

03072

15  
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADEMICA DE CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSGRADO**

**PROYECTO ACADEMICO ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y  
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA**

**SEDE FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RELACION C/N  
EN LA DESNITRIFICACION Y METANOGENESIS,  
EN LODOS ANAEROBIOS**

**T E S I S**

Para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

**Marivel Sánchez Guerrero**

México, D. F. Febrero de 1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

---

---

## INDICE

---

---

### RESUMEN Y OBJETIVOS

### CAPÍTULO I. ELIMINACION DE CARBONO Y NITROGENO EN AGUAS RESIDUALES

	pg
1.1.- Introducción.....	2
1.2.- Eliminación de carbono por digestión anaerobia.....	4
1.2.1.- Acidogénesis y acetogénesis.....	5
1.2.2.- Metanogénesis.....	6
1.3.- Eliminación de nitrógeno.....	8
1.3.1.- Eliminación de nitrato y nitrito por medios fisico-químicos.....	8
1.4.- Reactores utilizados en el proceso desnitrificante.....	15
1.5.- Bacterias desnitrificantes.....	16
1.6.- Aspectos bioquímicos.....	17
1.7.- Factores ambientales.....	28
1.8.- Aspectos cinéticos.....	34
1.9.- Interacción entre la desnitrificación, RDNA y metanización.....	39

### CAPÍTULO II. MATERIAL Y METODOS

2.1.- Métodos analíticos.....	45
2.1.1.- Determinación de nitrato y nitrito.....	45
2.1.2.- Determinación de Nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ).....	48
2.1.3.- Determinación de $\text{CH}_4$ .....	49
2.1.4.- Determinación enzimática de glucosa.....	50
2.1.5.- Determinación de sólidos suspendidos totales y volátiles.....	51
2.2.- Reactores, inóculo y medios de cultivo.....	52

### **CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **EFFECTO DE LA GLUCOSA, METANOL Y ACETATO A TRES RELACIONES C/N SOBRE LA DESNITRIFICACION**

3.1.- Plan experimental.....	56
3.2.- Perfiles de formación de nitrito y amonio.....	57
3.3.- Perfiles de formación de metano.....	64
3.4.- Actividad metanogénica.....	67
3.5.- Conclusiones.....	68

### **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION.**

#### **COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE ENTRE LODO METANOGENICO Y DESNITRIFICANTE**

4.1.- Antecedentes.....	68
4.2.- Perfiles de nitrato, nitrito y amonio.....	69
4.3.- Velocidades específicas iniciales de eliminación de nitrato.....	75
4.4.- Conclusiones.....	77

### **CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSION.**

#### **EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA DESNITRIFICACION, EN CULTIVOS INOCULADOS CON LODOS METANOGENICOS**

5.1.- Condiciones experimentales.....	78
5.2.- Perfiles de nitrato, nitrito y amonio.....	78
5.3.- Porcentajes y velocidades de desnitrificación.....	81
5.4.- Conclusiones.....	84

**Referencias.**

**RESUMEN Y OBJETIVOS**

---

**CAPITULO I**

**ELIMINACION DE CARBONO Y NITROGENO EN AGUAS RESIDUALES**

## RESUMEN Y OBJETIVOS

La orientación de este trabajo esta definida en el área de tratamiento de aguas residuales, específicamente a aquellas altamente contaminadas por nitrógeno y materia orgánica. Se señala que este trabajo forma parte de un proyecto integral que propone la eliminación de compuestos nitrogenados. El proceso estudiado en este trabajo es la desnitrificación, el cual es un proceso fisiológico que muchos géneros de bacterias facultativas (Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas y enterobacterias) realizan cuando su entorno ambiental carece de oxígeno, a su vez estos géneros recuperando su metabolismo aerobio si las condiciones aerobias vuelven a recuperarse. Por lo que naturalmente es posible encontrar desnitrificantes potenciales en lodos aerobios, lagunas aerobias etc., pero habria también la posibilidad de encontrar flora desnitrificante en lodos provenientes de digestores anaerobios. La literatura cita escasos ejemplos de estudios de desnitrificación con lodos anaerobios y solo recientemente en los últimos tres años se han hecho más estudios al respecto. Se han ensayado condiciones desnitrificantes con lodos anaerobios de un digestor metanogénico y se observó que el potencial para desnitrificar con lodos anaerobios fue menor que el que tenía para reducir nitrato a amonio. Teniendo conocimiento de estos antecedentes se emprendió el trabajo en el que uno de los objetivos fue evaluar el efecto de la naturaleza de la fuente de carbono (glucosa, acetato y metanol.) y de la relación C:N (7.4, 3.7 y 1.85) sobre la desnitrificación, utilizando un inóculo desnitrificante. Todos los experimentos se hicieron en cultivos batch, a temperatura constante y condiciones experimentales debidamente definidas.

De los resultados obtenidos se derivó la selección de una fuente de carbono, con la que se evaluó el potencial desnitrificante a relación C:N 1.2 y concentraciones de 1000 a 4300 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l, tanto con lodos metanogénicos como con lodos desnitrificantes. El criterio de selección de la fuente de carbono para los siguientes experimentos, estuvo en función del efecto negativo sobre la desnitrificación, eligiéndose el sustrato con el que se obtuviera la peor respuesta de actividad desnitrificante, con la finalidad de que se

tuvieran condiciones virtualmente apegadas a la práctica real, en la que generalmente no se puede tener un influente con una fuente de carbono ideal para desnitrificar.

Con respecto a la actividad metanogénica, hay citas que señalan su total inhibición cuando hay presencia de nitrato o nitrito, lo cual pudo corroborarse a lo largo de este trabajo, sin embargo se pudo constatar por medio de un largo seguimiento de los gases generados en los cultivos desnitrificantes, que pasando hasta mínimo 100 horas de completa eliminación de nitrato o nitrito, podía observarse una recuperación de la actividad metanogénica. La simultaneidad desnitrificación-metanogénesis al menos en cultivos batch no fue observada, sin embargo la literatura cita la simultaneidad de ambos procesos en cultivos continuos, lo cual abre una línea de trabajo subsecuente a la aquí expuesta.

## I. ELIMINACION DE C Y N EN AGUAS RESIDUALES

### 1.1 Introducción

El incremento de los residuos urbanos e industriales, como las emisiones gaseosas, efluentes y residuos sólidos; ha generado problemas en el equilibrio ecológico de mantos acuíferos, suelos y la atmósfera. Específicamente los contaminantes del agua más importantes en magnitud y frecuencia son el carbono orgánico y el nitrógeno. Los sistemas biológicos y fisicoquímicos tradicionales de tratamiento de las aguas residuales tienen como objetivos la reducción de la materia orgánica y de los sólidos suspendidos. Es cada vez mayor el interés en la eliminación de concentraciones elevadas de nutrientes (nitrógeno y fósforo), responsables directos de la eutroficación de ambientes acuáticos. Las fuentes principales de contaminación de algunas formas nitrogenadas como amonio, nitratos y nitritos son de origen industrial y agrícola. Algunos ejemplos al respecto son la industria de los alimentos, como empacadoras de cárnicos y conserveras de pescado; la producción de fertilizantes, fabricación de explosivos, absorción de óxidos nitrogenados en equipos de lavado de aire y recuperación de combustible nuclear; efluentes del proceso de curtidurías, por mencionar algunos casos (Szpyrkowicz y col, 1991). La agricultura intensa ha provocado en las últimas décadas un incremento de nitrato en las aguas subterráneas (Hallberg, 1989; House of Lords, 1989; Kaplan y Magaritz, 1986; Freeze y Cherry, 1979) lo que representa un problema de salud, ya que la ingestión de agua contaminada con altas concentraciones de nitrato y nitrito está asociado con el desarrollo de metahemoglobinemia y cáncer gástrico (Bryson y Boeckman, 1989; Dorsch y col, 1984; Comly, 1945). Por esta razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica (SSPEUN) establecieron normas de calidad del agua. Los niveles fijados fueron 11.3 y 10 mg N-NO<sub>3</sub>/l, respectivamente.

En nuestro país aún no se realizan procesos de eliminación de nitratos y nitritos en las aguas residuales urbanas e industriales, por lo que la reglamentación sobre los límites permisibles de nitrógeno están confinados únicamente a la cantidad de nitrógeno amoniacal (Tabla 1.). Aunque todavía no haya sido advertido por las autoridades mexicanas en materia ambiental, en la actualidad existe la necesidad urgente de enfrentar y contrarrestar el daño ecológico que se origina día a día con la eutroficación de los acuíferos nacionales. Se citan en la Tabla 1 los límites permisibles de nitrógeno total en las descargas de aguas residuales, a cuerpos receptores provenientes de varias industrias, según normas oficiales mexicanas en materia de protección ambiental, (Diario Oficial de la Federación, 1993)

Tabla 1. Límites permisibles de nitrógeno total en las descargas de aguas residuales industriales.

Industrias	Límites máximos permisibles Nitrógeno amoniacal (mg/l)	
	Promedio diario	Instantáneo
Industria de matanza de animales y empacado de cárnicos.	20	30
Industria de fabricación de fertilizantes	30	40
Industria del hierro y del acero	20	30

Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos, (1993).

Es necesario desarrollar procesos biológicos de tratamiento de aguas para eliminar el carbono y nitrógeno del lugar donde cause problemas.

## 1.2 Eliminación del carbono por digestión anaerobia.

La digestión anaerobia es un proceso biológico en el que la materia orgánica es transformada a metano y dióxido de carbono en ausencia de oxígeno mediante la participación de microorganismos. En la digestión anaerobia pueden presentarse diferentes transformaciones bioquímicas como resultado de la actividad metabólica de varios grupos tróficos, que degradan una amplia gama de sustratos, quienes se han clasificado de acuerdo a su capacidad catabólica. Son cuatro los grupos principales:

- 1) bacterias hidrolíticas y fermentativas
- 2) bacterias acetogénicas
- 3) bacterias homoacetogénicas
- 4) bacterias metanogénicas

El primer grupo degrada polímeros y producen ácidos grasos volátiles (AGV); el segundo grupo forma hidrógeno y acetato a partir de ciertos AGVs y etanol; un tercer grupo que produce acetato a partir de  $H_2$  y  $CO_2$  y el cuarto grupo cataboliza el acetato a metano. La actividad coordinada de todas ellas asegura la estabilidad de la digestión anaerobia. En síntesis la digestión anaerobia es un proceso bioquímico en el que se distinguen dos fases, la hidrólisis y la gasificación. En la primera fase las bacterias transforman la materia orgánica en ácidos grasos para, posteriormente, ya en la segunda fase pasar a la gasificación, en la que se produce dióxido de carbono y metano. En la Figura 1.1 se esquematizan las principales fases de transformación de la materia orgánica. En primer lugar, las macromoléculas orgánicas (carbohidratos, lípidos y proteínas) son hidrolizadas por enzimas extracelulares hasta originar diferentes compuestos como, azúcares simples, ácidos grasos de cadena larga, y aminoácidos. En una siguiente fase actúan las bacterias fermentativas, que catalizan la formación de ácidos grasos volátiles y algunos alcoholes (ácido acético, butírico, propiónico y etanol, por mencionar algunos subproductos). Después actúan algunas bacterias especializadas en producir acetato a partir de los ácidos

grasos volátiles (AGVs),  $H_2$ , y  $CO_2$ . Finalmente a partir de éstos últimos se forma  $CO_2$  y metano como consecuencia de la actividad metanogénica bacteriana.

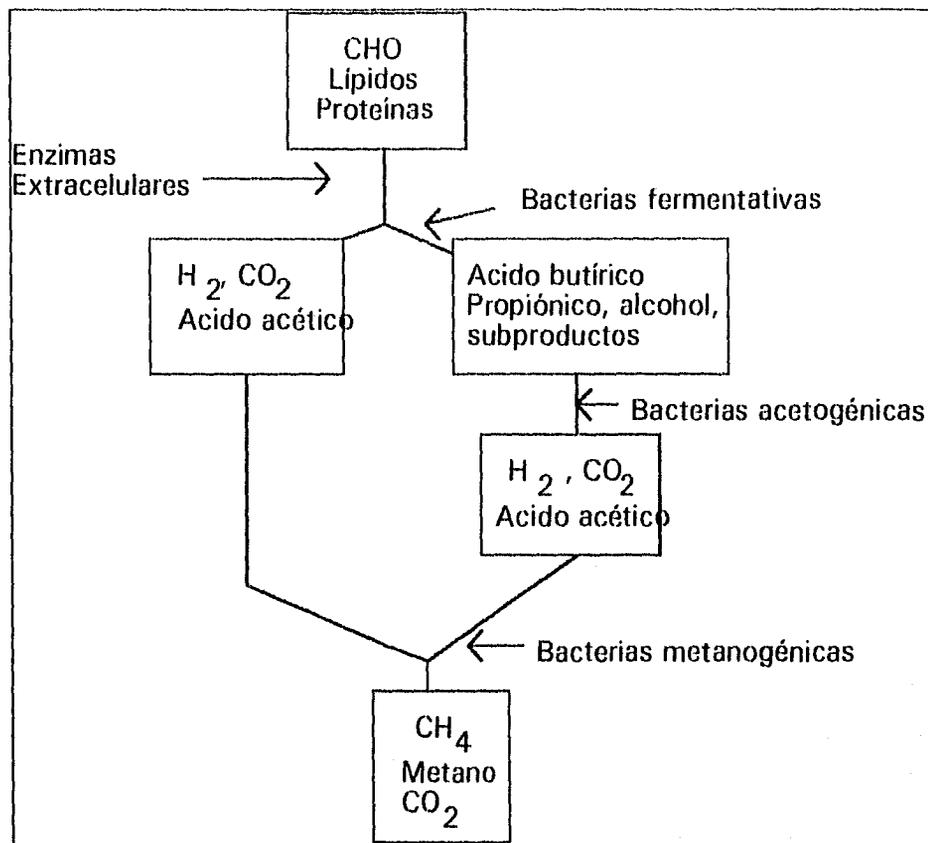


Figura 1.1 Fases generales relativas a la transformación microbiológica de compuestos orgánicos en un proceso anaerobio.

