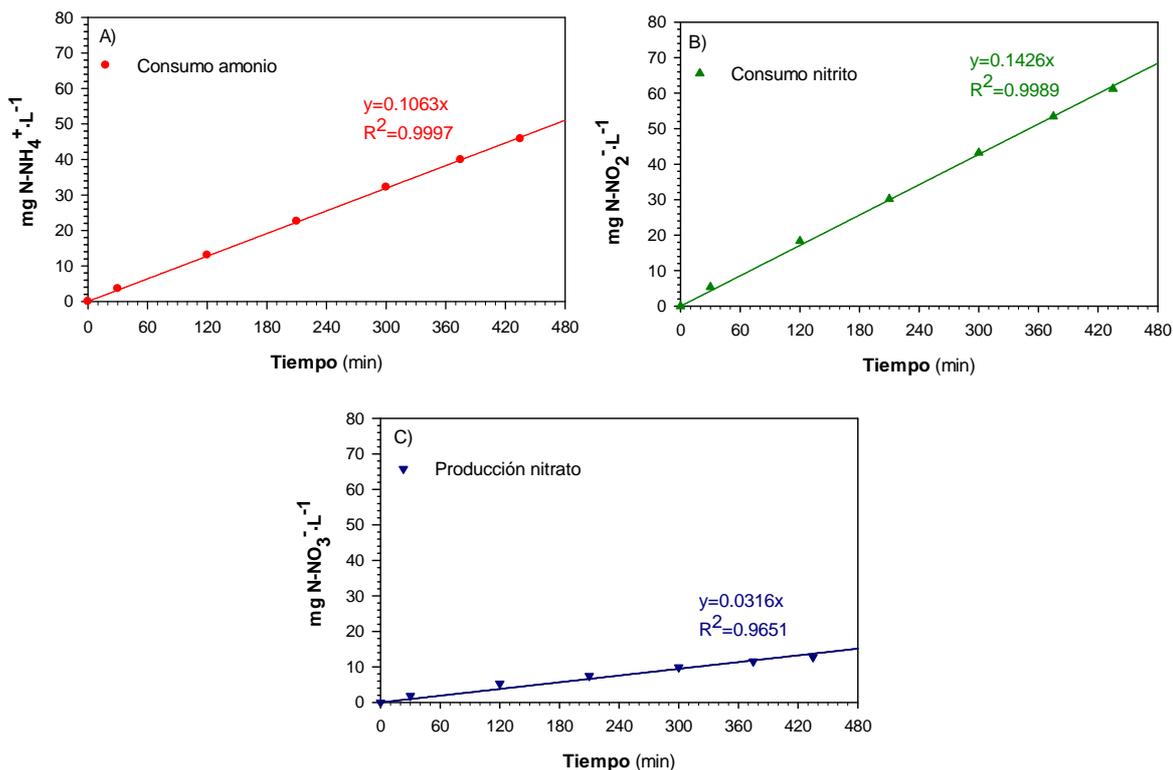


Figura 4.16 Consumo de amonio y nitrito y producción de nitrato durante el ciclo operacional de 8 horas.

A partir de esta pendiente se calculó el consumo de amonio y nitrito y la producción de nitrato por m³ de reactor y por día. Así, se obtuvo un consumo de 0.153 kg N-NH₄⁺·m⁻³·d⁻¹ y 0.205 kg N-NO₂⁻·m⁻³·d⁻¹ y una producción de 0.045 kg N-NO₃⁻·m⁻³·d⁻¹.

4.4.4 Seguimiento de la actividad anammox a partir del pH

El pH fue otro de los parámetros que se utilizó para realizar el seguimiento de la actividad de la biomasa anammox. Este seguimiento se realizó evaluando el perfil del pH y del ácido adicionado en cada ciclo del proceso. Según la estequiometría del proceso anammox, se produce un consumo de protones (H⁺) a medida que se consume el amonio y el nitrito. Este consumo de protones provoca un aumento del valor del pH en el interior del reactor. Así, para evitar la inhibición del proceso a valores de pH superiores de 8.2 se aplicó la estrategia de control basada en una doble adición automática de HCl 1M, una al inicio y otra a la mitad de la etapa de alimentación (minutos 5 y 190 del ciclo de operación).

En la Figura 4.17, se representan los perfiles característicos de la evolución del valor experimental de pH (línea discontinua) y de la cantidad de HCl adicionada (línea continua) durante un ciclo de 8 horas (perfil correspondiente al día 350 del estudio experimental).

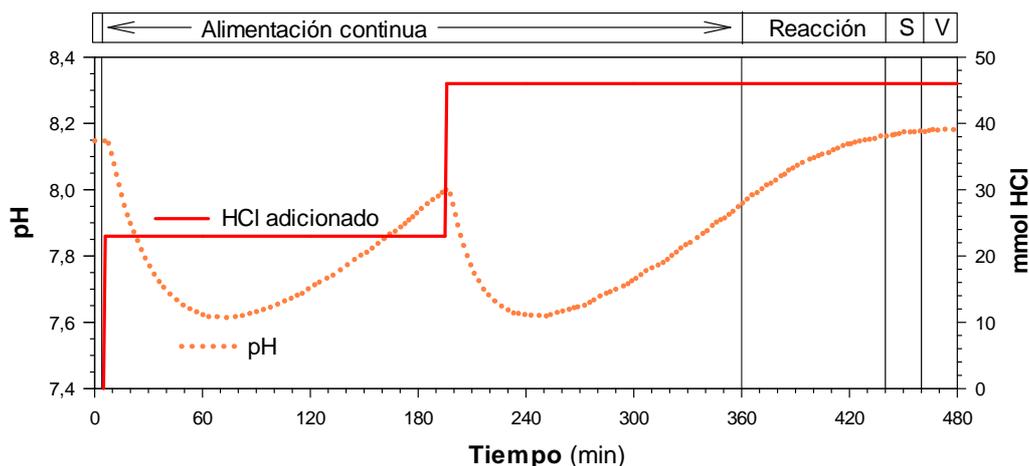


Figura 4.17 Perfil experimental de pH y de HCl adicionado durante el ciclo operacional de 8 horas.

En la figura se observa un descenso gradual del valor de pH una vez adicionado el ácido correspondiente. Este descenso paulatino se producía por la baja velocidad de agitación del sistema que impedía la rápida homogenización del ácido. Seguidamente, una vez alcanzado un pH mínimo, el consumo de protones debido a la actividad anammox provocaba un aumento progresivo del valor de pH. En la segunda adición de ácido (minuto 190) el perfil que presentaba el pH fue similar al de la primera adición. En la parte final de la etapa de reacción se observaba como el pH presentaba un aumento más lento. Esto se debía a que la actividad de la biomasa anammox era menor al haberse consumido prácticamente todo el amonio y el nitrito. Finalmente, durante las etapas de sedimentación (S) y vaciado (V) no se apreció ningún cambio en el valor de pH.

Aplicando este tipo de estrategia, el valor de pH se mantuvo entre 7.5 y 8.2. Según diversos investigadores, este es el rango óptimo de pH para llevar a cabo el proceso anammox (Egli *et al.*, 2001; Strous *et al.*, 1999b). A valores de pH superiores, la actividad de las bacterias anammox podría verse afectada, lo cuál provocaría una acumulación de nitrito y la inhibición del proceso, tal y como se observó entre los días 280 y 290 (Figura 4.6B), al alcanzarse un valor de pH superior a 8.5 (Figura 4.8).

4.4.5 Determinación de la Actividad Específica de la biomasa Anammox

Una vez concluido el estudio experimental, se realizaron diferentes ensayos con el fin de determinar la actividad específica de la biomasa anammox (AEA o SAA, acrónimo en inglés de *Specific Anammox Activity*) enriquecida en el reactor SBR. La metodología utilizada para realizar estos ensayos está descrita en el Capítulo 3 (*Materiales y Métodos*) y se basa en los ensayos desarrollados por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Santiago de Compostela (Dapena-Mora, 2007; Dapena-Mora *et al.*, 2007). En la Figura 4.18 se

representa la evolución de la presión de N_2 gas por unidad de biomasa (SSV) respecto al tiempo (minutos) en uno de los ensayos realizados.

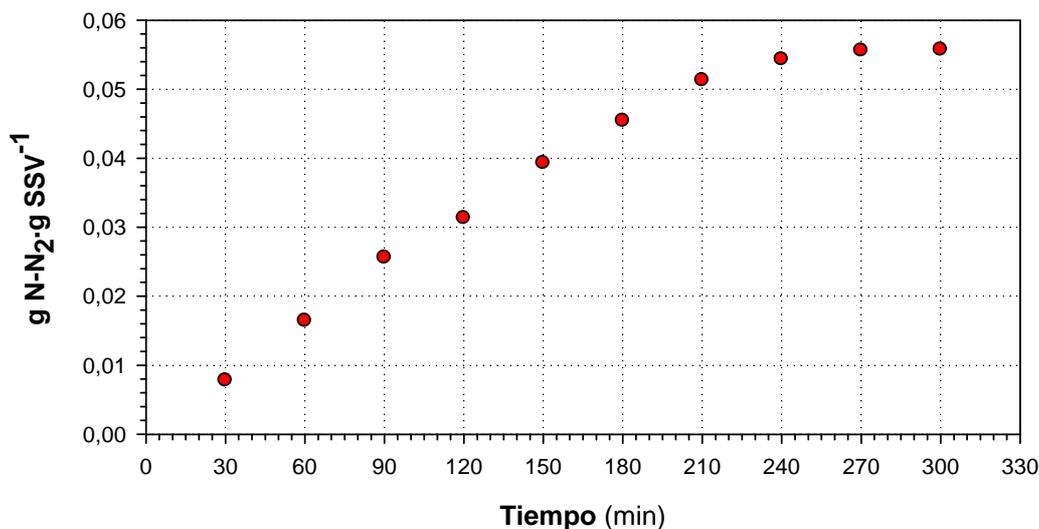


Figura 4.18 Evolución de la formación de nitrógeno gas por unidad de biomasa respecto al tiempo.

Las concentraciones iniciales de amonio y nitrito en el vial de reacción fueron de $70 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$ cada uno. En la figura se observa un incremento progresivo de la producción de N_2 gas por unidad de SSV hasta el minuto 210. A partir de ese momento, la producción de nitrógeno gas se estabiliza debido a que la actividad de la biomasa anammox se redujo, una vez eliminado todo el nitrito (sustrato limitante de la reacción anammox) presente en el vial.

La actividad específica de la biomasa anammox calculada en este ensayo fue de $0.32 \text{ g N-N}_2\cdot(\text{g SSV}\cdot\text{d})^{-1}$. Este resultado es comparable a los obtenidos por Fux *et al.* (2002), Sliemers *et al.* (2002) y Dapena-Mora *et al.* (2004c), quienes obtuvieron, en un reactor SBR, una actividad específica de 0.30, 0.25 y $0.18 \text{ g N-N}_2\cdot(\text{g SSV}\cdot\text{d})^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, otros estudios han obtenido velocidades superiores, alcanzando actividades específicas de 0.65 y $0.90 \text{ g N-N}_2\cdot(\text{g SSV}\cdot\text{d})^{-1}$ en un SBR y en un reactor *gas-lift*, respectivamente (Dapena-Mora *et al.*, 2004b).

4.5 Discusión y conclusiones

La puesta en marcha y enriquecimiento del proceso anammox se llevó a cabo en un reactor SBR. Debido a la dificultad de enriquecer la biomasa anammox se realizaron una serie de estudios previos para localizar estas bacterias en los distintos inóculos seleccionados antes de la puesta en marcha del proceso. Estos estudios se basaron en enriquecimientos en *batch* que mediante el seguimiento de los compuestos de nitrógeno y la aplicación de las técnicas

moleculares PCR y FISH permitieron detectar e identificar el crecimiento de bacterias anammox en cada uno de los inóculos seleccionados.

Así, la puesta en marcha del proceso se realizó con una mezcla de fangos activos en los que previamente se había detectado actividad anammox. Estos fangos procedían de distintas fuentes: una EDAR municipal, una planta de tratamiento de lixiviados y una planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos. La característica común en estos sistemas era la eliminación de nitrógeno a partir del proceso convencional de nitrificación-desnitrificación. Además, en los dos últimos casos, las plantas trabajaban a temperaturas elevadas (alrededor de 30°C) y las concentraciones de nitrógeno tratadas eran elevadas. Diversos investigadores también enriquecieron las bacterias anammox a partir de una mezcla de fangos activos procedentes de sistemas de tratamientos de aguas residuales urbanas e industriales (Dapena-Mora *et al.*, 2004c y Chamchoi and Nitorisavut, 2007, respectivamente).

La tecnología SBR fue el sistema utilizado para llevar a cabo el proceso por su eficiente capacidad de retención de biomasa, buena homogeneización y flexibilidad. El ciclo operacional implementado era de 8 horas con una etapa de alimentación continua de 6 horas para favorecer la eliminación completa del nitrito. Strous *et al.* (1998) y Dapena-Mora *et al.* (2006) también utilizaron una etapa de alimentación continua, aunque la duración total del ciclo de operación era de 12 y 6 horas, respectivamente. Strous *et al.* (1998) fue el primero que demostró que la tecnología SBR era adecuada para enriquecer la biomasa anammox. Posteriormente, diversos investigadores utilizaron esta tecnología para poner en marcha el proceso anammox (Jetten *et al.*, 1999; Van Dongen *et al.*, 2001; Fux *et al.*, 2003; Dapena-Mora *et al.*, 2004a, 2004b, 2004c; Third *et al.*, 2005; Trigo *et al.*, 2006, entre otros) obteniendo unos resultados satisfactorios.

La metodología para la puesta en marcha del proceso se basó en proporcionar las condiciones que favorecen el crecimiento de la biomasa anammox, principalmente manteniendo condiciones estrictamente anaerobias, estabilizando la concentración de nitrito en el interior del reactor a valores bajos y controlando principalmente, el pH y la temperatura.

La estrategia para mantener niveles bajos de nitrito se basó en controlar la relación molar nitrito:amonio en el alimento, iniciando el arranque del proceso con una relación baja para evitar su acumulación alcanzando el valor estequiométrico una vez enriquecido el reactor. El proceso se puso en marcha aplicando una relación molar nitrito:amonio inferior a la estequiométrica ($0.76 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) y una baja carga de nitrógeno ($0.02 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$). Mediante esta estrategia se minimizaba la presencia de nitrito en el reactor, compuesto tóxico para las bacterias anammox. Una vez puesto en marcha el proceso, la relación molar nitrito:amonio se

aumentó hasta alcanzar la relación estequiométrica ($1.32 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) a la vez que se aumentaba la carga de nitrógeno aplicada consiguiendo operar con una carga de $1.60 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$.

Las condiciones anaerobias en el interior del reactor se mantuvieron mediante la adición de N_2 gas, así como utilizando todas las conducciones y conexiones de material impermeable al aire (*norprene*). Aunque la inyección de nitrógeno es la forma más económica y extendida de mantener las condiciones anaerobias, algunos autores proponen la adición de una mezcla de gases, 95% de argón (Ar) y un 5% de CO_2 (Dapena-Mora *et al.*, 2004c; Chamchoi and Nitisoravut, 2007; Kartal *et al.*, 2007b; Van der Star *et al.*, 2008), muy adecuada en el caso de que pueda haber limitación del crecimiento de la biomasa anammox por falta de carbono inorgánico en el medio.