### 1.2.1 Acidogénesis y Fermentación

La acidogénesis es el fenómeno por el cual los carbohidratos y ácidos grasos de cadena larga son transformados a ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular. Las vías Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y Entner-Doudoroff son importantes en la descomposición de la glucosa en condiciones anaerobias, donde el producto terminal de la vía es el ácido pirúvico y desempeña un papel importante porque a partir de él se

inician las fermentaciones láctica, alcohólica y de ácidos grasos volátiles (bacterias fermentativas).

### Acetogénesis

La acetogénesis como ruta alterna a la acidogénesis fermentativa, consiste en la transformación de los productos de la primera etapa acidogénica, a acetato, CO<sub>2</sub>, ácido fórmico e H<sub>2</sub>. Existe un grupo de bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (BPOH); el etanol puede ser oxidado en acetato por un cultivo mixto de bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno (BAPH) y bacterias hidrogenofílicas. El propionato y butirato pueden ser oxidados a acetato y CO<sub>2</sub>. Otro grupo de bacterias autotróficas como *Acetobacterium woodii* o *Clostridium aceticum* utilizan un metabolismo "ácido homoacético", para la conversión de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en acetato.

La reacción balanceada es la siguiente:



### **1.2.2 Metanogénesis**

La metanización es el proceso de respiración anaerobio llevado a cabo por un grupo de arqueobacterias, en la que sustratos tales como el H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, formato, acetato, metanol, aminas metiladas y algunos compuestos sulfometilados, son reducidos a metano. El formato es el sustrato que utilizan aproximadamente la mitad de las especies metanogénicas pero el acetato es el precursor más importante del metano en la naturaleza. Como se puede observar en la Tabla 1.2 los cambios energéticos son bajos con respecto a los procesos aerobios.

Tabla 1.2-Rendimientos de energía de sustratos metanogénicos

Reacción	G (kJ/mol)
$4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-139
$4\text{HCOO}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{HCO}_3^-$	-127
$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-103
$4\text{CH}_3\text{NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{H}^+ \rightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{NH}_4^+$	-102
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-28
$(\text{CH}_3)_2\text{S} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 1.5 \text{CH}_4 + 0.5 \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$	-74

Zehnder y col., 1988.

### Flora Bacteriana Metanogénica.

Se han podido aislar nueve géneros de bacterias metanogénicas: *Methanobacterium*, *Methanotermus*, *Methanococcus*, *Methanocrobium*, *Methanogenium*, *Methanococcoides*, *Methanoplanus*, *Methanosarcina*, *Methanothrix* y *Methanolobus*.

Morfológicamente las metanogénicas exhiben una gran variedad de formas y tamaños como cocos, bacilos, espirilos y sarcinas, que pueden ser Gram-positivos o Gram-negativos. No obstante, la naturaleza química de la pared celular difiere al de las eubacterias, ya que no contiene mureína sino más bien una pseudomureína (Kandler y Hippe, 1977).

### Enzimas participantes en el transporte de electrones.

Los estudios bioquímicos indican que el mecanismo de transporte de electrones a  $\text{CO}_2$  durante la metanogénesis, es diferente a otros procesos respiratorios anaerobios, como la desnitrificación y la reducción de sulfato a sulfuro. Un sistema ordinario de transporte de electrones puede incluir citocromos, flavinas y quinonas, los cuales no existen en la metanogénesis. De ser así la síntesis de ATP, podría ocurrir en una especie de proceso de fosforilación por transporte de electrones. Un componente del transporte que ha sido

identificado en las bacterias metanogénicas es el factor 420 (F<sub>420</sub>) una coenzima de peso molecular 630, fluorescente azul-verde, que posee una fuerte absorción a 420 nm en su forma oxidada. Otras coenzimas encontradas en las metanogénicas son la F<sub>430</sub> que es un tetrapirrol, que contiene níquel y la F<sub>342</sub>, que es una pterina denominada metanopterina. La F<sub>430</sub> sirve como grupo prostético de la metilcoenzima M reductasa en el paso final de la metanogénesis (Salamanca, 1992).

### 1.3 Eliminación de nitrógeno

Los sistemas más tradicionales de tratamiento de la contaminación por nitrógeno comprenden dos procesos biológicos: la nitrificación y la desnitrificación, ambos procesos son complementarios porque en la primera fase el amonio es oxidado a nitrito y a nitrato, los cuales sufren una reducción hasta N<sub>2</sub> por medio del proceso desnitrificante (Johnson y Schroeffer, 1964; Wuhrmann, 1964; Ludzack y Ettiger, 1962). Las condiciones ambientales de las microfloras nitrificantes y desnitrificantes son opuestas, por ejemplo, las bacterias responsables de la nitrificación, las amonio oxidantes y nitrito oxidantes (por ejemplo, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*), son litótrofas, aerobias estrictas, aportan protones al medio. En cambio, las bacterias facultativas pueden desnitrificar en condiciones anóxicas, nutricionales heterotróficas y producen iones <sup>-</sup>OH por lo que el pH tiende a ser básico.

#### 1.3.1 Eliminación de nitrato y nitrito por medios fisico-químicos y biológicos

Existen técnicas fisico-químicas de eliminación de nitrato y nitrito que se han propuesto para el tratamiento de aguas subterráneas de uso doméstico. Algunas de estas técnicas son: intercambio iónico, reducción química, ósmosis inversa y electrodiálisis (Sonthaimer

y Rohmann, 1984; Sorg, 1979), pero únicamente las técnicas de intercambio iónico y desnitrificación biológica son consideradas factibles de llevar a cabo en gran escala.

La desnitrificación biológica es un método barato y eficaz para el tratamiento de la contaminación de las aguas por la presencia de nitratos. En la Tabla 1.3 se muestran las vías metabólicas por las cuales el nitrato se reduce a  $N_2$  y en ocasiones a  $NH_4^+$ . El conocimiento de los mecanismos de regulación bioquímica pueden ser un factor importante que determinen la orientación de la desnitrificación, o bien la reducción desasimilativa mediante la formación de  $NH_4^+$ . A diferencia de la reducción de nitrato asimilativa en la que se forma el mismo producto ( $NH_4^+$ ), el fin terminal de este último es proveer a la célula de nitrógeno para la síntesis de compuestos estructurales y funcionales. En cambio el metabolismo desasimilativo del nitrato a amonio (RDNA), la célula no utiliza el amonio para requerimientos biosintéticos, mas tarde se tratará con mayor detalle los aspectos bioquímicos de la RDNA.

Tabla 1.3- Asimilación y desasimilatorio nitrato.

Proceso	Ruta	Regulado por	Organismos responsables
<u>Mecanismo asimilatorio</u>			
Reducción asimilatoria de nitrato	$NO_3, NO_2, NH_4$	$NH_4, N$ -orgánico	Plantas, Hongos, Algas, Bacterias
<u>Mecanismos desasimilatorios</u>			
Desnitrificación	$NO_3, NO_2, N_2O, N_2$	$O_2$	Bacterias aerobias, que pueden crecer en anaerobiosis con $NO_3$ , y $NO_2$ .
Reducción desasimilatoria de nitrato a amonio	$NO_3, NO_2, NH_4$	$O_2$	Bacterias anaerobias y facultativas.

(Tiedje, 1988).

**Fuente de carbono y relación C/N**

Las aguas residuales tratadas con sistemas de lodos activados, y digestión anaerobia carecen de carbono orgánico para llevar a cabo el proceso de desnitrificación, en el caso de haber necesidad de eliminar nitrato. Si así fuese se tendrá en consideración la adición de una fuente de carbono asimilable para que aumente la velocidad de desnitrificación (Payne, 1981; Knowles y col., 1983; Tam y col., 1992).

Los requerimientos macronutricionales necesarios para la biosíntesis celular son C, H, O, N, P y S, en tanto que los micronutrientes son K, Na, Mg, Ca, y Fe. En ocasiones es necesaria la adición de Mn, Zn, Cu, Co y Mo (Champ y col., 1979). Las relaciones favorables de C/N/P/S de acuerdo a la composición celular promedio puede ser de 100:20:4:1 (Spector, 1956). Se deberá añadir suficiente carbono no solo para satisfacer las necesidades biosintéticas (al menos 30% más del carbono calculado), sino además para proporcionar electrones suficientes para reducir el nitrato hasta nitrógeno molecular.

La concentración de carbono necesaria para efectuar la desnitrificación, sin limitaciones, variará en función de la naturaleza de la fuente de carbono. Skrinde y col., (1982) encontraron que la eficacia de eliminación de nitrógeno con valores crecientes de la relación DQO/N. Sin embargo, para cada sustrato orgánico es diferente el valor de la relación C/N, con el que se obtiene los máximos porcentajes de eliminación de nitrato.

Es posible que la desnitrificación se pueda dar con la materia orgánica y su tipo cualitativo, almacenada en los microorganismos, pudiendo incrementarse la velocidad con respecto a las velocidades de desnitrificación endógenas. Conviene enfatizar que la cantidad de materia orgánica necesaria para la desnitrificación depende del compuesto de carbono utilizado, de la cantidad de energía que posee el compuesto y de la afinidad que exista entre la materia orgánica y los microorganismos.

El metanol por excelencia, ha sido el sustrato más utilizado como fuente de carbono para el proceso desnitrificante, sin embargo la toxicidad del metanol, unido al aumento del

precio del petróleo ha provocado que el metanol deje de ser una fuente de materia orgánica barata, lo que ha hecho necesaria la búsqueda de fuentes de carbono alternas. En la Tabla 1.4 se muestran las relaciones C/N con sustratos, como metanol, acetato, etanol y glicerol para llevar a cabo la desnitrificación.

Tabla 1.4- Diferentes relaciones C/N para desnitrificar con diferentes sustratos.

SUSTRATO	RELACION C/N	REFERENCIA
Metanol	0.93	McCarty y col., 1969
Metanol	0.93	Blaszczyk, 1983
Metanol	1.1-1.2	Pickard, 1987
Metanol	1.2-1.3	Koopman, 1990
Metanol	0.57	Blaszczyk, 1983
Acetato	1.7	Dodd y co., 1975
Acetato	1.32	Blaszczyk y col., 1981
	0.83	Blaszczyk, 1983
Acetato	1.5	Ketellaper, 1988;
Acetato	1.5	Fernández Llorente, 1989
Etanol	1.04	Blaszczyk, 1983
	0.67	Blaszczyk, 1983
Etanol	1.125-1.25	Hamon y col., 1991
Etanol	2.0	Mycielski y col., 1983
Etanol	2.01	Bringman y col., 1959
Etanol	1.6	Green y col., 1994
Glicerol	1.0	Grabinska-Loniewska y col., 1985

Bitton y Gerba, (1984) propusieron que la relación C/N requerida para efectuar la desnitrificación hasta una eficiencia entre 80-90% fue de 1. Grabinska y col., (1985) también encontraron que la relación C/N 1 fue la mejor en estudios con unidades biocénóticas desnitrificantes. En éste último caso la fuente de carbono y donador de electrones fue el glicerol. Parece ser que las bacterias desnitrificantes pueden emplear una gran variedad de compuestos orgánicos, tales como los carbohidratos, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos, pero con eficacias distintas. Akuna y col., (1992) encontraron otros tipos de comportamientos en función de la relación C/N, cuando utilizaron glucosa como fuente de carbono; encontrando tres comportamientos distintos:

- 1).- Desnitrificación a  $C/N \leq 3.5$ , en donde la mejor relación para la eliminación de nitrato es 3.5 y para el nitrito de 2.6.
- 2).- Desnitrificación y producción de metano:  $3.5 < C/N < 21.3$ . La cantidad de metano fue mayor cuanto mayor fue la relación C/N.
- 3).- Producción de metano sin desnitrificación:  $C/N > 21.3$ , a medida que la relación C/N aumentó, la amonificación se incrementó y la desnitrificación disminuyó. Cuando la relación C/N fue igual a 42, la amonificación es total, aunque esta actividad se relaciona con el tipo de fuente carbonada (glucosa).

Hay evidencias de que la glucosa puede contribuir al crecimiento de las bacterias amonificantes (Kuroda y col., 1988), cabe aclarar que se entiende como bacterias amonificantes a aquellas que tienen la capacidad de reducir el nitrato a amonio por la vía desasimilativa; por ejemplo algunas especies del género *Clostridia* y ciertas bacterias sulfato reductoras. Otro factor que pudiera contribuir a la formación de amonio es la presencia de bacterias sulfato reductoras en los lodos, debido a que éstos pueden reducir nitrito a amonio, especialmente en aguas que contengan poco sulfato (Tiedje, 1988)

La eficacia de la glucosa como fuente de electrones en la desnitrificación, varía entre el 10 y 100% (Tam y col, 1992; Manoharan y col, 1989; Wilderer y col, 1987), debido a que

favorece el crecimiento de bacterias facultativas a expensas de las verdaderas desnitrificantes. Tam y col., (1992) sugirieron que el acetyl-CoA -compuesto clave en las vías catabólicas glicolítica y de los ácidos tricarbóxicos- que se forma a partir de acetato, podría ser una fuente de carbono directa, no así el metanol o glucosa en la desnitrificación. Esta sugerencia esta apoyada por otros investigadores que encontraron mayores velocidades de desnitrificación con acetato, que con metanol (Andersson y Rosen, 1990; Winter y col., 1989; Gerber y col., 1987.).

En un estudio (Akuna, 1993) en el que se compararon diferentes fuentes de carbono (glucosa, acetato, lactato o metanol) para efectuar la desnitrificación con lodos de un digestor anaerobio, encontraron que la mejor relación C/N fue inferior en cultivos con acetato y lactato, que con glucosa o glicerol, debido probablemente, a que con estos últimos se produjo amonio, lo que puede indicar que los formadores de amonio no utilizan ácidos grasos volátiles para llevar a cabo la reducción desasimilatoria de nitrato a amonio. Una observación importante sugiere que la amonificación y fermentación toman lugar simultaneamente cuando la fuente de electrones es glucosa.

Algunas observaciones de Turk y Mavinic, 1987 condujeron a concluir que un sistema microbiano que fue adaptado para desnitrificar con nitrito, será incapaz de realizar este proceso cuando se sustituya el nitrito por nitrato, no así lo contrario.