La agitación es otro parámetro a tener en cuenta. Durante todo el estudio se mantuvo una agitación lenta (100 rpm) para evitar la ruptura de la biomasa granular anammox, lo que podría provocar su pérdida por el efluente. En este sentido, Arrojo *et al.* (2006) determinaron una disminución de la actividad de la biomasa anammox a velocidades de agitación superiores a 250 rpm. Además, una agitación lenta también evitaba la posible difusión de oxígeno en el interior del reactor.

Otra medida importante a tener en cuenta durante la puesta en marcha del proceso, es la adición en el afluente de una cantidad de nitrato para evitar que en caso de entrada de materia orgánica biodegradable se produzca la reducción del sulfato a ácido sulfhídrico, compuesto tóxico para las bacterias anammox. Una vez puesto en marcha y estabilizado el proceso este nitrato no era necesario al ser producido por la propia biomasa anammox. Otros autores utilizan esta misma estrategia para evitar la actividad de las bacterias sulfato-reductoras (Dapena-Mora *et al.*, 2004c y Kartal *et al.*, 2007b).

Los cambios de pH son importantes cuando se trabaja a elevadas concentraciones de nitrógeno. Aunque algunos investigadores operan sin control de pH (Dapena-Mora *et al.*, 2006; Kartal *et al.*, 2007b; Van der Star *et al.*, 2008), se diseñó un sistema de control basado en una doble adición de ácido durante la fase de alimentación de cada ciclo lo que permitía mantener el valor de pH entre 7.5 y 8.2 (Jetten *et al.*, 1999; Egli *et al.*, 2001).

Por otro lado, la temperatura de operación durante todo el estudio se mantuvo a $36.0\pm 0.3^\circ\text{C}$. La mayoría de estudios realizados con biomasa anammox trabajan a temperaturas similares (Ahn and Kim, 2004; Dapena-Mora *et al.*, 2004c; Hwang *et al.*, 2005; Isaka *et al.*, 2007; Third *et al.*, 2005; Trigo *et al.*, 2006, entre otros).

En lo que concierne a los resultados obtenidos durante la puesta en marcha y enriquecimiento del proceso anammox, cabe destacar que a los 60 días de inocular el reactor se apreció un consumo de amonio y nitrito. Así, para corroborar la posible actividad anammox, se realizó el análisis de la biomasa presente en el reactor mediante la técnica molecular PCR, que identificó a la especie anammox como *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Sin embargo, la técnica molecular FISH no detectó la presencia de bacterias anammox debido posiblemente, a la insuficiente cantidad de biomasa anammox en la muestra examinada. Dapena-Mora *et al.* (2004c) también detectaron actividad anammox al cabo de 60 días de operar un SBR que se inoculó con una mezcla de fangos procedentes de tres EDARs diferentes. En cambio, Third *et al.* (2005) y Chamchoi and Nitisoravut (2007) tardaron 105 y 120 días respectivamente, en detectar actividad anammox.

Una vez detectada la actividad anammox se incrementó progresivamente la carga de nitrógeno aplicada hasta $0.25 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ durante el período de enriquecimiento a baja carga (Período 2) y hasta $1.60 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ durante el enriquecimiento de la biomasa anammox a alta carga (Período 3). Al mismo tiempo, se incrementó la relación molar nitrito:amonio del afluente a $1.0 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ en el segundo período y al valor estequiométrico durante el tercer período ($1.32 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). Así, operando con la relación estequiométrica se obtuvieron porcentajes de eliminación de amonio y nitrito superiores al 99%. Sin embargo, Dapena-Mora *et al.* (2004b) trabajaron con una relación molar inferior a la estequiométrica (1.0 mol de nitrito por mol de amonio), lo que permitió eliminar completamente el nitrito pero obtener únicamente, un porcentaje de eliminación de nitrógeno total del 78%.

Durante el tercer período del enriquecimiento de las bacterias anammox se produjo la inhibición del proceso por la acumulación de nitrito, llegándose a obtener concentraciones superiores a $300 \text{ mg N-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$. Diversos investigadores experimentaron una pérdida completa de la actividad anammox a concentraciones superiores a $100 \text{ mg N-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$ (Schmidt *et al.*, 2003; Jetten *et al.*, 2005a; Dapena-Mora *et al.*, 2006). Para restablecer el proceso anammox se disminuyó la carga de nitrógeno aplicada hasta que la concentración de nitrito era inferior a $15 \text{ mg N-NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$.

Por otro lado, durante la puesta en marcha del proceso se emplearon una serie de técnicas para verificar la actividad de la biomasa anammox. A partir de las técnicas moleculares PCR y FISH se detectó e identificó a las bacterias anammox en los tres períodos de estudio. Mientras que la técnica PCR identificó a la especie anammox como *Ca. Brocadia anammoxidans*, las microfotografías generadas a partir de la técnica FISH, permitieron calcular el porcentaje de bacterias anammox respecto a la biomasa total (*Eubacteria*). Este porcentaje fue del $85.0\pm 1.8\%$

después de un año de operación. Kartal *et al.* (2007b) también obtuvieron un resultado similar (80%) durante el enriquecimiento de la especie *Ca. Anammoxoglobus propionicus*. Además, Van der Star *et al.* (2007) alcanzaron un enriquecimiento entre un 50 y un 60% de bacterias anammox (*Ca. Brocadia anammoxidans*) en el reactor *full-scale* de Rotterdam.

El seguimiento de las relaciones estequiométricas entre el nitrito y el amonio eliminados ($1.32 \pm 0.05 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) y entre el nitrato producido y el amonio eliminado ($0.23 \pm 0.05 \text{ mol} \cdot \text{mol}^{-1}$) corroboraron el buen funcionamiento del proceso al ser prácticamente iguales que los valores teóricos propuestos por Strous *et al.* (1998) (1.32 y 0.26, respectivamente). Por consiguiente, se puede afirmar que la eliminación de nitrógeno en el sistema SBR se realizó únicamente a través del proceso anammox. Así, la metodología de enriquecimiento propuesta en este estudio permitió obtener un cultivo altamente enriquecido con biomasa anammox (85%).

Dapena-Mora *et al.* (2004b) obtuvieron unas relaciones estequiométricas de 1.28 moles de nitrito eliminado por mol de amonio eliminado y de 0.26 moles de nitrato producido por mol de amonio eliminado en un reactor gas-lift y de 1.11 moles de nitrito eliminado por mol de amonio eliminado y de 0.20 moles de nitrato producido por mol de amonio eliminado en un reactor SBR. Trigo *et al.* (2006) obtuvieron unas relaciones estequiométricas de 1.22 moles de nitrito eliminado por mol de amonio eliminado y de 0.22 moles de nitrato producido por mol de amonio eliminado en un reactor SBR de membranas.

CAPÍTULO 5

APLICACIÓN DEL PROCESO ANAMMOX PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS

5. APLICACIÓN DEL PROCESO ANAMMOX PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS

Los lixiviados de vertedero se caracterizan por sus elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal y de sales, mientras que la concentración de materia orgánica biodegradable es baja. Fux and Siegrist (2004) sugieren que el proceso anammox puede ser una alternativa medioambiental y económicamente viable para el tratamiento de estos lixiviados, en comparación con el proceso convencional de nitrificación-desnitrificación.

En este capítulo se presenta la aplicación del proceso anammox para el tratamiento de lixiviados procedentes de un vertedero urbano previamente acondicionados mediante el proceso de nitrificación parcial (Ganigué *et al.*, 2007). El estudio de la aplicación del proceso anammox para el tratamiento de lixiviados de vertedero se llevó a cabo durante siete meses en un fermentador de vidrio encamisado (*BIOSTAT® B-PLUS, Sartorius*) de 2L de capacidad máxima. Igual que en el estudio de la puesta en marcha del proceso anammox se utilizó la tecnología SBR y se operó con el mismo ciclo de operación de 8 horas (Figura 3.4, *Materiales y Métodos*). El TRH fue de 1.9 días durante todo el estudio con una relación de cambio por ciclo de 0.18.

El fermentador estaba equipado con un sistema de monitorización y control que permitía el seguimiento en línea del pH, la temperatura, el oxígeno disuelto y el potencial redox mediante la adquisición de los datos de las respectivas sondas. La temperatura, controlada mediante un baño termostático de agua, se mantenía a $36.0^{\circ}\text{C}\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ y el pH a 7.50 ± 0.05 unidades mediante la adición de ácido clorhídrico a través de un controlador PID (Proporcional Integral Derivativo).

El fermentador de 2L se inoculó con 0.5 L de biomasa granular anammox procedente del reactor de 20L utilizado para enriquecer la biomasa anammox (*Apartado 4.3*). Una vez inoculado, la concentración inicial de sólidos en suspensión totales y sólidos en suspensión volátiles en el interior del fermentador fue de 0.8 y 0.6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. El estudio del tratamiento de los lixiviados mediante el proceso anammox se realizó en dos períodos: *Estabilización del proceso anammox* (Período 1) y *Aplicación de lixiviados* (Período 2).

Una vez inoculado, el fermentador de 2L se alimentó con un afluente sintético (Período 1) para adaptar y estabilizar la biomasa anammox. Posteriormente, se alimentó con lixiviado previamente tratado por el proceso de nitrificación parcial (Período 2). En la Figura 5.1 se presenta la evolución de la carga de nitrógeno aplicada (amonio + nitrito) en kg N por m^3 de reactor y por día durante todo el estudio.

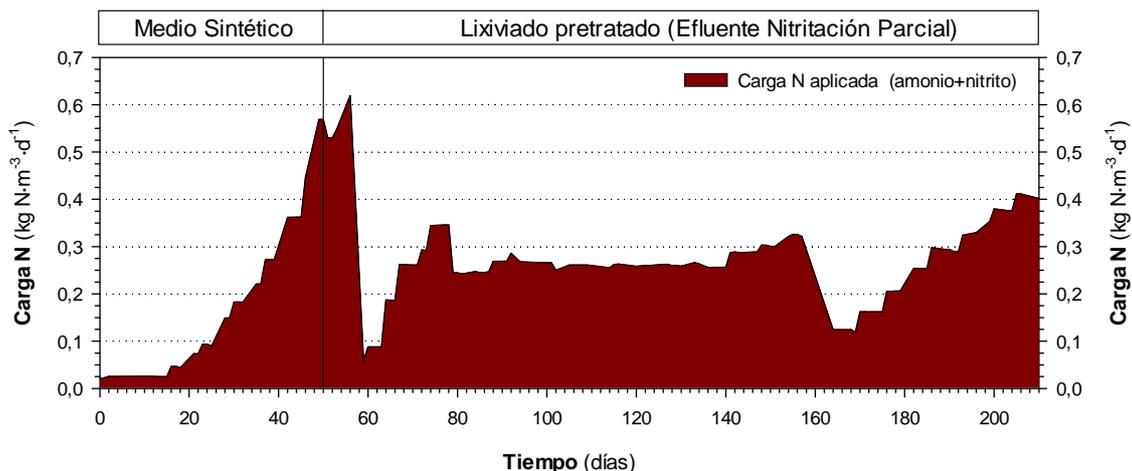


Figura 5.1 Evolución de la carga de nitrógeno aplicada durante todo el estudio (días 0-210).

A partir de la experiencia obtenida durante la puesta en marcha del reactor de 20L, la carga de nitrógeno aplicada durante el tratamiento del afluente sintético se incrementó progresivamente (desde 0.02 a 0.57 kg N·m⁻³·d⁻¹) para evitar la acumulación de nitrito en el interior del fermentador (Figura 5.1). Una vez estabilizado el proceso anammox, la aplicación del lixiviado tratado permitió tratar una carga entre 0.06 y 0.61 kg N·m⁻³·d⁻¹ (Tabla 5.3; Figura 5.1). A continuación se explican los dos períodos en los que se dividió el estudio del tratamiento de lixiviados por el proceso anammox.

5.1 Estabilización del proceso anammox con medio sintético

Durante este período, el fermentador de 2L se alimentó con un afluente sintético para estabilizar la biomasa anammox. En la Tabla 5.1 se presenta el rango de concentraciones de los compuestos de nitrógeno y la cantidad de bicarbonato, fósforo y micronutrientes.

Tabla 5.1 Composición del afluente sintético durante el Período 1.

Compuestos de N		Compuesto	Cantidad	Unidades
NH₄⁺ afluente (mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹)	27.0-455.0	NaHCO ₃	1.05	g·L ⁻¹
		KH ₂ PO ₄	0.00625	g·L ⁻¹
NO₂⁻ afluente (mg N-NO ₂ ⁻ ·L ⁻¹)	17.2-602.4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.3	g·L ⁻¹
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g·L ⁻¹
NO₃⁻ afluente (mg N-NO ₃ ⁻ ·L ⁻¹)	27.8-0	EDTA·2H ₂ O	0.0125	g·L ⁻¹
		HCl	1.25	mL·L ⁻¹
NO₂⁻:NH₄⁺ afluente (mol·mol ⁻¹)	1.32	Elementos traza *	1.25	mL·L ⁻¹

* Van de Graaf *et al.* (1996)

Se ha de matizar que durante los primeros días del estudio (días 0-11), la relación molar nitrato:amonio aplicada era de 0.8 moles de NO_2^- por mol de NH_4^+ para minimizar la inhibición del proceso por acumulación de nitrato. A partir del día 12, el fermentador se alimentó con la relación molar estequiométrica (1.32 moles N-NO_2^- :mol N-NH_4^+ , Strous *et al.*, 1998).

Del mismo modo que durante la puesta en marcha del proceso anammox (Apartado 4.3), se añadió nitrato en el afluente para evitar la formación de ácido sulfhídrico (H_2S), compuesto tóxico para las bacterias anammox (Tabla 5.1). La evolución de los compuestos nitrogenados durante los primeros 50 días de estudio se presenta en la Figura 5.2.

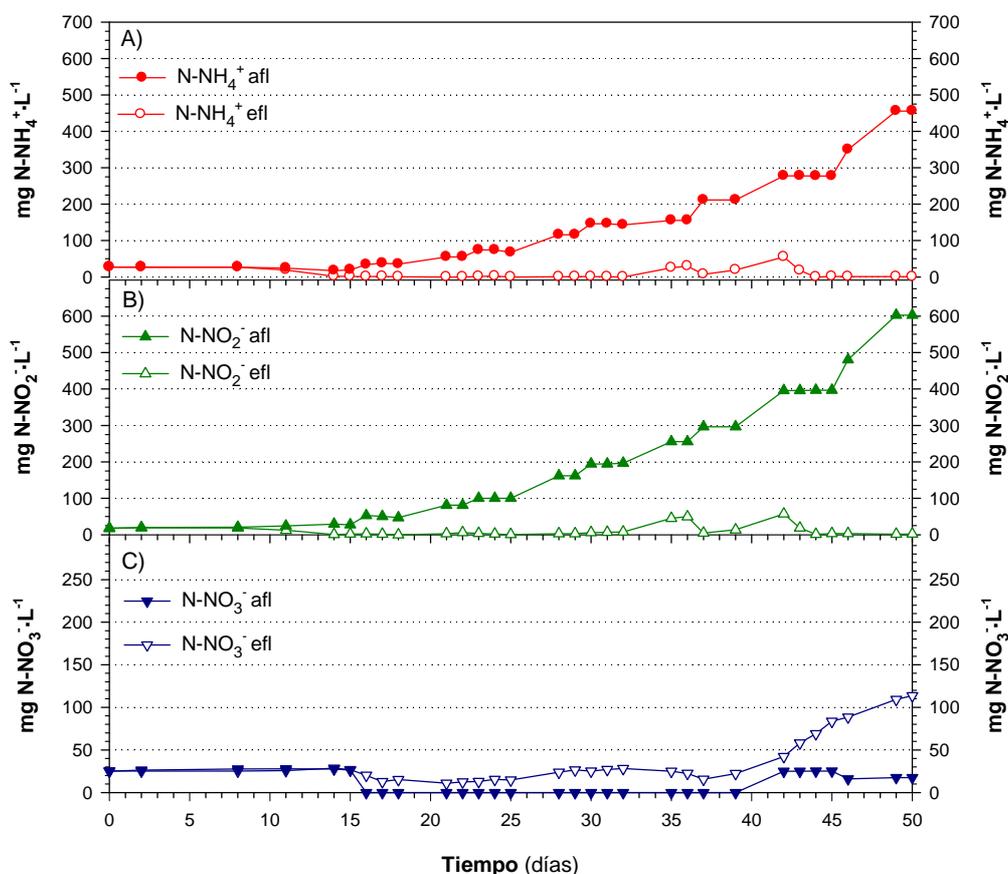


Figura 5.2 Evolución de los compuestos nitrogenados en el fermentador anammox (días 0-50).