Dado el nivel de la carga orgánica en las aguas residuales, así como su composición química con gran diversidad de compuestos, son per se medios de cultivos. Esto disminuye la necesidad de tener que balancear nutricionalmente el influente. De ser así, algunas de las ventajas son:

- 1.- Reduce la cantidad de residuos que la industria debe tratar.
- 2.- Reduce los costos de operación y mantenimiento.

Algunas de las características que debe cumplir un agua residual o un subproducto para ser utilizada como fuente de carbono son:

- a).-Alto contenido en carbono, para aminorar los gastos de transporte y las cargas hidráulicas.
- b).-Composición uniforme y cercanía a la planta para evitar problemas de transporte.

En la Tabla 1.5 se citan algunos tipos de aguas residuales utilizadas para llevar a cabo la desnitrificación.

Tabla 1.5.- Tipos de aguas residuales utilizadas para desnitrificar.

Tipo de Aguas residuales	C/N	Referencia
Agua de cocina	próxima a 4	Biswas y col, 1985
Excretas de cerdo	3,23	Haga y co., 1989
Melazas azucareras	7	Bosman y col., 1978
Melazas azucareras	5	Çeçen y col., 1992
Derivados del ensilaje de forraje de maíz	-	Skrinde y col., 1982
Levaduras de fábrica de cerveza	-	"
Suero de leche	-	"
Licor de sulfito de papelera	-	"
Aguas residuales urbanas	5-7	Jiménez y col., 1984

Skrinde y col, (1982), encontraron los mejores resultados al desnitrificar con tres tipos de aguas residuales, las cuales se citan en la Tabla 1.5. Cuando se utilizó el suero de leche el rendimiento no fue mayor que el 83%, por citar un caso. Las relaciones DQO/N recomendadas estuvieron próximas a 3, además de que se encontró una dependencia lineal entre la relación DQO/N y la velocidad de desnitrificación por debajo de la citada relación.

#### 1.4 Reactores desnitrificantes

##### Reactores biológicos utilizados para la eliminación de nitrógeno.

Se han aplicado varias tecnologías en el tratamiento de aguas residuales y aguas de pozo contaminadas con nitratos. Los reactores utilizados para estos estudios son de alimentación continua, y las concentraciones de nitrato varían ampliamente desde 13.8 a 1560 mg N-NO<sub>3</sub>/l, mismas que señalan en la Tabla 1.6. Klapwijk y col., (1981), utilizaron un reactor de lecho de lodos de flujo ascendente. Francis y Callahan, (1975) e Ibrahim, (1978) sugieren la utilización de reactores de biopelícula fija para el tratamiento de aguas residuales altamente contaminadas con nitrato (500-5,000 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>mg/l), provenientes de plantas de producción de óxido de uranio. Una alternativa más es la utilización de reactores de lecho empacado (Błaszczuk y col., 1981). Existen varias publicaciones relacionadas con estudios de eliminación de nitrógeno en diferentes tipos de reactores, que se muestran en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6 Reactores utilizados para desnitrificar y sus respectivas concentraciones. Lecho de lodos de flujo ascendente (LDLFA).

Tipo de Reactor	Concentración mg N-NO <sub>3</sub> /l	Sólidos suspendidos volátiles g/l	Referencia
Lecho fluidificado	19.5	-	Hall y Zabel, 1984
L.D.L.F.A	1560	30	Klapwijk y col, 1981
L.D.L.F.A	220-670	0.1	Gnabinska-Lazniowska y col., 1985
Reactor de película fija	18.1	-	Gros y col, 1986
Nitrazur	16.3	-	Richard, 1989
Biodenit	14.7	-	Rogalla y col., 1990
Reactor de mezcla completa	13.8	2.5	Szpyrkowicz y col., 1991

### 1.5 Microorganismos Desnitrificantes

Los microorganismos que participan en la desnitrificación son generalmente bacterias heterótrofas facultativas, las cuales en condiciones anaerobias, utilizan las formas oxidadas de nitrógeno (nitrato y nitrito) como aceptores últimos de electrones. Estas bacterias son bioquímica y taxonómicamente muy diversas (Knowles, 1982), como ejemplo, pueden citarse a *Pseudomonas sp* y *Nuerospora*, que son bacteria y hongo, respectivamente.

En la Tabla 1.7 se mencionan algunos de los géneros y especies de bacterias que desnitrifican en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Tabla 1.7.-Flora microbiana responsable de la desnitrificación

Bacterias	Referencia
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Kakutani y col.,(1981)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fabig y col., (1979)
<i>Achromobacter</i>	Smith y col., (1972)
<i>Bacillus</i>	Smith y col., (1972)
<i>Hyphomicrobium spp.</i>	Nurse, (1980)
<i>Tiobacillus denitrificans</i>	Sikora y Keeney, (1976)

Las bacterias desnitrificantes frecuentemente más comunes son los géneros de *Pseudomonas* seguidas por algunas *Acalligenes*. El predominio de las *Pseudomonas* parece ser debido a su versatilidad y la competencia por la fuente de carbono, tanto en hábitats terrestres, como en acuosos. Para tener idea de la gran variedad de la flora desnitrificante que existe en la naturaleza se señala que pueden utilizar poder reductor orgánica e inorgánica pero los sustratos orgánicos son la fuente más común. (Tiedje, 1988). Por ello los nichos ecológicos de donde se les puede aislar son también variados localizados en sistemas terrestres (suelos y rizósfera) y en sistemas acuáticos (sedimentos marinos, lacustres y estuarios).

En los sistemas de tratamiento de aguas diseñados para la eliminación de nitrato por desnitrificación y que han sido alimentados con metanol, se encontró que predomina el

género *Hyphomicrobium*, el cual consume especialmente compuestos orgánicos de un solo carbono (Meiberg y col., 1980).

### 1.6.- Aspectos Bioquímicos

El proceso global de desnitrificación de forma general es:



Donde:

$A_{\text{red}}$ : compuesto químico en su estado reducido (fuente de electrones)

$A_{\text{ox}}$ : compuesto químico oxidado

$\alpha$ ,  $\beta$ , X, y Y son coeficientes estequiométricos

Las condiciones principales para que se efectúe la desnitrificación son las siguientes:

- 1).-La presencia de materia oxidable que actué como fuente de electrones.
- 2).-Condiciones anaerobias
- 3).-El nitrógeno debe encontrarse como nitrato o como nitrito.

### Enzimas participantes en la desnitrificación

En *Paracoccus denitrificans* se ha estudiado la secuencia de reducción de nitrato en la que intervienen enzimas reductasas (Boogerd y Stouthamer, 1980; Porte y Vignais, 1980; John y Whatley, 1975). Las enzimas participantes son las nitrato reductasa (NR), nitrito reductasa (NIR), nitrito óxido reductasa (NOR) y óxido nitroso reductasa (N<sub>2</sub>OR). En la Figura 1.2 se muestra un modelo de la vía en donde se observa que los electrones son transportados por los citocromos b y c al oxígeno, pero en condiciones de anaerobiosis, son dirigidos a los óxidos de nitrógeno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO, N<sub>2</sub>O). La enzima nitrato reductasa puede ser de tipo A (participante del metabolismo desasimilatorio, o del tipo B (proceso asimilatorio), ambas proteínas son diferentes y codificadas por diferentes genes

(Payne, 1973; Pichinoty, 1973). La nitrato reductasa desasimilatoria de las desnitrificantes es similar a otras nitrato reductasas desasimilatorias en cuanto al contenido de hierro, azufre y molibdeno (Stouthamer, 1976). La enzima esta asociada a membrana y esta implicada en la conservación de la energía. En *Paracoccus denitrificans*, la NR y citocromos de membrana estan corregulados y la actividad enzimática parece tener un papel en la regulación de su propia síntesis (Calder y col., 1980; Stouthamer, 1976).

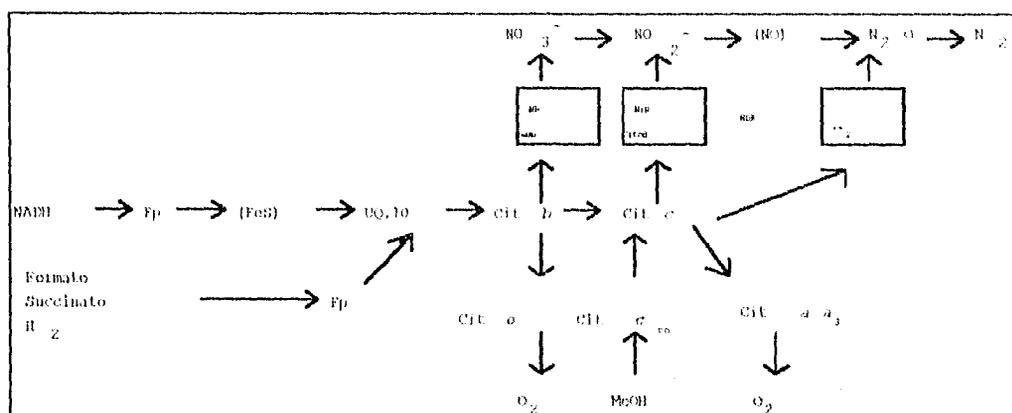


Figura 1.2.- Modelo de la vía de transporte de electrones más probable en *Paracoccus denitrificans* (modificado de referencias citadas). NRD, nitrato reductasa; NIR, nitrito reductasa; NOR, óxido nítrico reductasa; N<sub>2</sub>OR, óxido nitroso reductasa; Fp, flavoproteína; FeS, sulfuro de hierro; UQ-10, ubiquinona-10; Cyt, citocromo; Mo, molibdeno; MeOH, metanol.

La enzima nitrito reductasa (NIR) ha sido purificada de diferentes bacterias y parece haber dos tipos principales. Primero una hemoproteína de citocromo tipo *cd*, la cual puede también tener actividad de citocromo oxidasa (Lam y Nichola, 1969; Sawhney y col., 1978).

### Bioquímica de la reducción desasimilativa de nitrato a amonio (RDNA): Formación de $\text{NH}_4^+$

La rápida reducción de nitrato a amonio por bacterias fermentativas está bien documentada desde hace algunos años (Woods, 1938). Existen dos tipos de enzimas nitrato reductasa caracterizadas por bacterias que reducen nitrito a amonio. (ver Figura 1.3). Una de ellas fue purificada a partir de *Clostridium* y el otro tipo de enzima fue obtenida de la membrana de *E. coli* o *Klebsiella aerogenes* (este tipo de enzima fue similar a la correspondiente enzima desnitrificante).

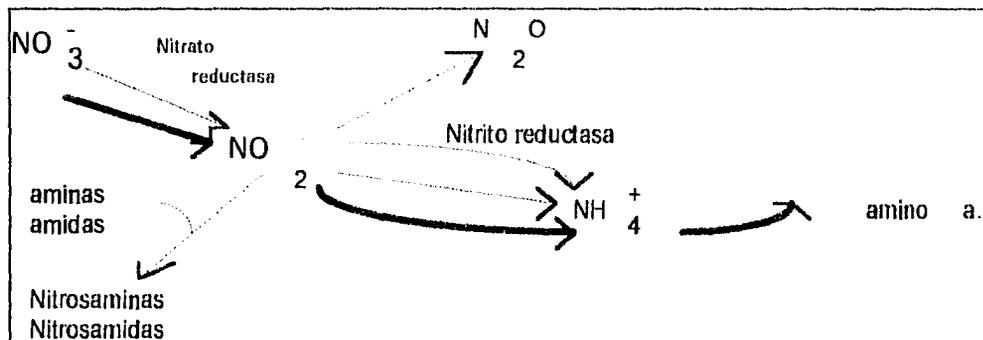


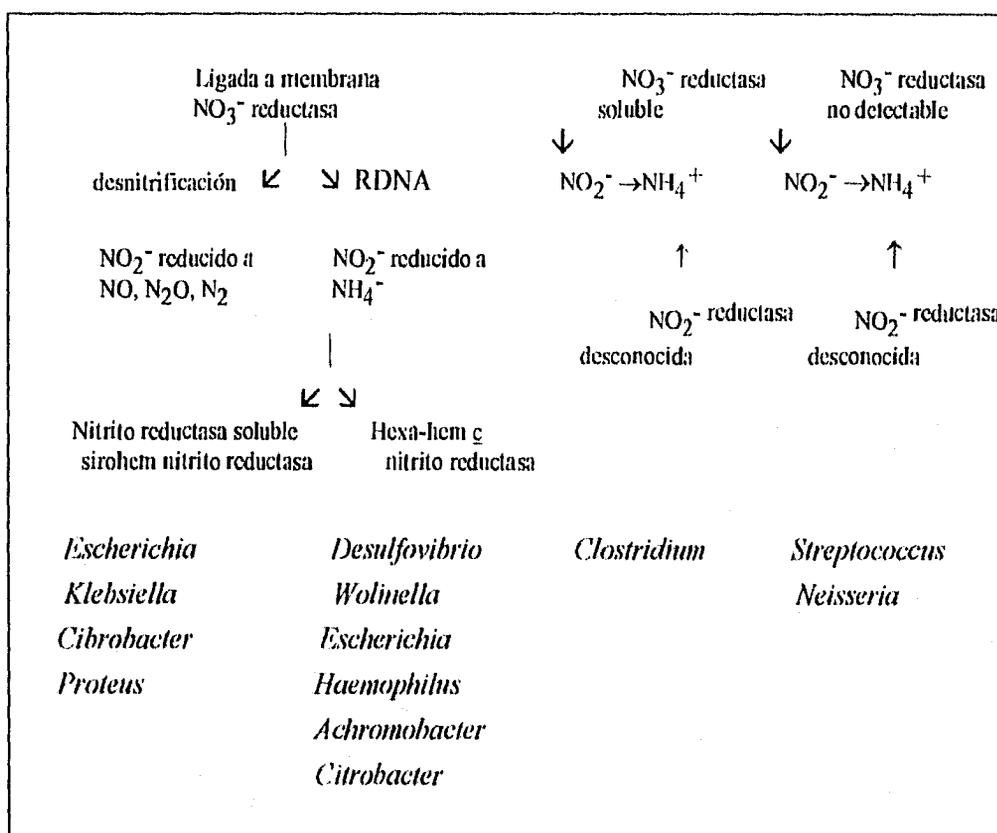
Figura 1.3. Reducción de nitrato y nitrito por enterobacterias (Cole, 1991). desasimilación anaerobia, ( $\rightarrow$  -.-.- $\rightarrow$ ); asimilación del nitrato ( $\Rightarrow$ ); otras vías, (--- $\rightarrow$ ).

En la membrana citoplasmática parece ser que se efectúa la donación de electrones por NADH, (nicotinamida dinucleótido reducido) o por formato, hacia las tres o cuatro subunidades compartimentalizadas en la membrana citoplasmática, las cuales a su vez los donan al nitrato intracelular. Los mecanismos de cómo el nitrato entra a la bacteria ni cual es el papel del formato o NADH dependiente en la reducción del nitrato no están aún claros (Cole, 1991).

Como se observa en la Figura 1.3 hay al menos dos rutas bioquímicas y genéticamente diferentes para la producción de amonio, una de ellas encontrada únicamente en la familia *Enterobacteriaceae*, la cual comprende una enzima citoplasmática soluble. Por otro lado,

la vía de mayor distribución es la reducción electrogénica por un Cit *c* hexa-hem (citocromo *c*) que actúa a nivel de periplasma (Cole, 1989, 1988; Fujita y Sato, 1976; Cole, 1968). Por ahora no hay datos suficientes para saber si hay otros tipos de nitrito reductasas que catalicen la formación de amonio encontradas en bacterias anaerobias obligadas como clostridias, lactobacilos, estafilococos, estreptococos, corinebacterias, flavobacterias o neiserias, las que reducen el nitrito. En la Tabla 1.8 se muestra la gran diversidad de enzimas que intervienen en la reducción desasimilativa de nitrato y nitrito en diferentes grupos bacterianos.

Tabla 1.8 Subgrupos de bacterias que reducen nitrato a amonio basado en las diferencias bioquímicas de la enzimas participantes en la reducción del nitrato y nitrito.

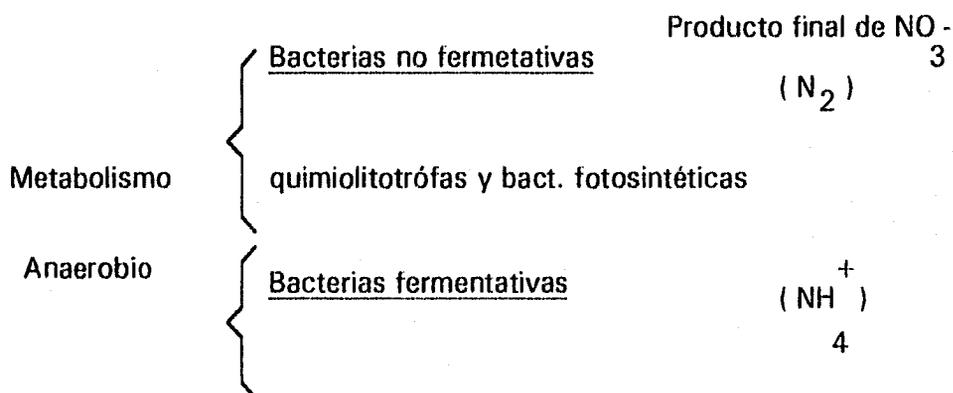


(Cole, 1991).

Aparentemente todas las bacterias que son capaces de reducir nitrato, lo son también para reducir al nitrito, aunque lo inverso no es del todo cierto ya que en algunas especies capaces de reducir nitrito, es decir, que tienen actividad nitrito reductasa, están desprovistas de actividad nitrato reductasa (Forsythe y col., 1988). Por otro lado muy pocas especies tienen la doble capacidad de desnitrificar y reducir nitrato a amonio como *Pseudomonas putrefactens* estudiada por Samuelsson (1985).

Según estudios de Wimpenny y Warmsley (1968), los organismos que utilizan al nitrato como último aceptor de los electrones, lo hacen mediante reacciones similares a las utilizadas por los microorganismos que donan los electrones al oxígeno, es decir, que proceden a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos, que generan NADH. En cambio los organismos fermentativos, al igual que las enterobacterias, parece ser que metabolizan piruvato preferentemente a formato durante el crecimiento anaerobio, independientemente si el nitrato está o no presente. El formato es un excelente donador de electrones para la reducción de nitrato (Wimpenny y Cole, 1967).

En el esquema siguiente se muestran los productos finales del nitrato dependiendo del tipo de bacterias y sustrato presentes en el medio



La regulación enzimática de la síntesis de la nitrato reductasa en *Escherichia coli*, parece ser que depende de dos mecanismos, la represión por oxígeno o inducción por sustrato durante el crecimiento anaerobio. Un mecanismo dual similar también regula la síntesis de nitrito reductasa.

### **Acumulación de nitritos**

Frecuentemente se observa la acumulación de nitritos en el proceso desnitrificante. Se han hecho varios estudios orientados a esclarecer los factores que la controlan. Las observaciones al respecto señalan una gran cantidad de factores, entre los que pueden destacarse las especies microbianas que participan en el proceso, la composición del medio, la naturaleza de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el tipo de reactor, la forma de alimentación (continua o discontinua), entre otras (Hamon y col., 1991).

Se distinguen tres modelos de desnitrificación expresados por tres diferentes especies de bacterias, los cuales se enumeran a continuación (Blaszczyk, 1992; Blaszczyk y col., 1981)

1.- Reducción de nitrato sin acumulación de nitrito. La acumulación de nitrito sólo se presenta a partir de una determinada concentración de nitratos. Almeida y col., (1993) observaron que no se acumulaba nitritos aún cuando la concentración de nitrato llegaba hasta a 800 mg/l.

2.- Gran acumulación de nitrito. Una vez que todo el nitrato se ha reducido a nitrito, da comienzo la reducción de éstos últimos (Almeida y col., 1993; Lewadowskis, 1985). El nitrato puede inhibir la reducción de nitrito, aún después de haber comenzado dicha reducción, ya sea de forma total o bien de forma momentánea, lo que dependerá de cada especie bacteriana (Blaszczyk y col., 1981).

3.- Reducción de nitrato a nitrito con una pequeña acumulación de nitritos.

Con el objetivo de explicar la acumulación de nitritos, los investigadores han formulado las siguientes conclusiones de sus respectivos trabajos experimentales:

- 1.- Diferente concentración de nitrato y nitrito reductasas (Kristensen y col., 1991; Betlach y Tiedje, 1981; )
- 2.-- Inhibición de la nitrito reductasa por el nitrato, debido a la competencia por los electrones (Almeida y col., 1993).
- 3.- Inhibición de la óxido nítrico reductasa por el nitrato, hecho que precede a la inhibición de la nitrito reductasa por la acumulación de óxido nítrico. La reducción de nitrato y de nitrito se inicia con la síntesis de las reductasas apropiadas (Payne y col., 1969).
- 4.- Se ha encontrado que en sistemas de nitrificación-desnitrificación *Nitrobacter sp.* podría catalizar la reacción inversa a la de nitrificación en condiciones anóxicas, provocando la acumulación de los nitritos (Bock y col., 1983).
- 5.- Beccari y col., (1983), comprobaron que a concentraciones elevadas de nitrato se acumulaban nitritos debido a la presencia de ácido nitroso libre. En algunos casos a medida que aumenta la concentración de nitratos en el influente, la acumulación de nitrito es mayor. Cuando la concentración de nitrato en el influente está entre 3 y 4 g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l, prácticamente todo el nitrógeno sale en el influente en forma de nitrito (Mycielski y col., 1985).

Sobre el efecto de la fuente de carbono en la acumulación de los nitritos, Blaszczyk (1993), observó que cuando desnitrificaba con caldo de nutrientes difco enriquecido con nitrato potásico no se producía la acumulación de los nitritos, debido a las actividades paralelas y equilibradas de las reductasas de nitratos y de nitritos, la inducción de ambas reductasas ocurría simultáneamente, o en una sucesión rápida. Con metanol, acetato o etanol, la inducción de nitrato reductasa en algunos lodos es rápida, a diferencia de la inducción de la nitrito reductasa que puede retardarse varias horas e incluso días, con la

consecuente acumulación de nitritos, aunque en otros casos los resultados no son similares.

Algunos autores justifican la acumulación de nitrito con base en las velocidades de reducción de los nitratos y de los nitritos. Los nitratos se reducen a mayor velocidad que los nitritos, provocando la acumulación de estos últimos (Almeida y col., 1993; Wilderer y col., 1986). Tiedeje (1981), aplicando el modelo de Michaelis-Menten, encontró evidencias que apoyan la idea de que la diferencia de velocidades de reducción sea la causa de la acumulación de nitrito, debido a que la velocidad máxima de reducción del nitrato es cinco veces mayor que la del nitrito, lo que explica que el nitrito se acumule casi en cantidades estequiométricas.

Existen evidencias de que la acumulación de nitritos está en función del tipo de bacterias que proliferen en el reactor desnitrificante, comprobándose que las bacterias anaerobias facultativas catalizan la reducción de nitrato hasta nitrito, pero no reducen el nitrito, mientras que las bacterias realmente desnitrificantes reducen el nitrito hasta nitrógeno gaseoso (Cole, 1991). Las condiciones de cultivo permiten la proliferación de bacterias anaerobias facultativas, que ocasiones, son las únicas responsables de la acumulación de los nitritos. La cantidad de nitritos acumulados y el tiempo que estos tardan en eliminarse en algunos sistemas, podría depender de la proporción entre las bacterias anaerobias facultativas y las realmente desnitrificantes, pero habrá que hacer los estudios correspondientes. Las bacterias de respiración fermentativa pueden crecer a mayor velocidad que las realmente desnitrificantes y muchas veces a expensas de estas, especialmente en ambiente anóxico por el tipo de vía respiratoria (Wilderer y col., 1987; Mycielski y col. 1985; Blaszczyk y col., 1981; ).

Cuando la alimentación en un proceso desnitrificante consiste de almidón, se observa que el número de bacterias desnitrificantes depende de la relación de almidón a nitrato presente

en el medio. En determinadas concentraciones de almidón crecen bacterias fermentativas que reducen el nitrato, pero no el nitrito (Mycielski y col., 1985). Blaszczyk, (1993) afirma que la acumulación de nitrito depende, en muchos casos, de un equilibrio apropiado entre la concentración y tipo de fuente de carbono y la concentración del nitrato.

Se ha puesto de manifiesto que la acumulación de nitritos depende del tipo de reactor utilizado y de las condiciones hidrodinámicas del sistema. Almeida y col., (1993) observaron que la acumulación de nitritos es mayor en los reactores que operan con células inmovilizadas. Kone y col., (1981), y Requa y Schroeder (1973), comprobaron que la acumulación fue independiente de la forma de alimentar al reactor y que dependía más de otros factores, como los ambientales o las inhibiciones.

## **1.7 Factores Ambientales**

### **Efecto del Oxígeno**

Las concentraciones de oxígeno a partir de las cuales la desnitrificación cesa, depende de las condiciones en las que se realice el proceso, del tipo de reactor utilizado, de las especies bacterianas involucradas en la desnitrificación, como principales factores (Misra y col., 1974; Krul, 1977; Hochstein y col., 1984; Robertson y col., 1984).

Existen evidencias del efecto del oxígeno tanto en la síntesis (represión) como en la actividad de la nitrato reductasa (inhibición). Cuando se utilizó *Klebsiella aerogenes* inicialmente en condiciones anaerobias, posteriormente en medio aerobio, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1.- Existe cese inmediato de la formación de nitrato reductasa.
- 2.- Existe cese de la producción de nitrito.
- 3.- Ocurre inactivación parcial de la enzima presente.

Un análisis de los resultados sugiere que la inactivación de la nitrato reductasa es debida a que los electrones transferidos por el nitrato son desviados de la ruta desnitrificante al sistema de transferencia de electrones del proceso respiratorio aerobio, por lo que la nitrato reductasa se oxida al no serle transferidos el par de electrones del nitrato.

Con respecto a la desnitrificación en medio líquido se tienen algunos estudios que sugieren que puede darse hasta alrededor de 0.5 mg/l (0.016mol/ml) de oxígeno disuelto (Wheatland y col., 1959), mientras que otros autores indican que el nitrato no es reducido a concentraciones de oxígeno disuelto de aproximadamente 0.2 a 0.4 mg/l, (0.0062 a 0.012mol/ml respectivamente) (Skerman y MacRae, 1957).

Se encontró que el producto final de la desnitrificación con *Paracoccus halodenitrificans*, dependía de la concentración de oxígeno presente en el sistema desnitrificante. Por ejemplo, cuando las condiciones fueron anaerobias, el producto final fue N<sub>2</sub>; cuando aumentaba la concentración de oxígeno se llegaba únicamente a óxido nítrico, un posterior aumento en la concentración de oxígeno, el proceso se acortaba hasta la obtención de nitrito y si se aumentaba aún más la cantidad de oxígeno, el nitrato se acumulaba. Tal parece que la reductasa de nitrato fue la menos sensible y la más sensible era la enzima óxido nítrico reductasa, incluso cuando la concentración de oxígeno no era detectable en disolución, la reducción a N<sub>2</sub> disminuyó (Holchstein y col., 1984).

### **Influencia del Potencial Redox**

Las reacciones biológicas de oxidación-reducción pueden seguirse a través de parámetros electroquímicos, como es el potencial redox. Es cual es un factor importante vinculado con la concentración de oxígeno en el líquido. La dificultad de utilizar el potencial redox como parámetro operacional está en la diferencia entre la concentración de oxígeno a nivel micro y macroambiental.

**pH.**

La influencia del pH es una variable fundamental en los procesos biológicos, por el efecto que tiene este sobre la bioquímica y fisiología (enzimas, membrana) de las células, y aún más cuando *in situ* hay producción de iones  $^{-}OH$ , como sucede en las reacciones que describen el proceso desnitrificante.