Las concentraciones de amonio y nitrito en el afluente (Figuras 5.2A y 5.2B) se aumentaban cuando la concentración de nitrito en el efluente era inferior a $15 \text{ mg N} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 5.2B). Durante los primeros 10 días de estudio no se observó un consumo de amonio ni de nitrito. Sin embargo, a partir del día 15 empezó a apreciarse un consumo de amonio y nitrito, aumentándose progresivamente las concentraciones de estos dos compuestos en el medio sintético (Figuras 5.2A y 5.2B). El porcentaje de eliminación de amonio y nitrito durante estos 50 días fue del 94.5 y 95.1%, respectivamente. Al mismo tiempo, entre los días 16 y 39 no se añadió nitrato en el medio sintético al generarse mediante el proceso anammox (Ecuación 1.8). Sin embargo, no

se observó un aumento importante de nitrato en el efluente hasta el día 42 (Figura 5.2C), día que volvió a añadirse al medio sintético por precaución, evitando la acción de las bacterias sulfato-reductoras.

5.2 Aplicación de lixiviados al proceso anammox

Una vez estabilizado el proceso anammox, el fermentador se alimentó con lixiviado crudo, previa nitrificación parcial (Ganigué *et al.*, 2007). En la Tabla 5.2 se presenta la composición media de los compuestos orgánicos y nitrogenados del lixiviado crudo que procedía de un vertedero de residuos sólidos urbanos.

Tabla 5.2 Composición media del lixiviado crudo tratado por el proceso de nitrificación parcial (Ganigué *et al.*, 2007)

Compuestos	Unidades	Lixiviado crudo	
		Rango	Mediana $\pm\sigma$
NH_4^+	mg N- $\text{NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$	1150-3012	1723 \pm 424
NO_2^-	mg N- $\text{NO}_2^-\cdot\text{L}^{-1}$	0-18	3.6 \pm 6.6
NO_3^-	mg N- $\text{NO}_3^-\cdot\text{L}^{-1}$	0-65	9.5 \pm 21
DQO	mg $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$	3200-6100	4512 \pm 649
DBO₅	mg $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$	136-1059	558 \pm 257

Este lixiviado crudo contenía elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal (1150-3000 mg N- $\text{NH}_4^+\cdot\text{L}^{-1}$) y de materia orgánica, con un valor medio de DQO (Demanda Química de Oxígeno) de 4512 mg $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, aunque únicamente un 12% era biodegradable, presentando una media de DBO₅ (Demanda Biológica de Oxígeno) de 558 mg $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ (Ganigué *et al.*, 2007).

Una vez el lixiviado crudo era tratado mediante el proceso de nitrificación parcial, se obtenía un efluente con un porcentaje de conversión entre el 40-60% del nitrógeno amoniacal y una baja concentración de materia orgánica biodegradable (DBO₅=45-290 mg $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$). Este lixiviado tratado se diluía con agua destilada para evitar un choque de carga debido a las elevadas concentraciones de amonio y nitrito (>1 g N $\cdot\text{L}^{-1}$). Además, se corregía la relación molar nitrito:amonio de este lixiviado (0.93) mediante la adición de NaNO_2 para ajustarla a la relación estequiométrica (1.32) según las necesidades experimentales. En la Tabla 5.3 se presenta la composición del lixiviado pretratado, diluido y ajustado que se utilizó para operar el fermentador anammox.

Tabla 5.3 Características del lixiviado pretratado utilizado en el fermentador anammox.

	Unidades	Lixiviado pretratado*
NH₄⁺ afluente	mg N-NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹	46.0-508.6
NO₂⁻ afluente	mg N-NO ₂ ⁻ ·L ⁻¹	64.3-642.7
NO₃⁻ afluente	mg N-NO ₃ ⁻ ·L ⁻¹	0-57.3
NO₂⁻:NH₄⁺ afluente	mol NO ₂ ⁻ ·mol ⁻¹ NH ₄ ⁺	1.30
Carga N aplicada	kg N·m ⁻³ ·d ⁻¹	0.06-0.61
DQO afluente	mg O ₂ ·L ⁻¹	125-1062
DBO₅ afluente	mg O ₂ ·L ⁻¹	10-90
COT afluente	mg C·L ⁻¹	66-300

* Lixiviado pretratado mediante nitrificación parcial, diluido y ajustado para ser aplicado al proceso anammox.

La relación molar media de nitrito:amonio del lixiviado procedente de la nitrificación parcial, una vez diluido y ajustado era de 1.30 moles de NO₂⁻ por mol de NH₄⁺. Igual que en el primer período, también se añadía nitrato en el afluente. Además, el lixiviado tratado por el proceso de nitrificación parcial contenía una baja concentración de carbono inorgánico al ser consumido por las bacterias nitrificantes autotróficas durante el proceso de nitrificación parcial. En este sentido, se añadía NaHCO₃ al afluente para evitar la limitación del crecimiento de las bacterias anammox por falta de carbono inorgánico. Por otro lado, el lixiviado tratado y diluido contenía materia orgánica con una pequeña fracción biodegradable (DBO₅=10-90 mg O₂·L⁻¹; Tabla 5.3). El carbono orgánico total en el afluente osciló entre 66 y 300 mg C·L⁻¹.

Cabe señalar que antes de iniciarse el estudio del proceso anammox con lixiviados de vertedero se realizaron una serie de ensayos para determinar la actividad específica de la biomasa anammox al aplicarse la matriz de los lixiviados y comprobar si la composición del lixiviado podía inhibir a las bacterias anammox. Primeramente, se realizó el ensayo sin lixiviado, es decir, con el medio sintético utilizado en el primer período. Posteriormente, se realizaron los ensayos con un 50% de lixiviado y un 100% de lixiviado. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con las mismas condiciones que los ensayos realizados durante el enriquecimiento de las bacterias anammox (70 mg N·L⁻¹ de amonio y nitrito, respectivamente, 35°C, una velocidad de agitación de 150 rpm y con 30 minutos de aclimatación).

La actividad específica obtenida para la muestra sin lixiviado fue de 0.32 g N-N₂·(g SSV·d)⁻¹. Los resultados obtenidos para las muestras con un 50 y un 100% de lixiviados fueron de 0.37 y 0.29 g N-N₂·(g SSV·d)⁻¹, respectivamente. Estos resultados demostraron que la matriz de los lixiviados no disminuía la actividad de la biomasa anammox durante los ensayos en *batch*

realizados. Así, a partir del día 51 se alimentó el fermentador con lixiviado tratado y diluido manteniendo la misma carga de nitrógeno que en el período de estabilización (*Apartado 5.1*).

La evolución de las concentraciones de los compuestos de nitrógeno en el afluente y efluente durante la aplicación del lixiviado pretratado se presentan en la Figura 5.3. Inicialmente, el fermentador se alimentó con una carga de nitrógeno (amonio+nitrito) de $0.53 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, manteniéndose la misma carga que con el afluente sintético (Figura 5.1). Sin embargo, rápidamente se disminuyó debido a la acumulación de nitrito y amonio (Figuras 5.3A y 5.3B).

Durante la primera semana del tratamiento con lixiviado (días 51-57) se dejó de añadir nitrato en el alimento por la elevada concentración de éste en el fermentador, llegándose a obtener un valor de $113.7 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ (Figura 5.3C). Sin embargo, a partir del día 58 y hasta la finalización del estudio se volvió a añadir nitrato al afluente ($50 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$, aproximadamente) para evitar una posible reducción de sulfato a ácido sulfhídrico por parte de las bacterias sulfato-reductoras.

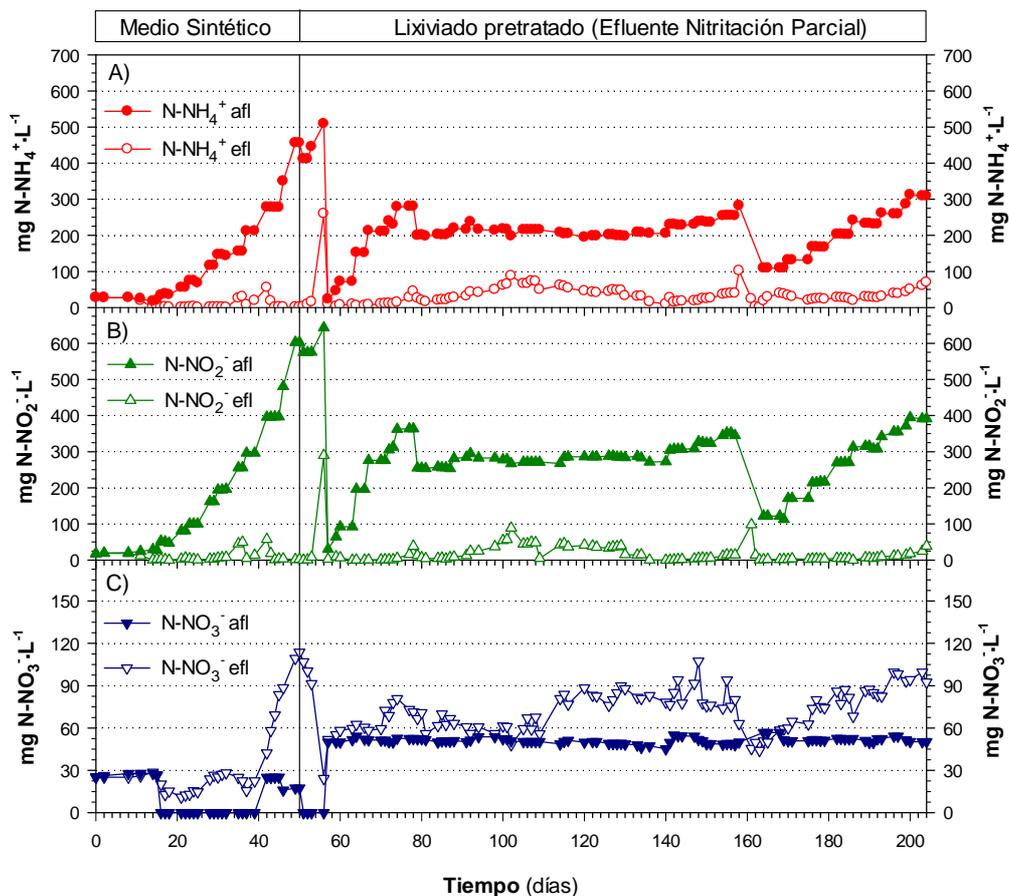


Figura 5.3 Evolución de los compuestos nitrogenados en el fermentador anammox (días 0-210).

A partir del día 59 se incrementaron progresivamente las concentraciones de amonio y nitrito (Figuras 5.3A y 5.3B), aumentando la carga de N aplicada hasta $0.35 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (Figura 5.1, día 74). Entre los días 79 y 157 el proceso se mantuvo estable, manteniendo una carga de N media de $0.28 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ (Figura 5.1). Hasta este día el porcentaje de eliminación de amonio y nitrito fue del 82 y 92 %, respectivamente. Sin embargo, el día 158 se redujo la carga de N aplicada debido al aumento de las concentraciones de amonio y nitrito y a la disminución de la concentración de nitrato en el efluente (Figura 5.3). Una vez la concentración de nitrito en el efluente fue inferior a $15 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$, la carga de N se aumentó hasta tratar $0.41 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ al finalizar el estudio (Figura 5.1). Los porcentajes de eliminación de amonio y nitrito durante el periodo de aplicación del lixiviado tratado fueron del 79.8 y 87.3%, respectivamente.

Por otro lado, en este periodo se analizó la evolución de los compuestos orgánicos presentes en el lixiviado tratado. En este sentido, en la Figura 5.4 se presenta la evolución del carbono orgánico total (COT) y de la materia orgánica expresada como demanda química de oxígeno (DQO).

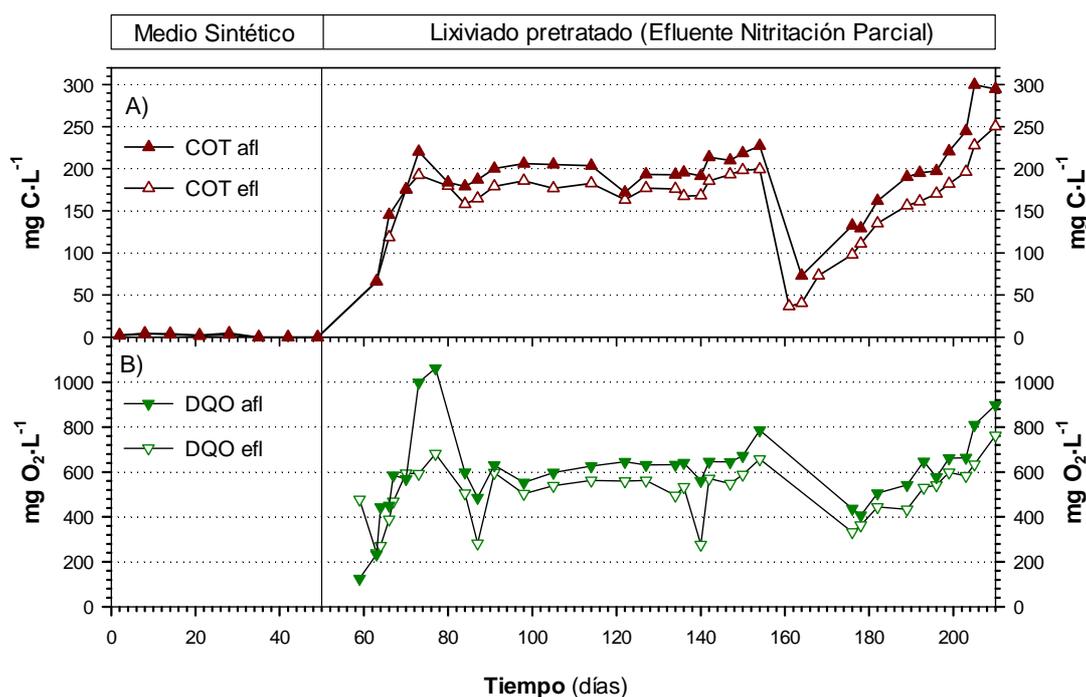


Figura 5.4 Evolución de los compuestos orgánicos en el fermentador anammox (días 0-210).

El lixiviado pretratado contenía, principalmente, materia orgánica no biodegradable ($\text{DQO}=125\text{-}1062 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$; Tabla 5.3). Sin embargo, una pequeña fracción de esta materia orgánica era biodegradable ($\text{DBO}_5=10\text{-}90 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$; Tabla 5.3). Además, se analizó el carbono orgánico total (COT), obteniéndose un rango entre 66 y $300 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$. Cabe resaltar que durante el Periodo 1 (alimento sintético) la concentración de COT en el afluente era prácticamente nula (Figura 5.4A). La media del porcentaje de eliminación de COT y de DQO durante el Período 2

fue de un 15.9 y un 16.8%, respectivamente. El consumo de materia orgánica fue relativamente pequeño debido a que la fracción biodegradable era baja.

La eliminación de esta materia orgánica biodegradable puede ser debida a la presencia de bacterias desnitrificantes heterotróficas en el interior del fermentador, coexistiendo así, con la biomasa anammox. Así, tanto el nitrito como el nitrato podían ser consumidos por las bacterias desnitrificantes.

Por otro lado, durante el período de aplicación de los lixiviados se realizó la detección e identificación de la biomasa presente en el fermentador. A partir de la técnica molecular PCR se identificó a la especie anammox como *Ca. Brocadia anammoxidans* (GenBank: *accession number* AB054006), la misma especie que la enriquecida en el reactor de 20L. Sin embargo, en la parte final del estudio también se identificó a la especie *Ca. Kuenenia stuttgartiensis* (GenBank: *accession number* AF375995), convirtiéndose ésta última en la especie mayoritaria. Además, mediante la técnica molecular FISH también se detectó a las bacterias anammox pero debido a que la sonda utilizada (Amx820) tanto hibridaba a la especie *Brocadia* como a la especie *Kuenenia*, no fue posible distinguir entre las dos poblaciones. En la Figura 5.5 se presenta la imagen FISH obtenida al finalizar el estudio (día 210) la cuál se realizó con el microscopio de rastreo láser confocal (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscope*).

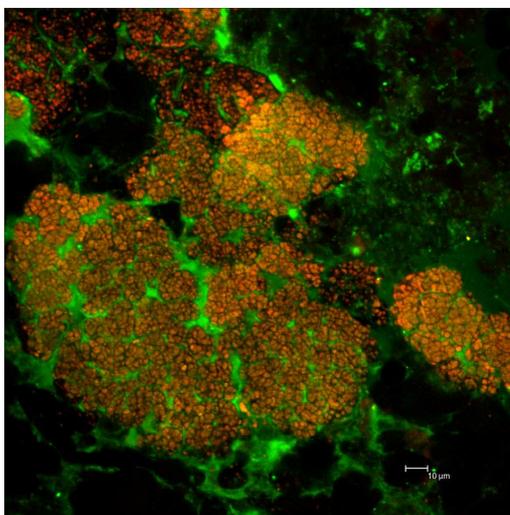


Figura 5.5 Microfotografía FISH generada con la sonda Amx820-Cy3 respecto al total de bacterias (Eubacteria, Eub338-(I-II-III)) el día 210 de estudio. Escala: 25 μ m

Además, también se realizó el análisis de la biomasa anammox a través del Microscopio binocular *Zeiss STEREO Discovery V12 Cámara Nikon Coolpix-4500* generando las fotografías presentadas en la Figura 5.6. En estas fotografías se observa el efecto de la materia orgánica sobre las bacterias anammox que favorecía la aparición y crecimiento de bacterias filamentosas en la superficie de los gránulos anammox (Figuras 5.6A y 5.6B).

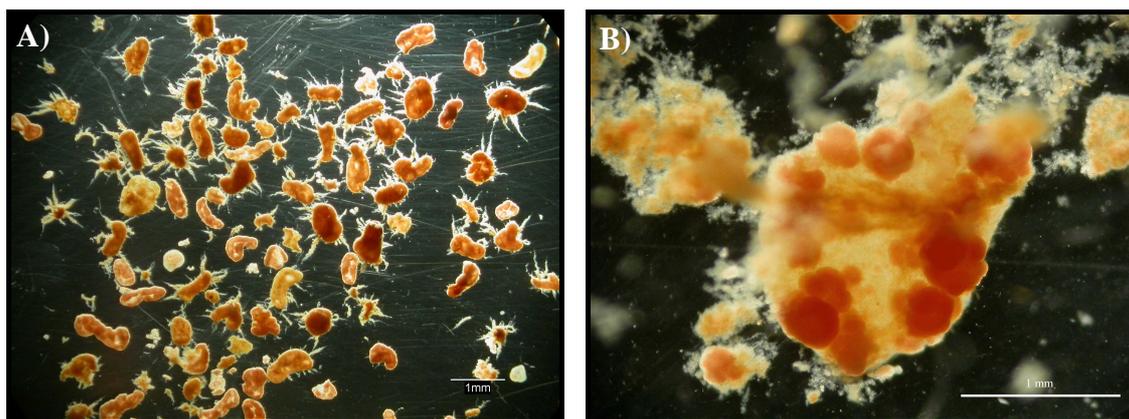


Figura 5.6 Fotografías de la biomasa granular anammox realizada durante el tratamiento de lixiviados. Escala: 1 mm.

En la Figura 5.6B se observa la disposición de la biomasa granular anammox junto con las bacterias filamentosas, las cuales envolvían a estos gránulos formando una única estructura.

5.3 Evaluación de los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica

Para corroborar la coexistencia de los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica en el fermentador se llevó a cabo el seguimiento de la evolución de las relaciones estequiométricas entre el nitrito y el amonio consumidos y entre el nitrato producido y el amonio eliminado (Figura 5.7). El seguimiento de estas relaciones se utilizó como herramienta de evaluación del proceso anammox, al comparar los resultados obtenidos con las relaciones teóricas según la estequiometría de la reacción (Ecuación 1.8).

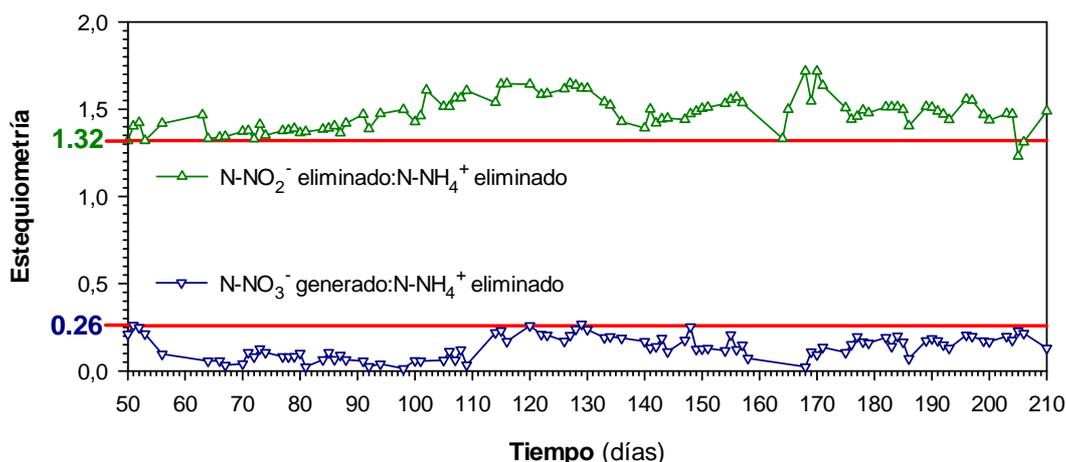


Figura 5.7 Relaciones estequiométricas $\text{NH}_4^+:\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^-$ en el fermentador anammox (días 50-210).

La relación media obtenida durante el tratamiento del lixiviado de vertedero (50-210 días) fue de 1.47 ± 0.12 moles de NO_2^- eliminados por mol de NH_4^+ eliminado y de 0.12 ± 0.06 moles de NO_3^- producidos por mol de NH_4^+ eliminado. Estas relaciones estequiométricas (1.47 y 0.12)

eran muy diferentes a los valores teóricos obtenidos por Strous *et al.* (1998) (1.32 y 0.26). Esto indicaba que, por un lado, se producía un consumo de nitrito más elevado del esperado ya que los moles de nitrito eliminados por mol de amonio eliminado eran superiores al valor de 1.32 durante todo el estudio. Por otro lado, la generación de nitrato era inferior a la esperada por el proceso anammox (0.26 moles de NO_3^- por mol de NH_4^+ eliminado). A partir de estos resultados se concluyó que, además del proceso anammox, otro proceso se estaba llevando a cabo en el fermentador anammox, provocando una competencia entre ellos.

Para evaluar esta hipótesis, en primer lugar se comparó la concentración teórica de nitrato obtenida teniendo en cuenta que únicamente tuviera lugar el proceso anammox, con la concentración de nitrato obtenida experimentalmente (Figura 5.8). La concentración teórica se calculó a partir del amonio consumido teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción, 0.26 moles de nitrato teóricos producidos por mol de amonio eliminado (Ecuación 1.8).

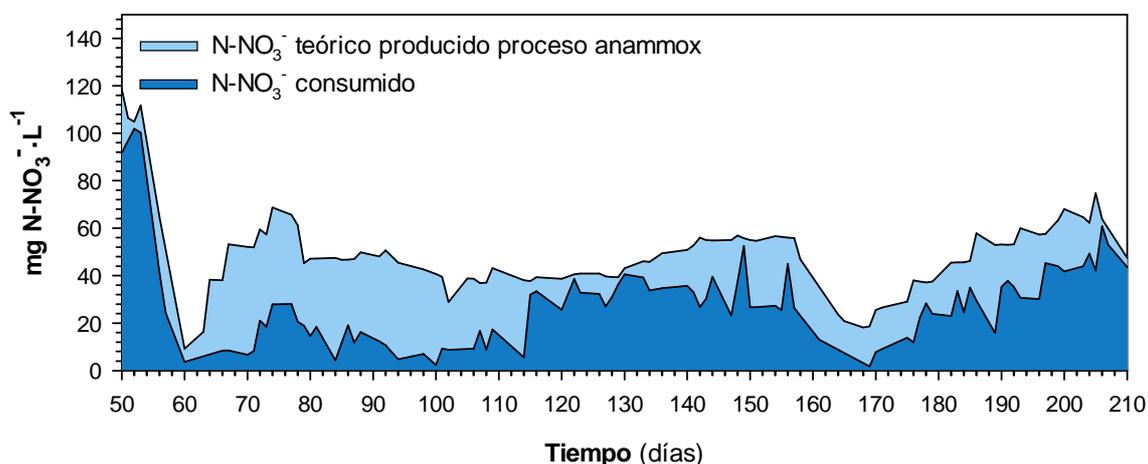


Figura 5.8 Evolución de la concentración teórica y experimental de nitrato en el fermentador anammox (días 50-210)

En la figura se observa que el nitrato obtenido experimentalmente era menor que el esperado, con lo que se concluyó que una parte del nitrato producido por el proceso anammox podía haber sido consumido por las bacterias desnitrificantes heterotróficas debido a la presencia de materia orgánica biodegradable. La diferencia entre el nitrato teórico y el experimental corresponde al nitrato consumido por estas bacterias. Este consumo es beneficioso al reducirse la concentración neta de nitrato en el efluente.

En segundo lugar, se comparó la concentración teórica de nitrito eliminada a través del proceso anammox con la concentración de nitrito obtenida experimentalmente (Figura 5.9). La concentración teórica de nitrito se calculó a partir del amonio consumido teniendo en cuenta la estequiometría de la reacción, 1.32 moles de nitrito teóricos eliminados por mol de amonio eliminado (Ecuación 1.8).

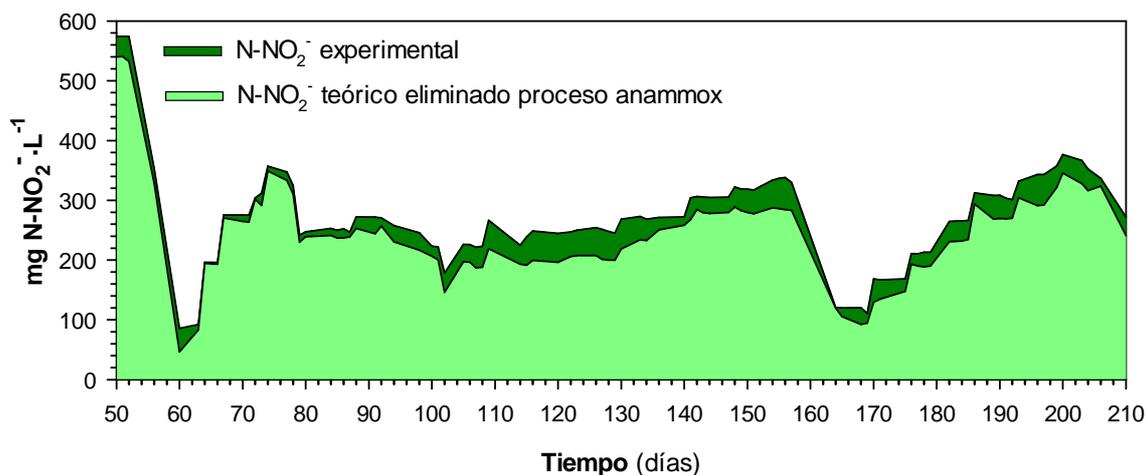


Figura 5.9 Evolución de la concentración teórica y experimental de nitrato en el fermentador anammox (días 50-210).

Como se puede observar en esta figura, el nitrato eliminado experimentalmente era más elevado que el eliminado por el proceso anammox debido a que parte del nitrato presente en el afluente era consumido por las bacterias desnitrificantes heterotróficas en presencia de materia orgánica biodegradable. Este consumo de nitrato por parte de estas bacterias podía disminuir la relación molar nitrato:amonio en el afluente provocando la acumulación de amonio en el fermentador anammox.

Para evaluar el proceso anammox y corroborar la coexistencia con el proceso de desnitrificación heterotrófica se realizó el seguimiento del pH y de la cantidad de ácido clorhídrico adicionado por cada ciclo de operación. Según la Ecuación 1.8 (Strous *et al.*, 1998), se producía un aumento del pH en el interior del reactor que podía disminuir la actividad de las bacterias anammox si se superaba el valor de 8.2 (Egli *et al.*, 2001).

En el fermentador anammox se aplicó un control de pH mediante un controlador PID (Proporcional-Integral-Derivativo) que mantenía el pH alrededor de 7.5 unidades. Este control se realizaba mediante la adición de ácido clorhídrico 1M durante las etapas de alimentación continua y reacción del ciclo operacional de 8h (Figura 3.4; *Materiales y Métodos*).

En la Figura 5.10, se presentan los perfiles de la evolución del valor de pH experimental (línea discontinua) y de la cantidad de HCl adicionado (línea continua) por volumen total de reactor (mmol HCl) durante un ciclo de 8 horas.

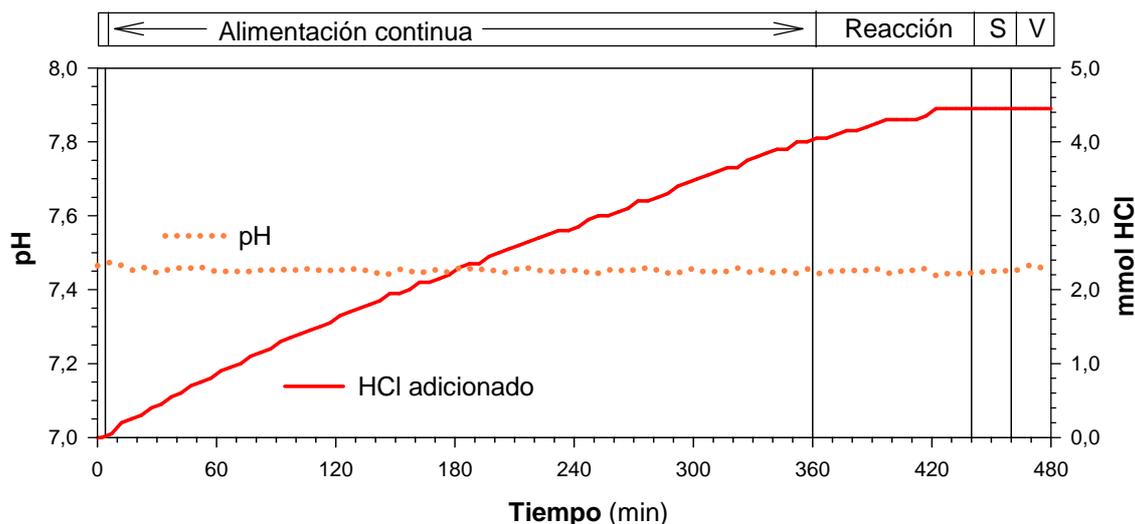


Figura 5.10 Perfil experimental de pH y de HCl adicionado durante el ciclo operacional de 8 horas.