Está bien documentado los valores de pH en los que ocurre la desnitrificación, lo cual depende de las condiciones experimentales en las que se efectue éste. Por ejemplo, diferentes autores afirman que la desnitrificación es máxima cuando el pH está entre 7.0 y 9.0 (Edholm y col., 1970; Ide y col., 1972), en tanto que otros observaron que está entre pH 7.0 y 8.0 (Henze y Harremoos, 1977; Payne, 1981; Knowles, 1982; Hiscock y col., 1991).

**Temperatura.**

El efecto que tiene la temperatura sobre la desnitrificación biológica no es independiente de otros parámetros de operación (velocidad de carga, concentración de nitratos en el medio). A medida que aumenta la concentración de nitratos, la dependencia de la desnitrificación con la temperatura aumenta, y que al aumentar la temperatura aumentaba la velocidad de eliminación (Jewell y col., 1975). Henze, (1991) comprobó que la fuente de carbono utilizada y la temperatura determinaban la velocidad del proceso. También se observó que la dependencia de la desnitrificación con la temperatura es función de la edad del lodo activado y del régimen hidráulico de operación.

### 1.8 Aspectos Cinéticos

Crecimiento de biomasa y consumo de sustrato.

Como es sabido el crecimiento bacteriano dependerá de dos relaciones fundamentales: la velocidad de crecimiento bacteriano y la velocidad de utilización del sustrato. El modelo clásico que describe el efecto de la concentración de sustrato limitante sobre la velocidad de crecimiento microbiano es el modelo de Monod (ecuación 1)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (1)$$

Donde,  $\mu$  es velocidad de crecimiento específico, ( $t^{-1}$ );  $\mu_{\max}$  es la velocidad de crecimiento específico máxima, ( $t^{-1}$ );  $S$  es la concentración de sustrato limitante ( $mol/l$ );  $K_S$  es la constante de saturación (concentración de sustrato limitante para la cual la velocidad de crecimiento es la mitad de la máxima)

La velocidad de crecimiento bacteriano se define según la ecuación 2:

$$v_r = \mu X \quad (2)$$

$v_r$  es la velocidad de crecimiento bacteriano ( $mol\ t^{-1}\ l^{-1}$ ) y  $X$  es concentración de biomasa ( $mol\ l^{-1}$ ).

Combinando las Ecuaciones 1 y 2, se obtiene la relación que expresa la velocidad de crecimiento bacteriano en función de la concentración del sustrato, Ecuación 3:

$$v_r = \frac{\mu_{\max} X S}{K_S + S} \quad (3)$$

En el proceso de desnitrificación biológica, participan dos sustratos, el compuesto oxidado de nitrógeno y la materia orgánica, ambos pueden ser sustratos limitantes del proceso. Por lo que varios autores han modificado la ecuación de Monod para obtener una ecuación similar con dos sustratos y sus correspondientes constantes (Beccari y col., 1983; Engberg y Schroedder, 1975; Eramo y col., 1993; Watanabe y col., 1992; Sheng-Kun y col., 1991).

Cuando la concentración de sustrato en el medio es mucho mayor que  $k_s$  la ecuación de Monod queda reducida a una reacción de orden cero y cuando es inferior se reduce a una reacción de orden 1, siempre que sea despreciable la velocidad de muerte celular.

$$r = r_{\max} \quad \text{reacción de orden cero}$$

$$r = \frac{r_{\max}}{K_s} S = k_1 S \quad \text{reacción de orden 1}$$

## 1.9 Interacción entre la desnitrificación, RDNA y metanización

### Competencia entre desnitrificación y RDNA

Las relaciones encontradas entre la RDNA y la desnitrificación, proporcionan importantes tópicos de investigación. Ambos son procesos de reducción desasimilativa que ocurren en anaerobiosis, por medio de los cuales la célula obtiene energía para su crecimiento (Harris, 1982). Tiedje y col., (1982) estudiaron la competencia entre la desnitrificación y la RDNA y sus conclusiones fueron que en condiciones limitadas de nitrato la RDNA fue favorecida y, cuando había limitaciones de fuente de carbono, la desnitrificación fue la vía predominante. Sin embargo, ésta observación no puede ser considerada como

desnitrificante, ya que después encontraron que en algunos sistemas naturales (aguas de pozo) la RDNA puede competir exitosamente con la desnitrificación si existe disponibilidad de nitrato. Binnerup y col, (1992) estudiaron la desnitrificación, la RDNA y nitrificación en un sedimento estuarino con un sistema de flujo continuo. La concentración de nitrato en el estuario fue de 125 a 600 M. Los resultados mostraron que la reducción desasimilativa de nitrato a amonio, con respecto a la desnitrificación, no fue significativa, no haciéndose mención alguna respecto al tipo y concentración de la fuente carbonada. Lo anterior sugiere que la relación C/N puede ser determinante para que un consorcio microbiano bajo condiciones anóxicas, se incline por la desnitrificación o por la RDNA.

Por otro lado, es también evidente el efecto del tipo de sustrato en la velocidad de reducción de nitrato. Recientemente se ha observado que la glucosa es el sustrato menos eficiente para llevar a cabo la desnitrificación (Akunna y col., 1994; Carley y Mavinic, 1991; Manoharan y col., 1989). La glucosa por otra parte, en la fase anóxica puede promover el crecimiento de los microorganismos anaerobios facultativos a expensas de verdaderas desnitrificadoras (Carley y Mavinic, 1991).

Muchos microorganismos catabolizan los sustratos orgánicos por la vía glicolítica y la de los ácidos tricarbóxicos para obtener la fuente de carbono y de energía (Brock y Madigan, 1991). Tam y col., (1992) sugirieron que el acetil-CoA, a partir de acetato, podría ser una fuente de carbono y de electrones más directa que el metanol o glucosa para desnitrificar. Esta observación está apoyada por otros investigadores que encontraron mayores velocidades de desnitrificación con acetato que con metanol (Andersson y Rosen, 1990; Winter y col., 1989; Gerber y col., 1987), sin embargo, no se hace mención al tipo de microflora presente.

También se tienen antecedentes que el donador de electrones influye en la selección y dinámica del crecimiento de la biocenosis participante en la desnitrificación (Grabinska-Loniewska y Slávikowa, 1990; Grabinska-Loniewska y col., 1985). En resumen parece ser

que es importante el tipo de sustrato que se utilice, y posiblemente la relación C/N, ya que de ello puede depender la orientación del proceso, a saber desnitrificación y RDNA.

En la Figura 1.4 se desglosan todos los posibles eventos bioquímicos que en la digestión anaerobia podrían efectuarse. Como se puede observar la desnitrificación es uno de los procesos bioquímicos que se pueden generar, después de la etapa acidogénica, en la que se producen compuestos como acetato, piruvato, lactato, o succinato los cuales pueden ser las fuentes de electrones (Fass y col., 1994).

En la digestión anaerobia, el proceso desnitrificante podría estar en ventaja con respecto a los procesos metanogénicos, desde el punto de vista termodinámico, así como por la inhibición que ejercen los nitratos y los nitritos sobre la metanogénesis, sea debido a los cambios de potencial redox o por la competencia por el sustrato carbonado (Bell, 1969; Bollag y Czlonkowski, 1973).

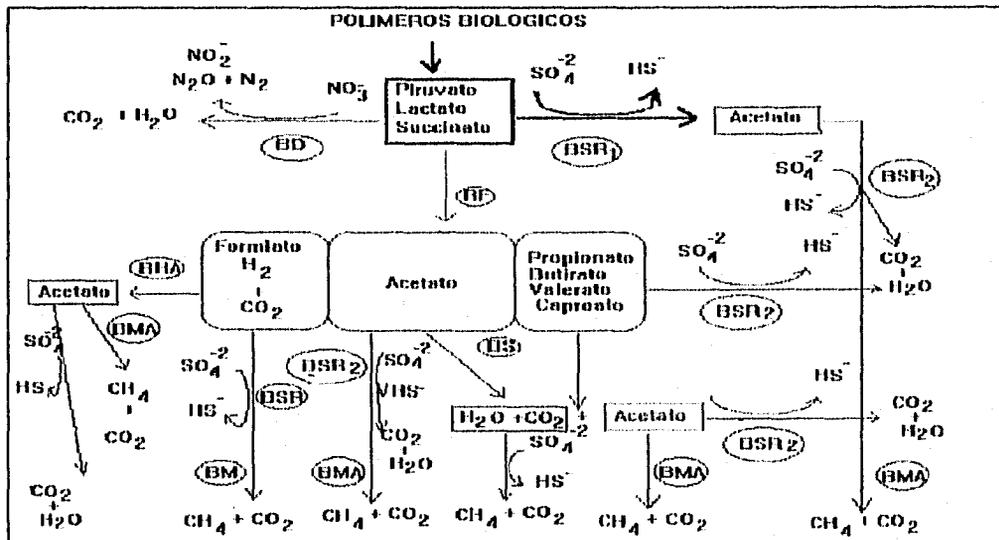


Figura 1.4 Esquema de vías metabólicas implicadas en la digestión anaerobia. BD, bacteria desnitrificante; BSR<sub>1</sub>, bacterias sulfato reductoras 1; BSR<sub>2</sub>, bacterias sulfato reductoras 2; BF, bacterias fermentativas, BMA, bacterias metanogénicas acetoclásticas; BM, bacterias metanogénicas.

Sin embargo, recientemente Cheng y Lin, (1993), no encontraron evidencia de competencia por el sustrato entre bacterias desnitrificantes y metanogénicas, ni que la causa de la inhibición sea debida, al cambio de potencial redox por la adición de óxidos de nitrógeno, aunque sí observaron un efecto negativo por la presencia de nitrato.

En la Tabla 1.9 se observan las condiciones ambientales más comunes para llevar a cabo la metanogénesis y desnitrificación, en el mismo proceso. En ocasiones ambos no pueden ocurrir simultáneamente, sino que primero se efectuará la acidogénesis y posiblemente la desnitrificación, y por último la metanogénesis, siempre que se proporcionen los sustratos y las condiciones necesarias.

Tabla 1.9 Donadores de electrones y condiciones ambientales frecuentes de la desnitrificación y metanización.

Condiciones ----- Proceso	Fuente de carbono y donador de electrones	G kJ/mol	pH	T °C	Potencial redox mV	Inhibidores
Desnitrifi- ficante	Glucosa C/N 1.1	-2384.9	7-8	39	-320	oxígeno > 0.2-0.4 ppm
Desnitrifi- ficante	Acetato C/N 0.9	-673.6	7-8	39	-320	oxígeno > 0.2-0.4 ppm
Desnitrifi- ficante	Metanol C/N 0.75	-578.9	7-9	39	-320	oxígeno > 0.2-0.4 ppm
Metano- génesis	Acetato	-31	7	35	menores a -340 a	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> O <sub>2</sub>
Metano- génesis	Metanol	-103	7	35	menores a -340	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> O <sub>2</sub>

En la Tabla 1.9 se indican las  $\Delta G^{\circ}$  de las reacciones desnitrificantes con glucosa, acetato y metanol, y se puede ver que son más exergónicas que las correspondientes reacciones metanogénicas. Otro factor, quizás el más importante que impide la simultaneidad de los dos fenómenos, es que el nitrato es inhibidor de la metanogénesis aún a pequeñas dosis. Así mismo, se puede también observar, algunas de las condiciones ambientales tales como pH, temperatura, potencial redox, que son similares en ambos procesos. Es claro, que algunas de las condiciones ambientales coinciden en los procesos, sin embargo, no está plenamente demostrado que así sea para cualquier lodo.

se puede decir, que si se realiza la desnitrificación y metanogénesis con acetato y metanol a una relación C/N 0.9 o 0.75, respectivamente, como se muestra en la Tabla 1.9, los sustratos se consumirán como donadores de electrones, hasta reducirse todo el nitrato a  $N_2$ . Si hubiera carbono remanente podría ser consumido (que no es el caso para los valores C/N citados) finalmente por bacterias metanogénicas para dar lugar a la formación de metano. La metanización a esos valores de C/N es evidente que no podría llevarse a cabo. De lo anterior se desprende que es necesario realizar mas estudios que permitan realizar la desnitrificación y metanogénesis de modo concertado. Es decir, identificar un posible conjunto de condiciones, que posibiliten la operación de ambos, pero difícilmente al 100 % cada una.

En los métodos anaerobios tradicionales para el tratamiento de aguas residuales, el efluente de un digestor anaerobio es aireado para oxidar el amonio antes de desnitrificar. En muchos de los casos se hace necesario agregar fuente de carbono para asegurar una completa desnitrificación, debido a la posibilidad de que la materia orgánica fuera antes transformada antes a metano y a  $CO_2$  en el digestor anaerobio. Algunas veces hay una desnitrificación incompleta debido a que no hay suficiente materia orgánica; o también puede darse el caso de tener completa la desnitrificación con un incremento en la demanda

química de oxígeno, lo cual es un problema que antes ya se había resuelto. Se ha sugerido que para realizar la eliminación del material carbonado y nitrogenado por la digestión anaerobia, nitrificación y desnitrificación. Se debería utilizar un sistema de mas de un reactor, aunque para aguas residuales urbanas el sistema podría ser mas simple.

Así Akunna y col., (1992) mencionaron que este problema podría ser resuelto, si las bacterias desnitrificantes se mantienen en el digestor anaerobio y el exceso de carbono orgánico puede ser convertido a metano y dióxido de carbono después de completarse la desnitrificación, según las reacciones microbianas de la digestión anaerobia. Otras investigaciones relacionadas fueron hechas por Hanaki y Polprasert (1989), concluyendo que en un sistema, en el que las condiciones para desnitrificar estén dadas, ésta tomará lugar preferentemente con respecto a la producción de metano, en tanto haya nitrato o nitrito en el reactor y las bacterias metanogénicas removeran el metanol residual. Si las bacterias metanogénicas están junto a bacterias desnitrificantes, en un reactor a niveles bajos de carbono orgánico, así como de nitrato o nitrito, el proceso combinado puede ser factible de llevarse a cabo. La otra ventaja es que un sistema así elimina la utilización de un reactor aerobio que se requeriría para completar la remoción de materia orgánica postdesnitrificante. Como resultado de estos estudios sobre la desnitrificación y producción de metano en reactores de flujo ascendente, con un influente sintético (metanol y nitrato), encontraron tres zonas en el intervalo de varias relaciones Metanol:  $N-NO_3^-$  (M:N) con las que trabajaron, las cuales se esquematizan en la Figura 1.5. (Hanaki y Polprasert, 1989).