Durante la etapa de alimentación continua se observa un aumento progresivo de la cantidad de ácido adicionado para mantener el valor de pH en 7.5, aproximadamente. En la parte final de la etapa de reacción no se observó consumo de ácido debido a que las concentraciones de amonio y nitrito eran prácticamente nulas. Finalmente, durante las etapas de sedimentación (S) y vaciado (V) no se apreció adición de ácido. Aplicando este tipo de control, el valor de pH se mantuvo constante durante todo el ciclo operacional (Figura 5.10).

A partir de la cantidad de ácido consumida y del amonio eliminado a través del proceso anammox se calculó la relación molar entre el consumo de protones versus el consumo de amonio. El resultado medio de los ciclos operacionales estudiados era de 1.0 mol de H^+ adicionado por mol de amonio consumido. Según Strous *et al.* (1998) se consumían 0.13 moles H^+ ·mol $N-NH_4^+$ eliminado (Ecuación 1.8). El valor experimental obtenido era mucho mayor que el valor teórico, confirmando la coexistencia del proceso de desnitrificación heterotrófica, el cuál, según la estequiometría consume 4.0 moles H^+ ·mol $N-NO_2^-$ eliminado y 6.0 moles H^+ ·mol $N-NO_3^-$ eliminado (Metcalf and Eddy, 2003).

5.4 Cuantificación de los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica

Una vez se confirmó la coexistencia de los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica en un mismo reactor, se calculó la cantidad de nitrógeno eliminada por ambos procesos. Ruscalleda *et al.* (2008a) consideraron que a partir del balance de cada especie nitrogenada se puede calcular la contribución de cada proceso (desnitrificación heterotrófica y anammox) en la eliminación de nitrógeno. Así, en las Ecuaciones 5.1, 5.2 y 5.3 se plantea el

balance de amonio, nitrito y nitrato en el fermentador anammox teniendo en cuenta tanto el crecimiento de la biomasa heterotrófica como el consumo y generación de los diferentes compuestos de nitrógeno por la actividad de las dos comunidades bacterianas.

$$(NH_4^+)_{consumido} = -NH_4^+_{anammox} - \frac{i_{n,bm}}{1-Y_H} NO_2^-_{het} - \frac{i_{n,bm}}{1-Y_H} NO_3^-_{het} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

$$(NO_2^-)_{consumido} = NO_3^-_{het} - NO_2^-_{het} - 1.32NH_4^+_{anammox} \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

$$(NO_3^-)_{generado} = 0.26NH_4^+_{anammox} - NO_3^-_{het} \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

donde, $i_{n,bm}$ es el contenido de nitrógeno de la biomasa y tiene un valor de $0.07 \text{ g N} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}$ (Henze *et al.*, 1999) y Y_H es el rendimiento de los organismos heterotróficos expresado en $\text{g DQO}_{generada} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DQO}_{consumida}$.

El valor de este rendimiento (Y_H) depende del tipo de biomasa y de la materia orgánica presente en el reactor y puede oscilar entre 0.52 y 0.57 según Muller *et al.* (2003) y entre 0.63 y 0.67 según Henze *et al.* (1999). La importancia de este rendimiento en la resolución del balance de nitrógeno depende de la biodegradabilidad de la materia orgánica. Debido a que la materia orgánica del lixiviado pretratado era relativamente baja, una pequeña variación en el valor del rendimiento heterotrófico (Y_H) no provocaba cambios significativos en la contribución de cada proceso en la eliminación de nitrógeno.

Centrándonos en la expresión que describe el balance de amonio (Ecuación 5.1), el consumo de nitrógeno amoniacal (NH_4^+) determinado experimentalmente viene dado por el consumo a través de la biomasa anammox ($-NH_4^+_{anammox}$) (incluida la asimilación) y la asimilación por parte de los organismos desnitrificantes heterotróficos que reducen el nitrato a nitrito ($-\frac{i_{n,bm}}{1-Y_H}$) y el nitrito a nitrógeno gas ($-\frac{i_{n,bm}}{1-Y_H}$).

El consumo de nitrito (NO_2^-) determinado experimentalmente puede expresarse según la Ecuación 5.2, donde se tiene en cuenta el consumo de nitrito efectuado por las bacterias anammox ($-1.32NH_4^+_{anammox}$) y los microorganismos heterotróficos desnitrificantes que

reducen el nitrito a nitrógeno gas ($-NO_{2het}^-$), así como la generación de nitrito producida por la biomasa heterotrófica que reduce el nitrato (NO_{3het}^-).

Finalmente, la generación de nitrato (NO_3^-) determinada experimentalmente puede describirse a partir de la Ecuación 5.3 teniendo en cuenta el nitrato producido por la biomasa anammox ($0.26NH_{4anammox}^+$) y el nitrato consumido por las bacterias desnitrificantes heterotróficas que reducen el nitrato a nitrito ($-NO_{3het}^-$).

La resolución de este sistema de ecuaciones permitió cuantificar el porcentaje de nitrógeno eliminado por los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica (Ruscalleda *et al.*, 2008b). En la Figura 5.11 se presenta el porcentaje total de nitrógeno eliminado (A) y el porcentaje de nitrógeno eliminado por ambos procesos (B) durante la aplicación de lixiviado en el fermentador anammox.

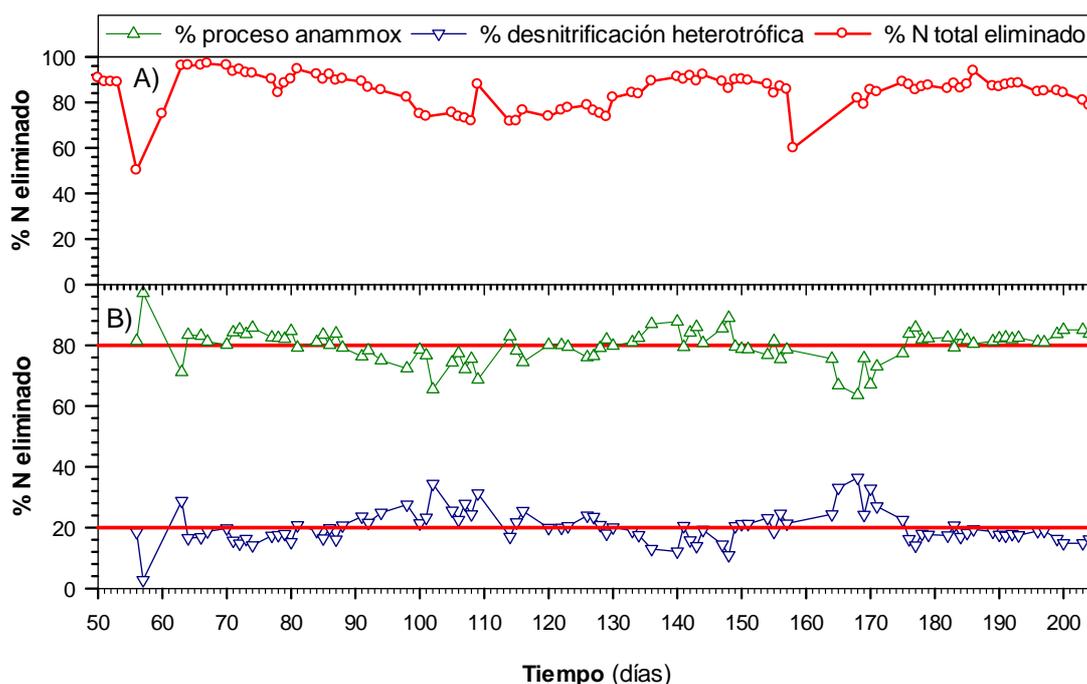


Figura 5.11 Relación del porcentaje de nitrógeno eliminado durante el tratamiento con lixiviado: A) N total eliminado y B) N eliminado por el proceso anammox y por el proceso de desnitrificación heterotrófica.

Por un lado, la media del porcentaje de eliminación total de nitrógeno durante la aplicación del lixiviado al fermentador anammox fue del 83.5% (Figura 5.11A). Por otro lado, la media de los porcentajes de eliminación de nitrógeno por el proceso anammox y por el proceso de desnitrificación heterotrófica fueron del 79.7 y 20.3%, respectivamente (Figura 5.11B).

Como se puede apreciar, la principal vía de eliminación de nitrógeno fue el proceso anammox. Esto es debido a la baja biodegradabilidad de la materia orgánica presente en el lixiviado pretratado, que limitó el desarrollo de la biomasa heterotrófica, favoreciendo el desarrollo y la actividad de las bacterias anammox. Así, la contribución del proceso de desnitrificación heterotrófica en la eliminación de nitrógeno fue relativamente baja.

Con los resultados obtenidos se concluye que es posible tratar lixiviados de vertedero, previamente tratados por el proceso de nitrificación parcial, a través del proceso anammox en un reactor SBR. La presencia de materia orgánica biodegradable en el lixiviado permite el desarrollo de los organismos desnitrificantes, así como disminuir la concentración de nitrato en el efluente. Sin embargo, ambos procesos (anammox y desnitrificación heterotrófica) compiten por un mismo sustrato, el nitrito. Esta competencia puede llegar a limitar el proceso anammox cuando la materia orgánica biodegradable disponible favorezca una mayor actividad desnitrificante heterotrófica.

5.5 Discusión y conclusiones

La aplicación del proceso anammox a los lixiviados de vertedero se realizó en un fermentador de 2L mediante la tecnología SBR, el cuál se inoculó con biomasa granular anammox previamente enriquecida en el reactor de 20L. Antes de ser aplicado, este lixiviado se trató por el proceso de nitrificación parcial para obtener una relación molar nitrito:amonio apropiada ($1.32 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$) para el proceso anammox siendo diluido y acondicionado posteriormente, para adaptar la biomasa a la compleja composición del lixiviado y las elevadas concentraciones de nitrógeno (amonio y nitrito) que presentaba.

Previamente a la puesta en marcha del proceso, se realizaron una serie de ensayos en *batch* para comprobar que la matriz de los lixiviados no afectaba la actividad de las bacterias anammox. Los resultados de estos ensayos determinaron que los lixiviados no inhibían el proceso anammox al menos en períodos cortos de exposición. Sin embargo, durante el inicio del período de aplicación de los lixiviados se detectó la disminución de la actividad de la biomasa anammox, provocando la acumulación de nitrito y la inhibición del proceso. En este sentido, se dedujo que la composición de la matriz del lixiviado afectaba a las bacterias anammox a elevados tiempos de exposición. Mediante una aclimatación paulatina se consiguió adaptar la biomasa anammox a los lixiviados de vertedero.

Una vez las bacterias anammox se aclimataron a los lixiviados se trató una carga media de nitrógeno de $0.28 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, siguiendo la misma estrategia que durante el enriquecimiento del proceso, es decir, aumentando progresivamente la carga de N aplicada siempre y cuando la concentración de nitrito en el efluente fuera inferior a $15 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$. De esta manera, la carga de N aplicada se aumentó hasta tratar $0.41 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, obteniéndose unos porcentajes de eliminación de amonio y de nitrito del 79.8 y 87.3%, respectivamente. Cema *et al.* (2007) también trataron lixiviados de vertedero aplicando una carga máxima de eliminación de nitrógeno de $0.93 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ y una carga media de $0.50 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ en un reactor RBC. Liang and Liu (2008) únicamente consiguieron tratar $0.16 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ en un reactor de lecho fijo de flujo ascendente con biomasa fijada, obteniendo una eliminación total de nitrógeno del 62%.

Por otro lado, la presencia de materia orgánica biodegradable en el lixiviado permitió el desarrollo de bacterias desnitrificantes heterotróficas. Para el seguimiento de la actividad de estas bacterias conjuntamente con la actividad anammox, se utilizaron las relaciones estequiométricas entre el nitrito y el amonio eliminados y entre el nitrato producido y el amonio eliminado. Así, se compararon los valores experimentales obtenidos ($1.47 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $0.12 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente) con los valores teóricos determinados por Strous *et al.* (1998) ($1.32 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $0.26 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente), lo que permitió confirmar la presencia de las dos comunidades bacterianas (anammox y desnitrificantes heterotróficas) en el mismo reactor. Por un lado, la producción de nitrato era inferior a la esperada por la biomasa anammox debido a que se consumía por las bacterias heterotróficas y por otro, se producía un consumo más elevado de nitrito que el esperado únicamente por el proceso anammox.

El valor de las relaciones estequiométricas obtenidas experimentalmente indicaba que las bacterias desnitrificantes heterotróficas utilizaban tanto el nitrato como el nitrito, siendo el factor limitante de este proceso la materia orgánica biodegradable disponible en el lixiviado tratado. Hwang *et al.* (2005) observaron también la coexistencia de las actividades anammox y desnitrificante heterotrófica al tratar purines de cerdo, llegando a obtener una relación de 2.13 moles de nitrito eliminado por mol de amonio eliminado. Mientras, en el presente estudio, tratando lixiviados de vertedero se obtuvo una relación media de 1.47 moles de nitrito eliminado por mol de amonio eliminado.

Una vez confirmada la coexistencia de ambos procesos, se cuantificó la contribución de cada proceso a la eliminación global de nitrógeno en el sistema. El cálculo se realizó a partir de los balances de amonio, nitrito y nitrato, teniendo en cuenta el consumo y generación de estos compuestos por ambas comunidades, así como el crecimiento de la biomasa heterotrófica. Los resultados indicaron que el porcentaje de nitrógeno eliminado mediante el proceso anammox era

del 79.7%, mientras que el 20.3% era eliminado a través del proceso de desnitrificación heterotrófica. Resultados similares obtuvieron Ahn *et al.* (2004) tratando purines de cerdo en un reactor UASB combinando los procesos anammox y desnitrificación parcial, disminuyendo también la materia orgánica biodegradable disponible.

En nuestro caso, la principal vía de eliminación de nitrógeno era el proceso anammox debido a la baja biodegradabilidad de la materia orgánica presente en el lixiviado acondicionado por el proceso de nitrificación parcial ($DBO_5=10-90 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), que limitaba el desarrollo de la biomasa heterotrófica. Sin embargo, la presencia de esta materia orgánica biodegradable permitió disminuir la concentración de nitrato en el efluente.

Finalmente, cabe comentar que si la materia orgánica biodegradable disponible para las bacterias desnitrificantes heterotróficas fuera más elevada se produciría una mayor competencia por el nitrito, lo que podría provocar una disminución de la actividad anammox y una mayor actividad desnitrificante heterotrófica. En este sentido, Chamchoi *et al.* (2008) observaron la disminución de la actividad de las bacterias anammox con concentraciones de materia orgánica superiores a $0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en forma de DQO o con una relación C:N de 2 mol mol^{-1} . Sin embargo, Ahn *et al.* (2004) trataron purines de cerdo con una concentración de materia orgánica cercana a $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y una relación C:N entre 4 y $6 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados en los capítulos anteriores, las conclusiones que se han obtenido pueden nuevamente dividirse en los dos objetivos principales:

1. La puesta en marcha de un reactor anammox.
2. La aplicación del proceso anammox para el tratamiento de lixiviados de vertedero.

En primer lugar, se ha conseguido realizar el enriquecimiento de las bacterias anammox a partir de un inóculo procedente de una mezcla de lodos de distintos orígenes que no presentaban inicialmente, actividad anammox, mediante la tecnología SBR y con medio sintético. Así, se han determinado las condiciones de operación para la puesta en marcha de un reactor anammox y se ha concluido que los puntos clave para enriquecer la biomasa anammox son:

- Es necesario realizar estudios previos de enriquecimiento en *batch* para determinar la presencia de bacterias anammox en el inóculo seleccionado.
- Durante el período de arranque del proceso, se debe trabajar con una relación molar nitrito:amonio en el afluente inferior a la estequiométrica para minimizar la acumulación de nitrito. En este sentido, una relación molar inicial de 0.76 moles NO_2^- por mol de NH_4^+ ha demostrado ser apropiada para la puesta en marcha del proceso.
- La aplicación de una baja carga de nitrógeno ($0.02 \text{ kg N} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$) en la puesta en marcha del reactor anammox ha demostrado ser adecuada para enriquecer las bacterias anammox, evitando la acumulación de nitrito en el reactor.
- La presencia de nitrato en el afluente minimiza el riesgo de toxicidad del ácido sulfhídrico al evitarse así la reducción de sulfato. Una vez enriquecido el proceso, la producción de nitrato por las bacterias anammox ha permitido eliminar el nitrato del alimento.
- Las condiciones anaeróbicas han minimizado la inhibición del proceso, sobretodo, durante el inicio del enriquecimiento. Una vez enriquecido el sistema, la entrada ocasional de oxígeno en el interior del reactor no ha afectado a la dinámica del proceso.
- La velocidad de agitación lenta favorece la granulación de la biomasa, aumentando su retención y en consecuencia minimizando su pérdida a través del efluente.
- La implementación de un sistema de control del pH permite mantener el rango óptimo de trabajo para enriquecer la biomasa anammox. Además, la monitorización del pH puede utilizarse como parámetro de seguimiento del proceso, así como de la actividad de las bacterias anammox.

- La aplicación de técnicas de detección molecular, PCR y FISH, permite detectar, identificar y cuantificar las bacterias anammox durante la puesta en marcha y el enriquecimiento de la biomasa anammox. Los resultados de la técnica molecular PCR ha permitido identificar a la especie enriquecida en el reactor SBR como *Candidatus Brocadia anammoxidans*, obteniéndose, a partir de la técnica FISH un 85% de bacterias anammox respecto a la biomasa total (*Eubacteria*) después de un año de operación.

Teniendo en cuenta las condiciones de operación expuestas, se ha enriquecido satisfactoriamente un reactor anammox a partir de una mezcla de fangos activos en los cuáles previamente, se había detectado actividad anammox mediante estudios en *batch*. Al cabo de un año de operación, el proceso anammox ha conseguido alcanzar porcentajes de eliminación de amonio y nitrito superiores al 99% tratando una carga nitrogenada de $1.60 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$.

Por otro lado, para el seguimiento y evaluación del proceso anammox se propone la monitorización de las relaciones estequiométricas experimentales. Los valores medios obtenidos, 1.32 ± 0.05 moles de nitrito eliminados por mol de amonio eliminado y 0.23 ± 0.05 moles de nitrato producidos por mol de amonio eliminado, han permitido confirmar que la eliminación del nitrógeno se produce únicamente por la actividad de las bacterias anammox.

El enriquecimiento de la biomasa anammox ha permitido aplicar este proceso al tratamiento de lixiviados de vertederos. Las conclusiones que se han extraído de esta parte del trabajo son las siguientes:

- El proceso anammox ha sido aplicado satisfactoriamente al tratamiento de lixiviados de vertedero previamente tratados por el proceso de nitrificación parcial. Durante el estudio experimental se ha tratado una carga de nitrógeno media de $0.28 \text{ kg N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$, obteniéndose un porcentaje de eliminación de nitrógeno total del 83.5%.
- El contenido de materia orgánica biodegradable en el lixiviado permite desarrollar la biomasa desnitrificante heterotrófica, la cual contribuye a la eliminación de nitrógeno pero al mismo tiempo compite con las bacterias anammox por el sustrato (nitrito), provocando la coexistencia de las bacterias anammox y desnitrificantes heterotróficas en un mismo reactor.
- El seguimiento de las relaciones estequiométricas experimentales permite realizar el seguimiento de ambos procesos. Los valores medios obtenidos, 1.47 ± 0.12 moles de nitrito eliminado por mol de amonio eliminado y de 0.12 ± 0.06 moles de nitrato producidos por mol de amonio eliminado han permitido detectar la coexistencia de ambos procesos (anammox y desnitrificación heterotrófica). La comparación con los valores

estequiométricos del proceso anammox (1.32 y 0.26, respectivamente) corrobora la presencia de las bacterias desnitrificantes heterotróficas, debido, por un lado, al consumo más elevado de nitrito y, por otro, a que el nitrato producido por las bacterias anammox es inferior al esperado al ser consumido por la biomasa heterotrófica.

- En el tratamiento del lixiviado del presente estudio se ha comprobado que la principal ruta de eliminación de nitrógeno es el proceso anammox. El balance de las diferentes especies nitrogenadas implicadas permite cuantificar la contribución de cada proceso en la eliminación del nitrógeno. Los resultados obtenidos han concluido que un 79.7% del nitrógeno se ha eliminado a través del proceso anammox y un 20.3% mediante el proceso desnitrificante heterotrófico, debido a la baja cantidad de materia orgánica biodegradable presente en el lixiviado pretratado. En este sentido, son necesarios más estudios para conocer si el porcentaje de materia orgánica biodegradable puede afectar a la coexistencia de las bacterias anammox y desnitrificantes heterotróficas en un mismo reactor.
- La simultaneidad de los procesos anammox y desnitrificación heterotrófica puede ser una ventaja en el tratamiento de aguas residuales, ya que parte del nitrato producido por la biomasa anammox es eliminado por los organismos desnitrificantes, eliminándose también la materia orgánica biodegradable presente en el lixiviado pretratado.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abelling, U. and Seyfried, C.F. (1992). Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater-nitrogen removal via nitrite. *Water Sci. Technol.* **26** (5-6), 1007-1015.
- Abma, W.R., Schultz, C.E., Mulder, J.W., Van der Star, W.R.L., Strous, M., Tokutomi, T. and Van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Full scale granular sludge Anammox[®] process. *Water Sci. Technol.* **55** (8-9), 27-33.
- Ahn, Y.-H., Hwang, I.-S. and Min, K.-S. (2004). Anammox and partial denitrification in anaerobic nitrogen removal from piggery waste. *Water Sci. Technol.* **49** (5-6), 145-153.
- Ahn, Y.-H. and Kim, H.-C. (2004). Nutrient removal and microbial granulation in an anaerobic process treating inorganic and organic nitrogenous wastewater. *Water Sci. Technol.* **50** (6), 207-215.
- Ahn Y.-H., (2006). Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Bioch.* **41** (8), 1709-1721.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169 .
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S. and Srinath, E.G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Con. F.* **48** (5), 835-852.
- APHA (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21th edn.; American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. Washington, D.C., USA.
- Arden, E. and Lockett, W.T. (1914). Experiments on the oxidation of sewage without the aid of liters. *Journal of the society of chemical industry* **36**, 822-830.
- Arrojo, P. (2006) *El reto ético de la nueva cultura del agua*. Barcelona, Ed. Paidós.
- Arrojo, B., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L. and Méndez, R. (2006). Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *Journal of Biotechnology* **123** (4), 453-463.

B

- Bae, J.H., Cho, K.W., Lee, S.J., Bum, B.S. and Yoon, B.H. (1998). Effects of leachate recycle and anaerobic digester sludge recycle on the methane production from solid wastes. *Water Sci. Technol.* **38** (2), 159-168.
- Balaguer, M.D., Colprim, J., Martín, M., Poch, M. i Rodríguez-Roda, I. (1998). *Tractament biologic d'aigües residuals urbanes*. Programa de doctorat Tecnologies del medi ambient. Monografia nº1. Universitat de Girona.
- Beun, J.J., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (2000). Aerobic granulation. *Water Sci. Technol.* **41** (4-5), 41-48.
- Broda, E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Z. Allg. Mikrobiol.* **17** (6), 491-493.

C

- Caffaz, S., Canziani, R., Lubello, C. and Santianni, D. (2005). Upgrading of Florence wastewater treatment plant: Co-digestion and nitrogen autotrophic removal. *Water Sci. Technol.* **38** (2), 159-168.
- Cáliz, J. (2005). *Els bacteris oxidadors d'amoni en els processos d'eliminació de nitrogen: anàlisi molecular de les poblacions bacterianes implicades en sistemes aerobis i anaerobis*. Diploma Estudis Avançats. Grup d'Ecologia Microbiana Molecular. Universitat de Girona.
- Carucci, A., Chiavola, A., Majone, M. and Rolle, E. (1999). Treatment of tannery wastewater in a sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* **40** (1), 253-259.
- Cema, G., Szatkowska, B., Plaza, E., Trela, J. and Surmacz-Górska J. (2006). Nitrogen removal rates at a technical-scale pilot plant with the one-stage partial nitritation/Anammox process. *Water Sci. Technol.* **54** (8), 209-217.
- Cema, G., Wiszniowski, J., Zabczyński, S., Zabłocka-Godlewska, E., Raszka, A. and Surmacz-Górska, J. (2007). Biological nitrogen removal from landfill leachate by deammonification assisted by heterotrophic denitrification in a rotating biological contactor (RBC). *Water Sci. Technol.* **55** (8-9), 35-42.
- Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J. y Gómez, J. (2000). Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **42**, 73-82.
- Chamchoi, N. and Nitorisavut, S. (2007). Anammox enrichment from different conventional sludges. *Chemosphere* **66**, 2225-2232.

Chamchoi, N., Nitorisavut, S. and Schmidt, J.E.E. (2008). Inactivation of anammox communities under concurrent operation of anaerobic ammonium oxidation (anammox) and denitrification. *Bioresource Technology* **99** (9), 3331-3336.

D

Daims, H., Bruehl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 434-444.

Dalsgaard, T. and Thamdrup, B. (2002). Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (8), 3802-3808.

Dalsgaard, T., Thamdrup, B. and Canfield, D.E. (2005). Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Res. Microbiol.* **156** (4), 457-464.

Dapena-Mora, A., Arrojo, B., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Jetten, M.S.M. and Mendez-Pampin, R. (2004a). Improvement of the settling properties of anammox sludge in an SBR. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1417-1420.

Dapena-Mora, A., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Jetten, M. S. M. and Mendez-Pampin, R. (2004b) Stability of the anammox process in a gas-lift reactor and a SBR. *Journal of Biotechnology* **110**, 159-170.

Dapena-Mora, A., Van Hulle, S.W.H., Campos, J.L., Mendez, R., Vanrolleghem, P. A. and Jetten, M.S.M. (2004c) Enrichment of anammox biomass from municipal activated sludge: experimental and modelling results. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1421-1428.

Dapena-Mora, A., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A. and Méndez, R. (2006). Anammox process for nitrogen removal from anaerobically digested fish canning effluents. *Water Sci. Technol.* **53** (12), 265-274.

Dapena-Mora, A. (2007). *Wastewater treatment by anammox process: A short-circuit in the natural nitrogen cycle*. PhD Tesis. Universidad de Santiago de Compostela. España

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

Dosta, J. (2007). Operation and model description of advanced biological nitrogen removal treatments of highly ammonium loaded wastewaters. Ph.D. Thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona, Espanya. ISBN: B.56517-2007 / 978-84-690-9750-2.

http://www.tdx.cbuc.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-1106107-105322//JDP_THESIS.pdf

E

Egli, K., Fanger, U., Alvarez, P.J.J., Siegrist, H., Van der Meer, J.R. and Zehnder, A.J.B. (2001). Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Archives of Microbiology* **175**, 198-207.

F

Fuerst, J.A. (1995). The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology* **141**, 1493-1506.

Fuerst, J.A. (2005). Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annual Review of Microbiology* **59**, 299-328.

Furukawa, K., Lieu, P.K., Tokitoh, H. and Fujii, T. (2006). Development of single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitritation (SNAP) and its treatment performances. *Water Sci. Technol.* **53** (6), 83-90.

Fux, C., Boehler, M., Huber, P., Brunner, I. and Siegrist, H. (2002). Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in a pilot plant. *J. Biotechnol.* **99** (3), 296-305.

Fux, C., Lange, K., Faessler, A., Huber, P., Grueniger, B. and Siegrist, H. (2003). Nitrogen removal from digester supernatant via nitrite SBR or SHARON? *Water Sci. Technol.* **48** (8), 9-18.

Fux, C., Marchesi, V., Brunner, I. and Siegrist, H. (2004). Anaerobic ammonium oxidation of ammonium-rich waste streams in fixed-bed reactors. *Water Sci. Technol.* **49** (11-12), 77-82.

Fux, C. and Siegrist, H. (2004). Nitrogen removal from sludge digester liquids by nitrification-denitrification or partial nitritation-anammox: Environmental and economical considerations. *Water Sci. Technol.* **50** (10), 19-26.

G

Ganigué, R., López, H., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2007). Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. *Water Res.* **41** (15), 3317-3326.

Ganigué, R., López, H., Rusalleda, M., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). Operational strategy for a partial nitritation–sequencing batch reactor treating urban landfill leachate to

- achieve stable influent for an anammox reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83** (3), 365-371.
- Gaul, T., Märker, S. and Kunst, S. (2005). Start-up of moving bed biofilm reactors for deammonification: the role of hydraulic retention time, alkalinity and oxygen supply. *Water Sci. Technol.* **52** (7), 127-133.
- Gong, Z., Yang, F., Liu, S., Bao, H., Hu, S. and Furukawa, K. (2007). Feasibility of a membrane-aerated biofilm reactor to achieve single-stage autotrophic nitrogen removal based on anammox. *Chemosphere* **69** (5), 776-784.
- Grady, J., Daigger, G., Lim H. (1999). *Biological wastewater treatment*. Marcel Dekker: New York.
- Gut, L. (2006). *Assessment of a partial nitrification-anammox system for nitrogen removal*. Licentiate Thesis 2034; ISBN 91-7178-167-6. KTH Land and Resources Engineering, Stockholm, p 73.
- Güven, D., Dapena, A., Kartal, B., Schmid, M.C., Maas, B., Van de Pas-Schoonen, K., Sozen, S., Mendez, R., Op Den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Strous, M. and Schmidt, I. (2005). Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (2), 1066-1071.

H

- Hellinga, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., Van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1998). The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *Water Sci. Technol.* **37** (9), 135-142.
- Hellinga, C., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1999). Model based design of a novel process for nitrogen removal from concentrated flows. *Math. Comput. Model. Dyn.* **5** (4), 351-371.
- Helmer, C., Tromm, C., Hippen, A., Rosenwinkel, K.-H., Seyfried, C.F. and Kunst, S. (2001). Single stage biological nitrogen removal by nitrification and anaerobic ammonium oxidation in biofilm systems. *Water Sci. Technol.* **43** (1), 311-320.
- Helmer-Madhok, C., Schmid, M., Filipov, E., Gaul, T., Hippen, A., Rosenwinkel, K.-H., Seyfried, C.F., Wagner, M. and Kunst, S. (2002). Deammonification in biofilm systems: population structure and function. *Water Sci. Technol.* **46** (1-2), 226-231.

Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M.C., Marais, G. and Van Loosdrecht, M.C.M. (1999). Activated Sludge Model N^o2D, ASM2D. *Water Sci. Technol.* **39** (1), 165-182.

Hippen, A., Helmer, C., Kunst, S., Rosenwinkel, K.-H. and Seyfried, C.F. (2001). Six years' practical experience with aerobic/anoxic deammonification in biofilm systems. *Water. Sci. Technol.* **44** (2-3), 39-48.

Horan, N.J., Gohar, H. and Hill, B., (1997). Application of a granular activated carbon-biological fluidised bed for the treatment of landfill leachates containing high concentrations of ammonia. *Water Sci. Technol.* **36** (2-3), 369-375.

Hwang, I.S., Min, K.S., Choi, E. and Yun, Z. (2005). Nitrogen removal from piggery waste using the combined SHARON and ANAMMOX process. *Water Sci. Technol.* **52** (10-11), 487-494.

I

Imajo, U., Tokutomi, T. and Furukawa, K., (2004). Granulation of anammox microorganisms in up-flow reactors. *Water Sci. Technol.* **49** (5-6), 155-163.

Irvine, R.L. and Busch, A.W. (1979). Sequencing batch biological reactors: an overview. *Journal WPCF* **51** (2), 235-243.

Irvine, R.L., Ketchum, L.H., Breyfogle, R. and Barth, E.F. (1983). Municipal application of sequencing batch treatment. *Journal WPCF* **55** (5), 484-488.

Isaka, K., Date, Y., Sumino, T. and Tsuneda, S. (2007). Ammonium removal performance of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier: Anammox bacteria immobilized in gel carrier. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76** (6), 1457-1465.

J

Jenicek, P., Svehla, P., Zabranska, J. and Dohanyos, M. (2004). Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification. *Water Sci. Technol.* **49** (5-6), 73-79.

Jetten, M. S. M., Horn, S.J. and Van Loosdrecht, M.C.M. (1997). Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Water Sci. Technol.* **35**, 171-180

- Jetten, M.S.M., Strous, M., Van de Pas-Schoonen, K.T., Schalk, J., Van Dongen, L., Van de Graaf, A.A., Logemann, S., Muyzer, G., Van Loosdrecht, M.C.M. and Kuenen, J.G. (1999). The anaerobic oxidation of ammonia. *FEMS Microbiol. Reviews* **22** (5), 421-437.
- Jetten, M.S.M., Wagner, M., Fuerst, J.A., Van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G. and Strous, M. (2001). Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 283-288.
- Jetten, M.S.M., Schmid, M.A., Schmidt, I., Wubben, M., Van Dongen, U., Abma, W., Slikkers, A.O., Revsbech, N.P., Beaumont, H.J.E., Ottosen, L., Volcke, E., Laanbroek, H.J., Campos-Gómez, J.L., Cole, J., Van Loosdrecht, M.C.M., Mulder, J.W., Fuerst, J., Richardson, D., Van de Pas-Schoonen, K.T., Mendez-Pampín, R., Third, K., Cirpus, I.Y., Van Spanning, R., Bollmann, A., Nielsen, L.P., Op den Camp, H.J.M., Schultz, C., Gundersen, J., Vanrolleghem, P., Strous, M., Wagner, M., and Kuenen, J.G. (2002). Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Reviews in Environ. Sci. Biotechnol.* **1**, 51-63.
- Jetten, M.S.M., Slikkers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., Van Niftrik, L., Cirpus, I., Van De Pas-Schoonen, K., Lavik, G., Thamdrup, B., Le Paslier, D., Op Den Camp, H.J.M., Hulth, S., Nielsen, L.P., Abma, W., Third, K., Engström, P., Kuenen, J.G., Jørgensen, B.B., Canfield, D.E., Sinninghe Damsté, J.S., Revsbech, N.P., Fuerst, J., Weissenbach, J., Wagner, M., Schmidt, I., Schmid, M., Strous, M. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63** (2), 107-114.
- Jetten, M.S.M., Cirpus, I., Kartal, B., Van Niftrik, L., Van de Pas-Schoonen, K.T., Slikkers, O., Haaijer, S., Van der Star, W., Schmid, M., Van de Vossenberg, J., Schmidt, I., Harhangi, H., Van Loosdrecht, M.C.M., Kuenen, J.G., Op den Camp, H. and Strous, M. (2005a). 1994-2004:10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium. *Bioch. Soc. Transac.* **33** (1), 119-123.
- Jetten, M.S.M., Schmid, M.C., Van de Pas-Schoonen, K.T., Sinninghe Damsté, J.S. and Strous, M. (2005b). Anammox organisms: Enrichment, cultivation, and environmental analysis *Methods Enzymol* **397**, 34-57.
- Jianlong, W. and Jing, W. (2005). The characteristics of anaerobic ammonia oxidation by granular sludge from an EGSB reactor. *Process Bioch.* **40** (5), 1973-1978.
- Jiménez, E. (2007). Closing the nitrogen cycle from urban landfill leachate by biological removal over nitrite and thermal treatment. *Proceedings of the CLONIC Final Workshop'07*. Barcelona, 19-20 Abril. ISBN: B-12215-2007.

K

- Kalyuzhnyi, S. and Gladchenko, M. (2004). Sequenced anaerobic-aerobic treatment of high strength, strong nitrogenous landfill leachates. *Water Sci. Technol.* **49**(5-6), 301-312.
- Kalyuzhnyi, S., Gladchenko, M., Mulder, A. and Versprille, B. (2006). DEAMOX-new biological nitrogen removal process based on anaerobic ammonia oxidation coupled to sulphide-driven conversion of nitrate into nitrite. *Water Res.* **40** (19), 3637-3645.
- Kartal, M.B., Van Niftrik, L.A.M.P., Sliemers, A.O., Schmid, M.C., Schmidt, I., Van de Pas-Schoonen, K.T., Cirpus, I., Van der Star, W., Van Loosdrecht, M., Abma, W., Kuenen, J.G., Mulder, J.W., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H.J.M., Strous, M., Van de Vossenberg, J. (2004) Application, ecophysiology and biodiversity of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **3** (3), 255-264.
- Kartal, B., Kuypers, M., Lavik, G., Schalk, J., Op den Camp, H., Jetten, M.S.M. and Strous M. (2007a). Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environmental Microbiology* **9** (3), 635-642.
- Kartal, B., Rattray, J., Van Niftrik, L.A., Van de Vossenberg, J., Schmid, M.C., Webb, R.I., Schouten, S., Fuerst, J.A., Damsté, J.S., Jetten, M.S.M. and Strous M. (2007b). *Candidatus* Anammoxoglobus propionicus a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **30** (1), 39-49.
- Kartal, B., Van Niftrik, L., Rattray, J., Van de Vossenberg J., Schmid, M.C., Sinninghe Damsté, J., Jetten, M.S.M. and Strous, M. (2008). *Candidatus* Brocadia fulgida: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol Ecol* **63**, 46-55.
- Kuai, L. P. and Verstraete, W. (1998). Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, (11) 4500-4506.
- Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (2001). Extraordinary anaerobic ammonium oxidizing bacteria. *ASM News* **67**, 456-463.
- Kuypers, M.M.M., Sliemers, A.O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B.B., Kuenen, J.G., Sinninghe Damsté, J.S., Strous, M. and Jetten, M.S.M. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* **422**, 608-611.

L

- López, H., Puig, S., Ganigué, R., Rusalleda, M., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83** (3), 233-241.
- Liang, Z. and Liu, J. (2008). Landfill leachate treatment with a novel process: Anaerobic ammonium oxidation (anammox) combined with soil infiltration system. *Journal of Hazardous Materials* **151**, 202-212.

M

- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (1997). Brock. *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Magrí, A. and Flotats, X. (2000). Tratamiento de la fracción líquida de purines de cerdo mediante un reactor discontinuo secuencial. *Residuos* **57**, 84-88.
- Metcalf and Eddy (2003). *Wastewater engineering: treatment and reuse*. McGraw-Hill Higher Education, New York., 4th Ed.
- Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Sánchez, M., Méndez, R. and Lema, J.M. (2003). Combined system for biological removal of nitrogen and carbon from a fish cannery wastewater. *J. of Environmental Engineering. ASCE.* **29**, (9), 826-833.
- Mulder, A., Van de Graaf, A., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* **16**, 177-184.
- Muller, A., Wentzel, M.C., Loewenthal, R.E. and Ekama, G.A. (2003). Heterotroph anoxic yield in anoxic aerobic activated sludge systems treating municipal wastewater *Water Res.* **37** (2), 2435-2441.
- Murat, S., Insel, G., Artan, N., Orhon, D. (2003). Performance evaluation of SBR treatment for nitrogen removal from tannery wastewater. *IWA Speciality Symposium on Strong Nitrogenous and Agro-Wastewater* **2**, 598-605. Seoul, Korea. June 11-13.
- Münch, E.V., Lant, P. and Keller, J. (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* **30** (2), 277-284.

N

Neef, A., Amann, R.I., Schlesner, H. and Schleifer, K.H. (1998). Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* **144**, 3257-3266.

P

Poch, M. (1999). Les qualitats de l'aigua. Rubes Editorial. Barcelona.

Prat, N. (2003). La gestió de l'aigua a Catalunya. 25 anys i pocs canvis. *Escola catalana*, 65-68.

Prat, N. (2004). Alternativas para una gestión sostenible del agua en Cataluña. *Ambienta* **39**, 33-40.

PSARU, (2002). *Programa de sanejament d'aigües residuals urbanes 2002*. Agència Catalana de l'Aigua, Barcelona, Catalunya, Espanya.

(http://mediambient.gencat.net/aca/documents/ca/planificacio/psaru/psaru_document.pdf)

Puig, S. (2008). Operation and control of SBR processes for enhanced biological nutrient removal from wastewater. Ph. D. Thesis, Universitat de Girona, Girona, Espanya. ISBN: Gi-208-2008/978-84-691-2388-1.

(http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UdG/AVAILABLE/TDX-0211108-130619//tspb.pdf)

Pynaert, K., Wyffels, S., Sprengers, R., Boeckx, P., Van Cleemput, O. and Verstraete, W. (2002). Oxygen-limited nitrogen removal in a lab-scale rotating biological contactor treating an ammonium-rich wastewater. *Water Sci. Technol.* **45** (10), 357-363.

Pynaert, K., Smets, B.F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S.D. and Verstraete, W. (2003). Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3626-3635.

R

Ruscalleda, M., López, H., Ganigué, R., Puig, S., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008a). Heterotrophic denitrification on granular anammox SBR treating urban landfill leachate. *Proceedings 5th IWA Leading-Edge Conference*. June 1-4, Zürich, Switzerland.

Ruscalleda, M., Puig, S., López, H., Ganigué, R., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008b). Anammox and heterotrophic denitrification contribution on N removal by mass balances. *Wat. Res. (Under Review)*

S

Sabumon, P.C. (2007). Anaerobic ammonia removal in presence of organic matter: A novel route. *J. Haz. Mat.* **149** (1), 49-59.

Sánchez-Melsió, A. (2006). *Enriquiment de bacteris anammox en sistemes tancats: monitorització, detecció molecular i caracterització de les comunitats microbianes*. Diploma Estudis Avançats. Grup d'Ecologia Microbiana Molecular. Universitat de Girona.

Sánchez-Melsió, A., Cáliz, J., Balaguer, M.D., Colprim, J., Vila, X. (2008). Development of batch-culture enrichment coupled to molecular detection for screening of natural and man-made environments in search of anammox bacteria for N-removal bioreactors systems. *Chemosphere (Under review)*.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.

Schalk, J., Oustad, H., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998). The anaerobic oxidation of hydrazine: A novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiology Letters* **158** (1), 61-67.

Schalk, J., de Vries, S., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (2000). Involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase in the anaerobic oxidation of ammonium. *Biochemistry* **39** (18), 5405-5412.

Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J., Schleifer, K.H. and Wagner, M. (2000). Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *System. Appl. Microbiol.* **23**, 93-106.

Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W.I.C., Van de Pas-Schoonen, K.T., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Damsté, J.S.S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M. and Strous, M. (2003). *Candidatus Scalindua brodae*, sp. nov., *Candidatus Scalindua wagneri*, sp. nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 529-538.

Schmid, M.C., Maas, B., Dapena, A., Van de Pas-Schoonen, K.T., Van de Vossenberg, J., Kartal, B., Van Niftrik, L., Schmidt, I., Cirpus, I., Kuenen, J.G., Wagner, M., Sinninghe

- Damsté, J.S., Kuypers, M., Revsbech, N.P., Mendez, R., Jetten, M.S.M. and Strous, M. (2005). Biomarkers for In Situ Detection of Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. **71** (4), 1677-1684.
- Schmidt, I., Sliemers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. and Strous, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews* **27** (4), 481-492.
- Schmidt, J.E., Batstone, D.J. and Angelidaki, I. (2004). Improved nitrogen removal in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors by incorporation of Anammox bacteria into the granular sludge. *Water Sci. Technol.* **49** (11-12), 69-76.
- Schwarzenbeck, N., Erley, R. and Wilderer, P.A. (2004). Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. *Water Sci. Technol.* **49**, 41-46.
- Seyfried, C.F., Hippen, A., Helmer, C., Kunst, S. and Rosenwinkel, K.-H. (2001). One-stage deammonification: Nitrogen elimination at low costs. *Water Sci. Technol., Wat Supply* **1** (1), 71-80.
- Siegrist, H. (1996). Nitrogen removal from digester supernatant. Comparison of chemical and biological methods. *Water Sci. Technol.* **34** (1-2), 399-406.
- Siegrist, H., Reithaar, S., Koch, G. and Lais, P. (1998). Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Water Sci. Technol.* **38** (8-9), 241-248.
- Sinninghe Damsté, J.S., Strous, M., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., Van Duin, A.C.T., Van Niftrik, L.A. and Jetten, M.S.M. (2002). Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* **419** (6908), 708-712.
- Sinninghe Damsté, J.S., Rijpstra, W.I.C., Geenevasen, J.A.J., Strous, M., Jetten, M.S.M. (2004). Structural identification of ladderane and other membrane lipids of planctomycetes capable of anaerobic ammonium oxidation (anammox). *FEMS Journal* **272**, 4270-4283.
- Sliemers, O., Derwort, N., Campos, J.L., Strous, M., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (2002). Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor. *Water Res.* **36** (10), 2475-2482.
- Sliemers, A. O., Third, K., Abma, W., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (2003). CANON and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 339-344.
- STOWA (2001). *The Combined Sharon/Anammox Process: A sustainable method for N-removal from sludge water*. L.G.J.M. Van Dongen, M.S.M. Jetten, M.C.M. Van Loosdrecht. Report n° 2000-25. STOWA, Utrecht (The Netherlands). ISBN: 1 84339 000.