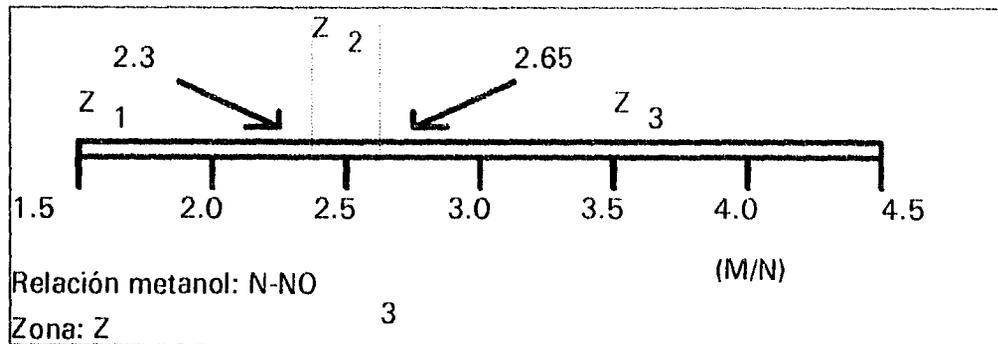


Figura 1.5 Relaciones metanol:N-NO<sub>3</sub> que delimitan el tipo principal de actividad bacteriana (desnitrificación, metanogénesis y ambos procesos).

En la zona 1 (Z<sub>1</sub>) se produce una desnitrificación incompleta la cual se incrementa casi al 100% al aumentar la relación metanol/nitrogeno (M/N); en la zona 2 se efectúa una desnitrificación completa sin producción de metano y; en la zona 3, donde están las relaciones más altas M/N, se encontró desnitrificación completa, baja demanda química oxígeno en el efluente con el auxilio de la producción de metano. En este caso las concentraciones iniciales utilizadas fueron, en promedio, de 53 mg/l de nitrato.

**CAPITULO III**

**RESULTADOS Y DISCUSIONES**

**EFFECTO DE LA FUENTE DE ELECTRONES Y LA C/N SOBRE LA  
DESNITRIFICACION Y METANOGENESIS**

---

---

### 3. EFECTO DE LA FUENTE DE ELECTRONES Y LA C/N SOBRE LA DESNITRIFICACION Y METANO

#### 3.1 Plan experimental

Con el objetivo de medir la influencia la fuente de la glucosa, metanol y acetato y el efecto de la relación C/N sobre la desnitrificación y la RDNA, se diseñó un conjunto experimental con 10 condiciones diferentes, como se muestra en la Tabla 3.1. Por cada condición se utilizaron 6 botellas serológicas, de las cuales 3 fueron destinadas para muestreo del biogas. Las otras 3 botellas restantes, una se utilizó para muestreo de  $\text{NO}_3^-$ , otra para  $\text{NO}_2^-$ , y la última para  $\text{NH}_4^+$  (el volumen de la muestra líquida fue de 1 ml). Se les adicionó 40 ml de lodos desnitrificantes y 10 ml de una solución concentrada, constituida por la fuente de carbono, nitrato y la solución inorgánica. En relación a la confiabilidad de los métodos de medida empleadas, en general, se encontró una reproducibilidad porcentual de  $95\% \pm 2$ .

Tabla 3.1. Concentraciones de las diferentes fuentes de carbono y nitrato en cada uno de los tratamientos.

Condición	Relación C:N	Glucosa mg C/l	Metanol mg C/l	Acetato mg C/l	N- $\text{NO}_3$ mg N/l
1	7.4	740	-	-	100
2	3.7	370	-	-	100
3	1.85	185	-	-	100
4	7.4	-	740	-	100
5	3.7	-	370	-	100
6	1.85	-	185	-	100
7	7.4	-	-	740	100
8	3.7	-	-	370	100
9	1.85	-	-	185	100
10	testigo	-	-	-	100

Al momento de la inoculación, el licor obtenido en cada una de las botellas serológicas, tuvo una concentración de sólidos suspendidos totales de 4402 mg/l y de sólidos suspendidos volátiles 1552 mg/l. Cabe señalar que el interés inicial de este trabajo fue evaluar el comportamiento fisiológico (respiratorio) del lodo en diferentes condiciones de cultivo. Por lo mismo se utilizaron volúmenes de cultivo pequeños, lo que no permitía evaluar los valores de SST y SSV.

### 3.2 Perfiles de formación de nitrito y amonio

En la Figura 3.1 se muestran los perfiles obtenidos de nitrito, cuando se utiliza glucosa como fuente de electrones y carbono. Se aprecia que cuando el valor de la relación C/N es de 1.85 es prácticamente nula la presencia de nitrito. Sin embargo a mayores relaciones, 3.7 y 7.4, la concentración de nitrito es significativa. En cualquier caso se observa que la acumulación máxima de  $\text{N-NO}_2^-$  se alcanza alrededor de 4 horas, posteriormente da inicio su disminución.

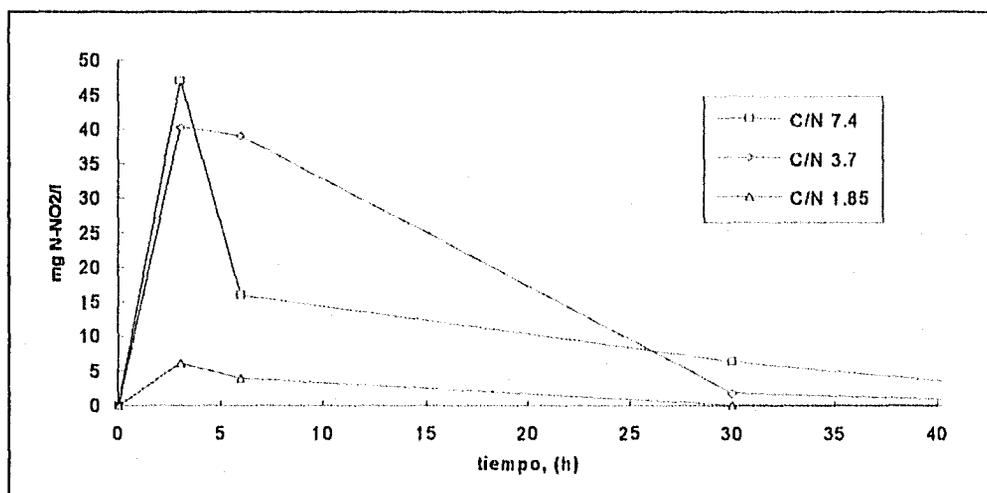


Figura 3.1.- Perfiles de formación de nitrito a las tres relaciones C:N (7.4, 3.7 y 1.85) en donde la fuente de carbono es glucosa.

La acumulación transitoria de nitrito observada puede ser debida a varias causas como: concentración y tipo de fuente de carbono, concentración de nitrato, menor velocidad de reducción de nitrito con respecto a la velocidad de reducción de nitrato, entre por citar

algunos ejemplos (Almeida y col., 1993; Blaszczyk, 1993; Wilderer y col., 1986). Es visible que la concentración de la glucosa tiene un efecto importante en la acumulación transitoria del nitrito, ya que parece existir una relación estrecha entre la concentración de ésta y la concentración de nitrito. A mayor concentración de glucosa mayor concentración de nitrito. Se tienen referencias de que la glucosa es el sustrato menos indicado para llevar a cabo la desnitrificación (Manoharan y col., 1989; Carley y Mavinic, 1991, Akuna y col., 1994). Una de las razones es que puede promover el crecimiento de anaerobios facultativos a expensas de las verdaderas desnitrificantes.

En la Figura 3.2 se observan los perfiles de amonio, en donde la fuente de carbono fue glucosa. Se aprecia que las máximas concentraciones de coincidieron a las 4 horas, siendo significativas éstas. Además se observa que las concentraciones máximas de amonio correspondientes a los tres perfiles observados decrecen conforme disminuye la relación C/N. En todos los casos hay una disminución de la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  hasta mantenerse en una concentración de  $25 \text{ mg N-NH}_4^+/\text{l}$ , aproximadamente.

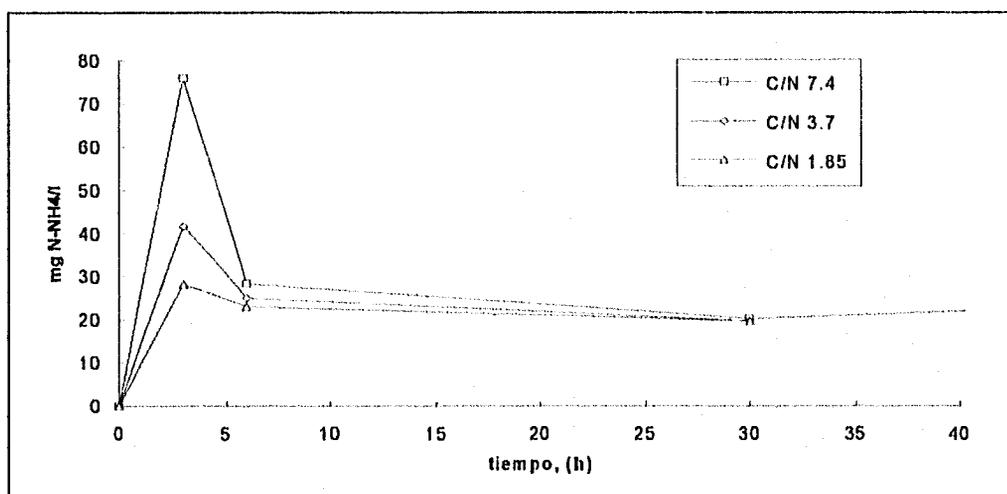


Figura 3.2.- Perfiles de formación de amonio a las tres relaciones C:N (7.4, 3.7 y 1.85) en donde la fuente de carbono es glucosa.

Se sabe que la glucosa contribuye al crecimiento de las bacterias amonificantes o formadoras de amonio (Kuroda y col., 1988), otra factor que podría contribuir al incremento de amonio en los lodos son las bacterias sulfato reductoras, especialmente cuando hay limitación de sulfato, ya que pueden reducir nitrito a amonio (Tiedje, 1988). Por lo tanto es razonable pensar que a mayor concentración de glucosa mayor sea la concentración de amonio formado, debido a que las bacterias amonificantes van a estar cada vez menos limitadas por el sustrato carbonado.

En la Figura 3.3 se observan los perfiles de nitrito obtenidos, cuando el poder reductor es metanol. Si se comparan las Figuras 3.1 y 3.3 se aprecia que las concentraciones de nitrito son de un orden de magnitud inferiores con respecto a las obtenidas cuando el poder reductor es glucosa. A excepción de la condición que establece una relación C/N 1.85 y el poder reductor es glucosa, la concentración de nitrito es del mismo orden de magnitud con respecto a las observadas en la Figura 3.3. Las bajas concentraciones de nitrito podrían sugerir que la velocidad de reducción de nitrito es casi tan rápida como la velocidad de reducción de nitrato en presencia de metanol.

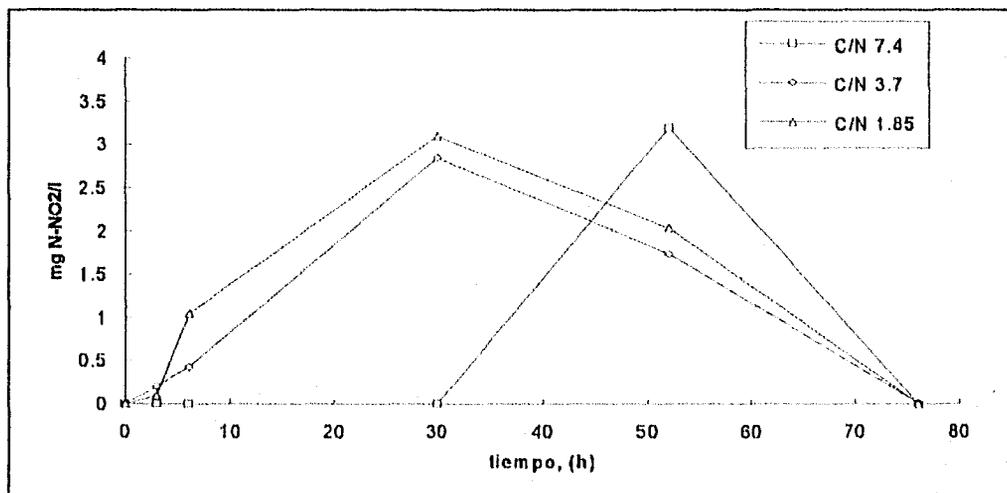


Figura 3.3.- Perfiles de formación de nitrito a las tres relaciones C:N (7.4, 3.7 y 1.85) en donde la fuente de carbono es metanol.

Esta conducta del lodo en presencia de metanol coinciden con lo citado en la literatura.

En la Figura 3.4, se observan los perfiles de amonio correspondientes a las tres relaciones C/N (7.4, 3.7 o 1.85) y fuente de electrones es metanol. Las concentraciones máximas alcanzadas de amonio estuvieron en un intervalo de 20 a 34 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l. Si se comparan las concentraciones de amonio mostradas en la en la Figura 3.2, con las de la Figura 3.4. Se aprecia que éstas últimas son equiparables con la concentración máxima alcanzada cuando el poder reductor es glucosa y la relación C/N es de 1.85.

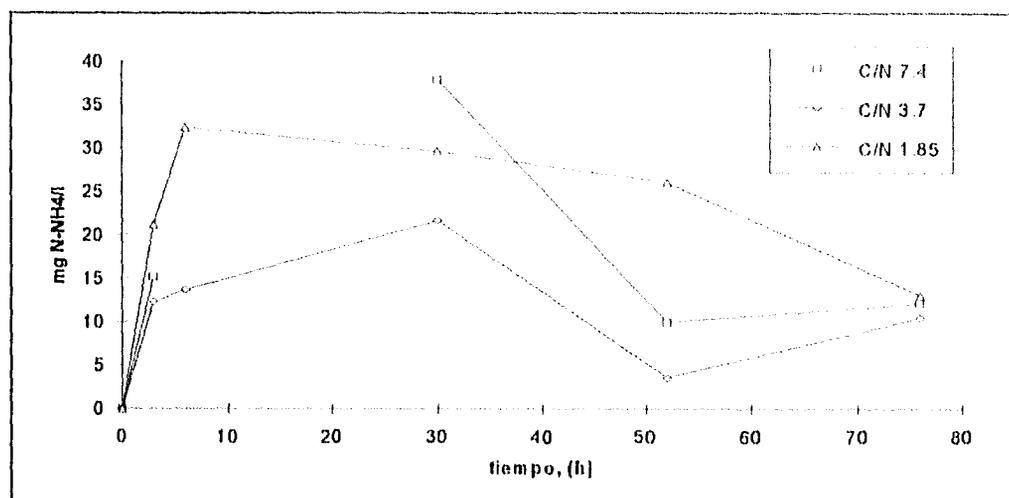


Figura 3.4.- Perfiles de formación de amonio a las tres relaciones C:N (7.4, 3.7 y 1.85) en donde la fuente de carbono es metanol.

En la Figura 3.5 se muestran los perfiles de nitrito, cuando el poder reductor fue acetato, como se puede observar hay una acumulación transitoria de nitrito, al menos con las relaciones C/N 1.85 y 3.7, cuyas concentraciones son comparables con las obtenidas con la relación C/N 1.85 y fuente reductora glucosa, la cual se muestra en la Figura 3.1. A excepción de la relación C/N 7.4 (Figura 3.5) en la que prácticamente no se observa acumulación de nitrito. Esta observación coincide con lo citado por McCarty, (1966), en un estudio que efectuó con varios compuestos carbonados (acetona, metanol, ácido acético y etanol) a una relación C/N 1.4. Se observó que con acetato se produjo la menor concentración de nitrito con respecto a lo obtenido con los demás compuestos orgánicos.

Lo cual parece evidenciar el efecto de la relación C/N sobre la acumulación de nitrito, es decir que a mayor C/N mayor acumulación de nitrito.

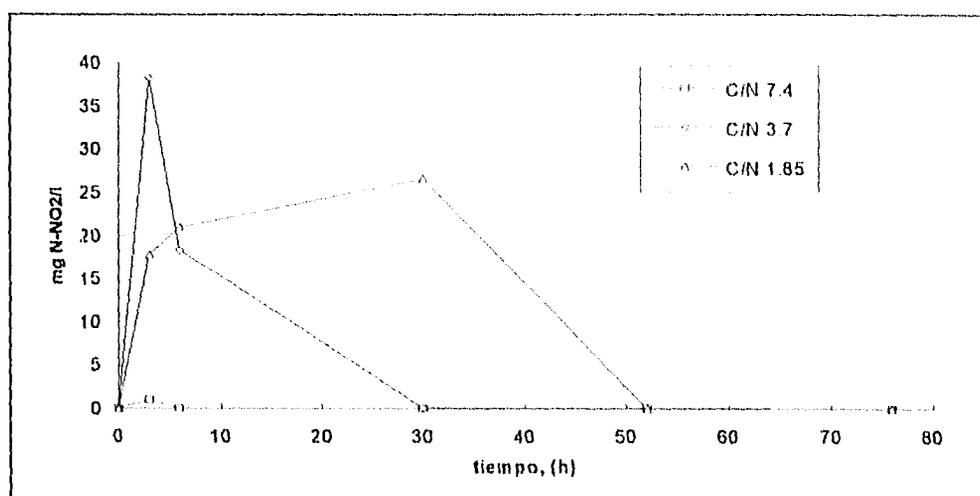


Figura 3.5.- Perfiles de formación de nitrito a las tres relaciones C:N (7.4, 3.7 y 1.85) en donde la fuente de carbono es acetato.

En la Figura 3.6, se puede apreciar que las concentraciones de amonio son bajas, del orden de 10 mg/l o menos, siendo éstas las más bajas con respecto a las obtenidas con los demás sustratos (glucosa o metanol). Con lo cual se infiere que la actividad de bacterias amonificantes fue mínima, y que el acetato no favorece su actividad y crecimiento, como ya se tiene referenciado que el acetato es una fuente de carbono y electrones más directa que el metanol y la glucosa para desnitrificar, debido que las desnitrificantes posiblemente catabolicen los sustratos orgánicos por la vía glicolítica para obtener la fuente de carbono y de energía (Brock y Madigan, 1991).

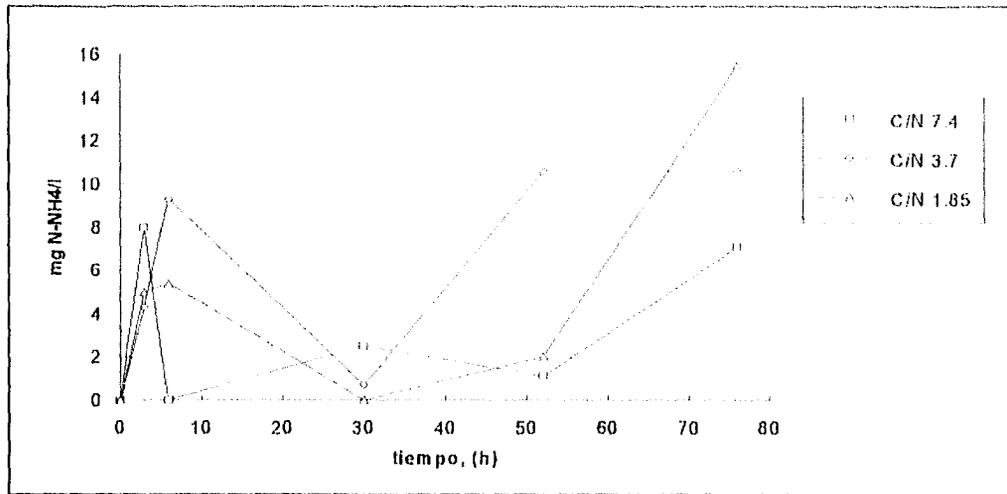


Figura 3.6.- Perfiles de formación de amonio a las tres relaciones C:N (7.4, 3.7 y 1.85) en donde la fuente de carbono es acetato.

En la Figura 3.7 se muestran los perfiles de nitrito y amonio del cultivo al que no le fue añadido poder reductor, así que la poca actividad microbiana fue debida al metabolismo endógeno, manifiesta por la formación de bajas concentraciones de nitrito y amonio.

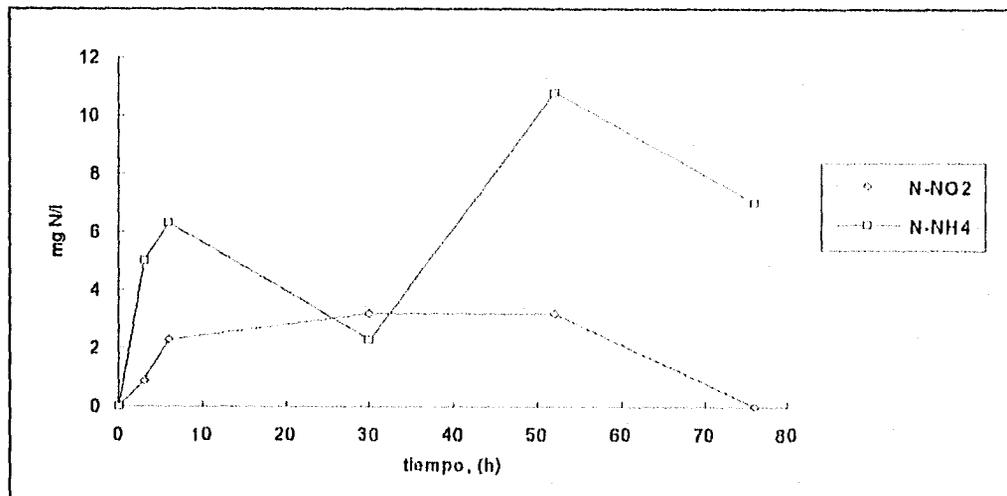


Figura 3.7 Cultivo que no le fue adicionado fuente de carbono a diferencia de los demás ensayos.

En la Tabla 3.2 se presentan los porcentajes de nitrógeno ( $\text{N-NH}_4^+$ ), que se formó a partir de  $\text{N-NO}_3^-$ . La concentración de nitrito no fue tomada en cuenta porque era un intermediario. El cálculo fue realizado tomando en consideración que la concentración inicial de  $\text{N-NO}_3^-$  corresponde al 100%. Así que se restó la máxima concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  obtenida en cada una de las condiciones experimentales a la concentración inicial de  $\text{N-NO}_3^-$  (100 mg/l) y se calculó la razón entre la diferencia y la concentración inicial de  $\text{N-NO}_3^-$ .

De las tres fuentes de carbono utilizadas en éste experimento (glucosa, metanol y acetato), se produjo mayor cantidad de amonio con glucosa. Akunna y col., (1994) observaron lo mismo en cultivos lote con diferentes sustratos (glucosa, acetato, lactato y metanol) en la que establecieron una relación C/N de 5.4 (200 mg/l  $\text{N-NO}_3^-$ ). Sin embargo parece ser posible controlar la formación de amonio al disminuir la relación C/N, como se puede observar a partir de la Figura 3.1, en donde se muestra que a menor relación C/N (7.4 a 1.85), se forman concentraciones de amonio cada vez menores. En la Tabla 3.2 también se observa la misma tendencia de formación de amonio en relación al cociente C/N. Lo cual es indicativo que la vía RDNA es favorecida cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono y además a relaciones C/N crecientes. Es sabido que la glucosa no es una buena fuente de carbono para la desnitrificación, su eficacia varía entre el 10 y 100% (Wilderer y col., 1987; Manoharan y col., 1989; Tam y col., 1992) debido a que favorece el crecimiento de bacterias amonificantes a expensas de verdaderas desnitrificantes.

Se aprecia que los porcentajes de formación de amonio con acetato a las tres relaciones C/N son menores, con respecto a los obtenidos con glucosa y metanol. El acetato puede ser una fuente de carbono más directa que el metanol o glucosa. Tam y col., (1992) encontraron mayor velocidad de desnitrificación con acetato en comparación con metanol o glucosa. Por otro lado, Akunna y col., (1993), observaron que con acetato se efectuaba casi al 100% la desnitrificación sin acumulación de amonio. Sin embargo se puede observar según Figura

3.5 que a mayor relación C/N la acumulación transitoria de nitrito alcanzaba concentraciones cada vez mayores.

Tabla 3.2.- Porcentajes de amonio, y producción de metano postdesnitrificante de cada una de las condiciones experimentales ensayadas.

Tratamiento sustrato-C/N	% N-NH <sub>4</sub> producido a partir de nitrato	% Producción Metano postdesnitrificante
Glucosa 7.4	75.9	0
Glucosa 3.7	42	73
Glucosa 1.85	28.3	98
Metanol 7.4	37.9	77
Metanol 3.7	21.7	100
Metanol 1.85	29.6	189
Acetato 7.4	17	45
Acetato 3.7	19	41
Acetato 1.85	20	92
testigo	8	0

Cuando se utiliza metanol como poder reductor en la desnitrificación se observa que las concentraciones de nitrato o amonio son similares a cualquier relación C/N (7.4, 3.7 o 1.85). Además de que no se observa ninguna tendencia que pudiera relacionar C/N con las concentraciones de nitrito o amonio. Por lo que pudiera decirse que el metanol es el poder reductor desnitrificante que parece no le afectó la relación C/N.

### 3.3 Perfiles de formación de metano

Se agruparon los perfiles de formación de metano por relación C/N, obtenidas con las fuentes de electrones (glucosa, metanol y acetato). En la Figura 3.8 se observan las concentraciones de metano con respecto al tiempo, de los cultivos batch a una relación C/N 7.4 con los respectivos donadores de electrones. Se puede observar que después de 76 horas de digestión se inicia la formación de metano a partir del poder reductor residual (postdesnitrificante), es decir el carbono residual que pudo ser utilizado por las bacterias metanogénicas del lodo, una vez que la etapa desnitrificante hubo concluido. El carbono residual fue calculado tomando en consideración las ecuaciones estequiométricas desnitrificantes y que el sustrato limitante es el nitrato. De tal forma se calculó la concentración de metano teórico postdesnitrificante para cada condición, los cuales se compararon con los obtenidos en cada ensayo. Los porcentajes de  $\text{CH}_4$  se muestran en la Tabla 3.2. En la Figura 3.8 se aprecia que la pendiente de la curva de metanol es acusada con respecto a la curva que describe la formación de metano del cultivo alimentado con acetato. También se observa que al cultivo que le fue adicionado glucosa, no produce metano.