- Strous, M., Gerven, E.V., Zheng, P., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1997a). Ammonium removal from concentrated waste streams with the Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Res.*, **31** (8), 1955-1962.
- Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J. G. and Jetten, M. S. M. (1997b) Effects of aerobic and micro-aerobic conditions on anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** (6), 2446-2448.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotech.* **50** (5), 589-596.
- Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., Van de Pas-Schoonen, K.T., Webb R., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M.(1999a). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400** (6743), 446-449.
- Strous, M., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1999b). Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (7), 3248-3250.
- Strous, M. (2000). *Microbiology of anaerobic ammonium oxidation*. PhD Thesis. Technical University of Delft, The Netherlands.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M. W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., Barbe, V., Fonknechten, N., Vallenet, D., Segurens, B., Schenowitz-Tuong, C., Medigue, C., Collingro, A., Snel, B., Dulith, B. E., Op den Camp, H. J. M., Van der Drift, C., Cirpus, I., Van de Pas-Schoonen, K. T., Harhangi, R. H., Van Niftrik, L. A. M. P., Schmid, M. C., Keltjens, J., Van de Vossenberg, J., Kartal, B., Meier, H., Frishman, D., Huynen, M. A., Mewes, H.-W., Weissenbach, J., Jetten, M. S. M., Wagner, M. and Le Paslier, D. (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature lett.* **440** (7085), 790-794.
- Szatkowska, B., Cema, G., Plaza, E., Trela, J. and Hultman, B. (2007). A one-stage system with partial nitrification and Anammox processes in the moving-bed biofilm reactor. *Water Sci. Technol.* **55** (8-9), 19-26.

T

- Third, K., Sliemers, O.A., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. (2001). The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under Ammonium Limitation: Interaction and Competition between Three Groups of Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **24** (4), 588-596.

- Third, K.A., Paxman, J., Schmid, M., Strous, M., Jetten, M.S.M. and Cord-Ruwisch, R. (2005). Treatment of nitrogen-rich wastewater using partial nitrification and anammox in the CANON process. *Water Sci. Technol.* **52** (4), 47-54.
- Toh, SK and Ashbolt, NJ, (2002). Adaptation of anaerobic ammonium-oxidising consortium to synthetic coke-ovens wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 344-352
- Trigo, C., Campos J.L., Garrido J.M. and Méndez, R. (2006). Start-up of the Anammox process in a membrane bioreactor. *Journal of Biotechnology* **126** (4), 475-487.
- Turk, O. and Mavinic, D.S. (1989). Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Water Res.* **23**, 11, 1383-1388.

V

- Van de Graaf, A.A., Mulder, A., De Bruijn, P., Jetten, M.S.M., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (1995). Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1246-1251.
- Van de Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **42**, 2187-2196.
- Van de Graaf, A.A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1997). Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* **143**, 2415-2421.
- Van der Star, W.R.L., Abma, W.R., Blommers, D., Mulder, J.W., Tokutomi, T., Strous, M., Picioreanu, C. and Van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam. *Water Res.* **41** (18), 4149-4163.
- Van der Star, W.R., Miclea, A.I., Van Dongen, U.G., Muyzer, G., Picioreanu, C. and Van Loosdrecht, M.C. (2008). The membrane bioreactor: a novel tool to grow anammox bacteria as free cells. *Biotechnology and bioengineering* **101** (2), 286-294.
- Van Dongen, U., Jetten, M.S.M. and Van Loosdrecht, M.C.M. (2001). The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water Sci. Technol.* **44** (1), 153-160.
- Van Hulle, S.W.H., Volcke, E.I.P., Teruel, J.L., Donckels, B., Van Loosdrecht, M.C.M. and Vanrolleghem, P.A. (2007). Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitrification process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82** (5), 471-480.

- Van Kempen, R., Mulder, J.W., Uijterlinde, C.A. and Van Loosdrecht, M.C.M. (2001). Overview: full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Sci. Technol.* **44** (1), 145-152.
- Van Niftrik, L.A.M.P., Fuerst, J.A., Sinninghe Damsté, J.S., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. and Strous, M. (2004). The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *Fems Microbiol. Lett.* **233**, 7-13.
- Vilar, A., Kennes, C. and Veiga, M.C. (2007). Full-scale biological treatment of landfill leachate from urban solid wastes. *Proceedings of the CLONIC Final Workshop'07*, 156-158. Barcelona, 19-20 April. ISBN: B-12215-2007.
- Vives, M.T., Colprim, J., López, H., Ganiqué, R., Rusalleda, M., Sànchez-Melsió, A., Vila, X., López, R., Jesús Llorens, M^a, Salamero M., González, E., Jiménez, E., Balaguer, M.D., Elorduy M. (2007). Proyecto CLONIC. *Infoenviro: actualidad y tecnología de la industria medioambiental*. ISSN 1699-2520, **26**, 57-62.

W

- Wett, B., Rostek, R., Rauch, W. and Ingerla, K. (1998). pH-controlled reject-water treatment. *Water Sci. Technol.* **37** (12), 165-172.
- Wett, B. (2006). Solved upscaling problems for implementing deammonification of rejection water. *Water Sci. Technol.* **53** (12), 121-128.
- Wiesmann, U., (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. *Biotechnology*. A Fiechter Ed. **51**, 113-154.
- Wiszniewski, J., Robert, D., Surmacz-Gorska, J., Miksch, K. and Weber, J.V. (2006). Landfill leachate treatment methods: A review. *Environmental Chemistry Letters* **4** (1), 51-61.
- Wobken, D., Lam, P., Kuypers, M., Wajih, Kartal, B., Strous, M., Jetten, M.S.M., Fuchs, B. and Amann, R. (2008). A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel *Candidatus Scalindua* phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology (In press)*.
- Wyffels, S., Boeckx, P., Pynaert, K., Volcke, E.I.P., Verstraete, W. and Van Cleemput, O. (2003). Sustained nitrite accumulation in a membrane-assisted bioreactor (MBR) for the treatment of ammonium-rich wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **78**, 412-419.

Otras referencias

CLONIC (*Closing the nitrogen cycle from urban landfill leachate by biological nitrogen removal over nitrite and thermal treatment*) Project. (www.lifeleachate.com)

Directiva Europea Aguas Residuales Urbanas (91/271/CEE), de 21 de mayo de 1991. Diario Oficial de la Unión Europea **L 135**, 30-05-1991.

Directiva Europea relativa al vertido de residuos (1999/31/CE), de 26 de abril de 1999. Diario Oficial de las Comunidades Europeas **L 182**, 1-19.

Directiva Europea Marco Agua (2000/60/CE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas **L 327**, 1-72. (http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html)

Genoscope web page, the French National Sequencing Center

(<http://www.genoscope.cns.fr>)

Strous, M. (2004). The online Anammox resource: pioneering microbiology for a sustainable future. (<http://www.anammox.com>)

CAPÍTULO 8

ANEXO

8. ANEXO

CURRICULUM VITAE



Helio López Castillo

Blanes (Girona, Espanya), 6 de Febrero de 1974

Licenciado en **Ciencias Químicas**
por la Universidad de Girona en Julio de 2001.

Diploma de Estudios Avanzados en el programa de **Medio Ambiente**
por la Universidad de Girona en Octubre de 2003.

E-mail: helio@lequia.udg.cat

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS

- **Estudio en planta piloto de las condiciones de operación para un reactor biológico secuencial por cargas (SBR) para la eliminación de materia orgánica y nitrógeno en lixiviados de vertedero.**

Financiación: CESPÀ

Duración: Enero-Marzo 2002

Entidades participantes: Laboratori d'Enginyeria Química i Ambiental (LEQUIA-UdG) y CESPÀ GR

- **Eliminación de elevadas concentraciones de nitrógeno en aguas residuales de lixiviados de vertedero a través de la combinación de procesos aeróbicos y anaeróbicos: SHARON-Anammox.**

Financiación: CESPÀ

Duración: Abril 2002-Julio 2003

Entidades participantes: Laboratori d'Enginyeria Química i Ambiental (LEQUIA-UdG), CESPÀ GR y Fundació Agbar.

- **Proyecto CLONIC (CLOsing the NITrogen Cycle from urban landfill leachate by biological nitrogen removal over nitrite and thermal treatment).**

Financiación: Programa LIFE-Medioambiente de la UE. LIFE 03 ENV/E/000140.

Duración: Agosto 2003-Mayo 2007

Entidad beneficiaria: CESPÀ GR

Entidades participantes: Laboratori d'Enginyeria Química i Ambiental (LEQUIA-UdG), CESPÀ GR y Fundació Agbar.

- **Proyecto PANAMMOX: Nitritación parcial y oxidación anaeróbica del amonio de lixiviados de vertedero mediante los procesos PANI-SBR y Anammox**

Financiación: PET-2006-0604 y CIT-310200-2007-90

Duración: Enero 2007-Diciembre 2008

Entidad beneficiaria: CESPÀ GR

Entidades participantes: Laboratori d'Enginyeria Química i Ambiental (LEQUIA-UdG) y CESPÀ.

PUBLICACIONES

- López, H.** (2003). *Aplicació de la tecnologia SHARON al tractament biològic d'aigües residuals d'elevat contingut amoniacal*. Diploma de Estudios Avanzados. Programa de doctorado de Medio Ambiente. Universitat de Girona (UdG).
- López, H.**, Balaguer, M.D. i Colprim, J. (2004). Aplicació de la tecnologia SHARON al tractament biològic d'aigües residuals d'elevat contingut amoniacal. *Scientia gerundensis*, **27**, 59-73. ISSN: 0213-5930.
- Magrí, A., Corominas, Ll., **López, H.**, Campos, E., Balaguer, M.D., Colprim, J. and Flotats, X. (2007). A model for the simulation of the SHARON process: pH as a key factor. *Environ Technol.*, **28**, 255-265. ISSN: 0959-3330.
- Ganigué, R., **López, H.**, Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2007). Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leachates. *Water Res.* **41** (15), 3317-3326. ISSN: 0043-1354
- Vives, M.T., Colprim, J., **López, H.**, Ganigué, R., Ruscalleda, M., Sànchez-Melsió, A., Vila, X., López, R, Jesús Llorens, M^a, Salamero M., González, E., Jiménez, E., Balaguer, M.D., Elorduy, M. (2007). Proyecto CLONIC. *Infoenviro: actualidad y tecnología de la industria medioambiental.* **26**, 57-62. ISSN 1699-2520.
- López, H.**, Puig, S., Ganigué, R., Ruscalleda, M., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83** (3), 233-241.
- Ganigué, R., **López, H.**, Ruscalleda, M., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). Operational strategy for a partial nitrification–sequencing batch reactor treating urban landfill leachate to achieve stable influent for an anammox reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83** (3), 365-371.
- Ruscalleda, M., Puig, S., **López, H.**, Ganigué, R., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). Anammox and heterotrophic denitrification contribution on N removal by mass balances. *Water Res.* (Under Review)
- Ruscalleda, M., **López, H.**, Ganigué, R., Puig, S., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). Heterotrophic denitrification on granular anammox SBR treating urban landfill leachate. *Water Sci. Technol.* (Under Review).

CONTRIBUCIONES ORALES EN CONGRESOS

Magrí, A., Coromines, Ll., **López, H.**, Campos, E., Balaguer, M.D., Colprim, J. and Flotats, X. (2005). A model for the simulation of the SHARON process: pH as a key factor. *Proceedings Nutrient Management in Wastewater Treatment Processes and Recycle Streams*. IWA Specialized Conference. 19-21 September, Krakow (Poland).

López, H., Puig, S., Ganigué R., Rusalleda, M., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2007). Start-up of an Anammox SBR: operational conditions and assessment of anammox activity. *Proceedings of Nutrient Removal 2007: The state of the art*. Session 6B. IWA WEFTEC. 4-7 March, Baltimore, Maryland (USA).

Ganigué, R., **López, H.**, Rusalleda, M., Balaguer, M.D., y Colprim, J. (2007). Operational strategy of a partial nitrification-SBR (PN-SBR) treating urban landfill leachate to achieve a stable influent for an anammox reactor. *Proceedings of Nutrient Removal 2007: The state of the art*. Session 6-Alternate. IWA WEFTEC. 4-7 March, Baltimore, Maryland (USA).

López, H., Ganigué, R., Rusalleda, M., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2007). Enrichment and growth of granular anammox biomass to treat high nitrogen load wastewater using SBR technology. *CLONIC Final Workshop'07*, 19-20 April, Barcelona (Spain).

Ganigué, R., **López, H.**, Rusalleda, M., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2007). Start-up and operation of a Partial Nitrification-SBR (PN-SBR) treating urban landfill leachate to achieve a suitable influent for an anammox reactor. *CLONIC Final Workshop'07*, 19-20 April, Barcelona (Spain).

Vives, M.T., González, E., **López, H.**, Ganigué, R., Rusalleda, M., Balaguer, M.D., Colprim, J., Jiménez, E. and Elorduy, M. (2007). CLONIC: CLOsing the NItrogen Cycle from landfill leachates. A biological process with partial nitrification and anammox followed by thermal dry treatment. *Sardinia Symposium*. 1-7 October, Cagliari, Sardinia (Italy).

López, H., Rusalleda, M., Puig, S., Ganigué, R., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). pH control outcome as indicator of anammox SBR activity. *Proceedings 4th IWA Sequencing Batch Reactor Conference*. 7-10 April, Rome (Italy).

Rusalleda, M., **López, H.**, Ganigué, R., Puig, S., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). Heterotrophic Denitrification on Granular Anammox SBR treating Urban Landfill Leachate. *Proceedings 5th IWA Leading-Edge Conference*. June 1-4, Zürich, Switzerland.

López, H., Rusalleda, M., Ganigué, R., Puig, S., Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2008). Effect of low biodegradable organic matter on granular anaerobic ammonium-oxidizing. *Proceedings 1st International Symposium on Sanitary and Environmental Engineering*. 24-27 June, Firenze (Italy).

POSTERS EN CONGRESOS

- López, H.**, Balaguer, M.D. and Colprim, J. (2004). Getting a conditioned anammox process influent: alkalinity effect to SHARON process stability. *IcoN-Anammox Symposium: New sustainable N-removal from wastewater*. 21-23 January, Ghent (Belgium).
- Vives, M.T., **López, H.**, Balaguer, M.D., Elorduy, M. and Colprim, J. (2004). Treating real landfill leachate for carbon and nitrogen removal. Is the biological process suitable for all landfill life term?. *6th Specialist Conference on Small Water & Wastewater Systems*. 11-13 February, Perth (Australia).
- Ganigué, R., **López, H.**, Balaguer, M.D. y Colprim, J. (2005). Utilización de la tecnología SBR para la oxidación parcial del amonio a nitrito en afluentes de alta carga amoniacal. *Mesa Española de Tratamiento de Aguas (META)*. 13-14 Marzo, Valencia (Spain).
- Ganigué, R., **López, H.**, Rusalleda, M., Balaguer, M.D. and Colprim J. (2008). Partial nitrification-SBR treating landfill leachate, previous to anammox process. *Proceedings 4th IWA Sequencing Batch Reactor Conference*. 7-10 April, Rome (Italy).

CAPÍTULOS DE LIBROS

- Magrí A., Corominas Ll., **López H.**, Campos E., Balaguer M.D., Colprim J. and Flotats X. (2005). A model for the simulation of the SHARON process: pH as a key factor. *Nutrient Management in Wastewater Treatment Processes and Recycle Streams*, Vol.1, 735-744, Ed: Jan A. Oleszkiewicz. Krakow (Polonia). ISBN: 83-921140-1-9.
- Ganigué R., **López H.**, Rusalleda M., Balaguer M.D. and Colprim J. (2007). Start-up and operation of a Partial Nitrification-SBR (PN-SBR) treating urban landfill leachate to achieve a suitable influent for an anammox reactor. *CLONIC Final Workshop'07*, Vol. I, 32-41, Ed. Barcelona. ISBN: B-12215-2007.
- López H.**, Puig S., Ganigué R., Rusalleda M., Balaguer M.D. and Colprim J. (2007) Enrichment and growth of granular anammox biomass to treat high nitrogen load wastewaters using SBR technology. *CLONIC Final Workshop'07*, Vol. I, 82-90, Ed. Barcelona. ISBN: B-12215-2007.