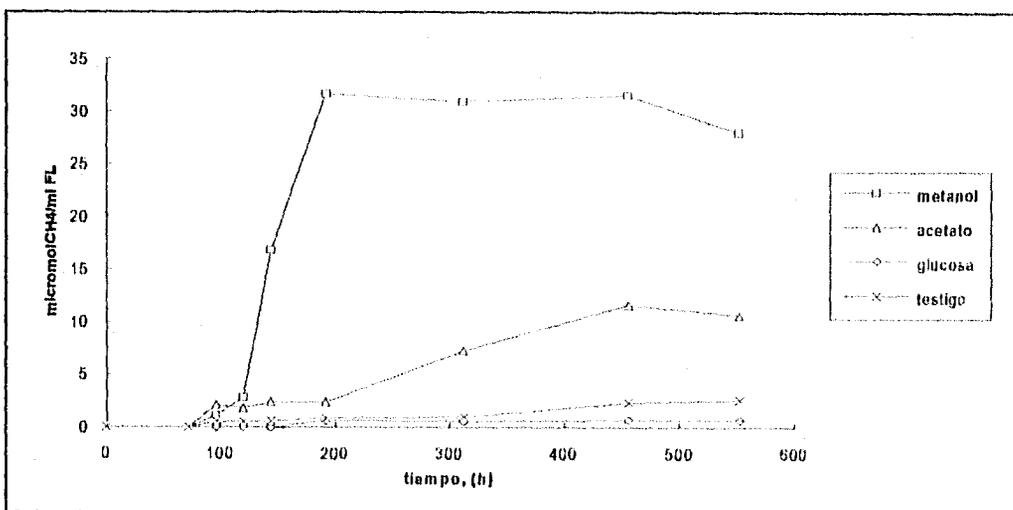


Figura 3.8.- Producción de metano a la relación C/N 7.4

### 3.3 Perfiles de formación de metano

Se agruparon los perfiles de formación de metano por relación C/N, obtenidas con las fuentes de electrones (glucosa, metanol y acetato). En la Figura 3.8 se observan las concentraciones de metano con respecto al tiempo, de los cultivos batch a una relación C/N 7.4 con los respectivos donadores de electrones. Se puede observar que después de 76 horas de digestión se inicia la formación de metano a partir del poder reductor residual (postdesnitrificante), es decir el carbono residual que pudo ser utilizado por las bacterias metanogénicas del lodo, una vez que la etapa desnitrificante hubo concluído. El carbono residual fue calculado tomando en consideración las ecuaciones estequiométricas desnitrificantes y que el sustrato limitante es el nitrato. De tal forma se calculó la concentración de metano teórico postdesnitrificante para cada condición, los cuales se compararon con los obtenidos en cada ensayo. Los porcentajes de  $\text{CH}_4$  se muestran en la Tabla 3.2. En la Figura 3.8 se aprecia que la pendiente de la curva de metanol es acusada con respecto a la curva que describe la formación de metano del cultivo alimentado con acetato. También se observa que al cultivo que le fue adicionado glucosa, no produce metano.

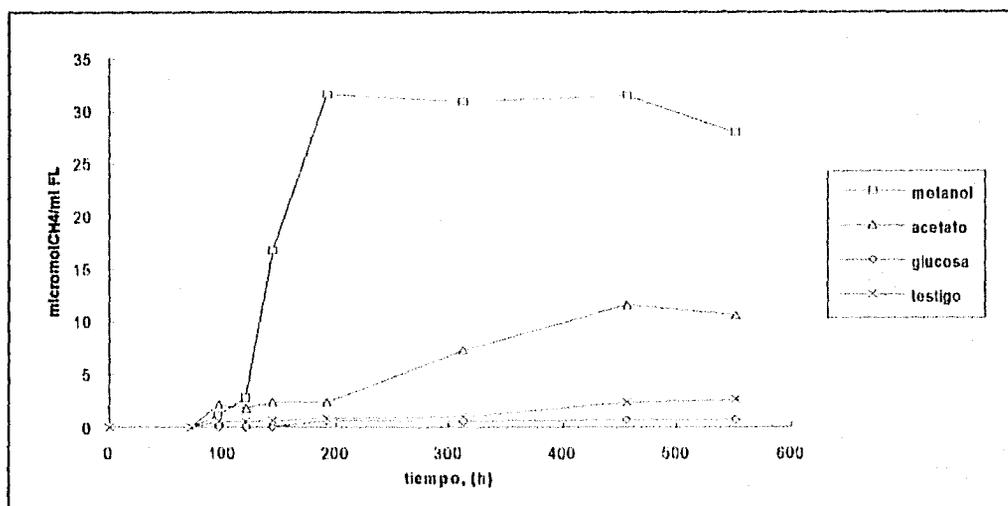


Figura 3.8.- Producción de metano a la relación C/N 7.4

No es extraño que el metanol haya sido el sustrato con el que se obtuvo mayor concentración de metano (~35  $\mu\text{mol/ml}$  fase líquida), debido a que el requerimiento estequiométrico para desnitrificar incluyendo el necesario para la biosíntesis corresponde a una relación C/N de 0.92, el cual es inferior con respecto al requerido para desnitrificar con glucosa o con acetato (McCarty, 1966). La producción de metano postdesnitrificante fué del 77% en el cultivo inoculado con metanol. La producción de metano postdesnitrificante con sustrato glucosa a la relación 7.4 se inhibió totalmente, debido que hubo acidificación del medio, está ampliamente documentado el efecto inhibitorio de la caída del pH en la metanogénesis. En el cultivo alimentado con acetato, el porcentaje de producción de metano fué del 45% con respecto al esperado (Tabla 3.2). Ello pudiera indicar la posibilidad de que otras vías metabólicas pudieran haber intervenido. Se puede apreciar en la Figura 3.9 que con metanol, se repite el patrón mostrado previamente en la Figura 3.8, es decir, la curva que describe la formación de metano, tiene una mayor pendiente con respecto a la de glucosa o acetato. Una diferencia del comportamiento de la glucosa con respecto al observado en la Figura 3.8, es que se aprecia una producción significativa de metano, incluso superior a la producida por acetato.

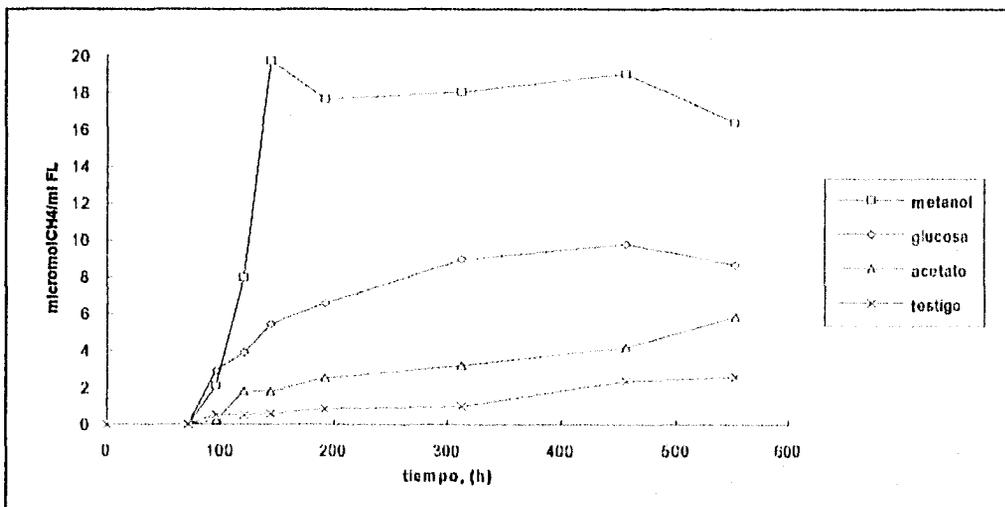


Figura 3.9.-Producción de metano a la relación C/N 3.7

En la Figura 3.10 se observa de nuevo que con metanol se produce mayor cantidad de metano con respecto a los otros sustratos (glucosa, acetato).

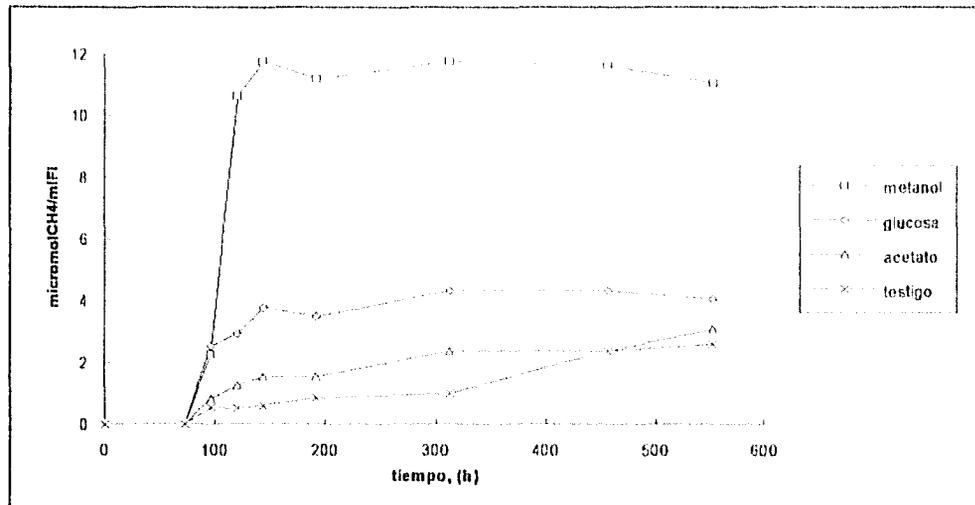


Figura 3.10.-Producción de metano a la relación C/N 3.7 (triplicados)

En la Tabla 3.2, se muestran los porcentajes de metano obtenido para cada una de las condiciones ensayadas, es notable advertir que conforme la relación C/N disminuye, el porcentaje de metano aumenta. A excepción de los cultivos efectuados con acetato, que se desvían de este comportamiento cuando las relaciones C/N son 7.4 o 3.7. Nótese también que a la relación 7.4 con glucosa, la metanización es totalmente inhibida, debido problemas de pH. En estudios de cultivos continuos Hanaki y Polpraset, (1989) encontraron que en el intervalo de la relación C/N, 0.87-0.99, con metanol, se verificaba exclusivamente la etapa desnitrificante y por encima del límite superior se observaba producción de metano y desnitrificación. De los tres compuestos orgánicos, es evidente que con metanol se obtienen la mayor cantidad de carbono orgánico eliminado, seguido de glucosa (a excepción de la relación C/N 7.4) y por último acetato (a excepción de la relación C/N 1.85).

### 3.4 Actividad Metanogénica

Se calcularon las velocidades iniciales de producción de metano a cada uno de los cultivos, según la relación C/N y respectivo sustrato. Las velocidades calculadas son representadas en la Figura 3.11, contra la relación C/N de los cultivos alimentados con los diferentes sustratos. Se observa que con metanol se obtienen las mayores tasas de producción de metano y que a mayor C/N mayor actividad metanogénica. De la misma forma con acetato la actividad es creciente a mayor C/N, aunque las velocidades de formación de metano son inferiores con respecto a las obtenidas con metanol. Con la glucosa la actividad decreció al aumentar la relación C/N, las velocidades fueron casi del mismo orden de magnitud de las obtenidas con acetato. Este comportamiento no fue el esperado, ya que era de suponerse que a mayor concentración de glucosa mayor actividad metanogénica. Otro factor que no se tomó en cuenta es el control del pH, que en presencia de glucosa puede sufrir variación y el tamaño de éste es una función de la concentración del azúcar.

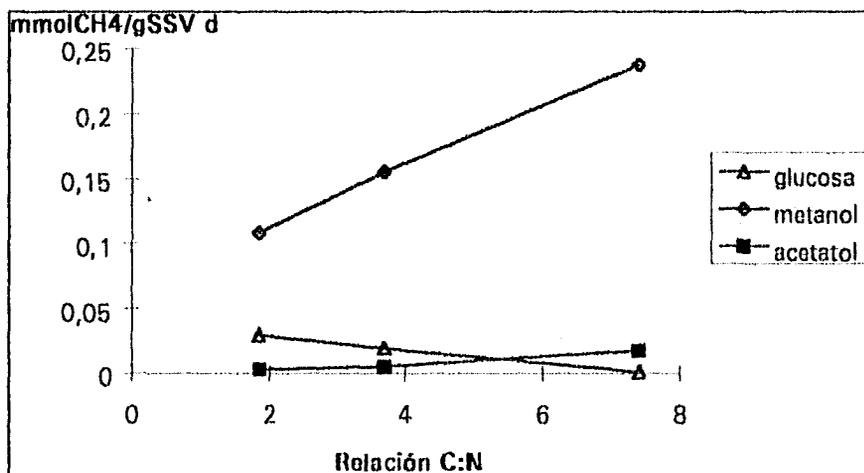


Figura 3.11.- Actividad metanogénica contra la relación C:N (1.85, 3.7 y 7.4) de las tres fuentes carbonadas (glucosa, metanol y acetato).

### 3.5 Conclusiones

#### Conclusiones

1.- No se observó metanización y desnitrificación simultánea en ningún cultivo batch, debido a la presencia de nitrito y nitrato que son inhibidores de la metanogénesis. En los todos los cultivos se inició la producción de metano hasta después de 76 horas, con excepción de aquel que contenía glucosa a una relación C/N 7.4, debido a inhibición de pH.

2.- Se observó que con glucosa y a relaciones C/N crecientes, la formación de amonio es mayor, lo que es indicativo del predominio de la RDNA a relaciones C/N mayores. La misma tendencia se observó con la formación de nitrito.

Se observó que con metanol, se produjeron concentraciones similares de amonio a cualquier relación C/N, el mismo comportamiento se observó para la formación de nitrito, es decir no se observó efecto de la relación C/N.

Se observó que con acetato, la relación C/N no afectó la formación de amonio, dado que en cualquier caso (C/N) se produjo la concentración más pequeña de amonio con respecto a la formada con los demás sustratos. Sin embargo sí afectó la C/N, la formación de nitrito, ya que a relaciones C/N mayores, se obtenían mayores cantidades de nitrito.

3.- Parece ser que la fuente de electrones menos recomendable para llevar a cabo la desnitrificación es glucosa y sobre todo a relaciones C/N altas, en donde predomina la RDNA, y parece que son mejores fuentes de electrones tanto el acetato como el metanol, dado que con éstos se observan las más bajas concentraciones de amonio, lo cual puede indicar que no fomentan la actividad de las bacterias amonificantes. En cambio esta

referenciado que se han obtenido mayores velocidades de desnitrificación con acetato que con metanol y glucosa (Andersson y Rosen, 1990; Winter y col., 1989; Gerber y col., 1987).

4.- Con cualquiera de los tres compuestos orgánicos, los mayores porcentajes de carbono eliminado en forma de metano, se obtuvieron a la relación C/N más pequeña (1.85). El sustrato con quien mejor se metaniza, es con metanol, seguido de glucosa a las relaciones (3.7 y 1.85) y por último con acetato a la relación (1.85). Una producción de metano inferior al 100% podría significar que se dieron lugar otras rutas metabólicas simultáneas a la desnitrificación o metanogénesis.

**CAPITULO IV**

**COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE ENTRE LODO  
METANOGENICO Y DESNITRIFICANTE**

---

---

#### 4. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE ENTRE UN LODO METANOGENICO Y OTRO DESNITRIFICANTE

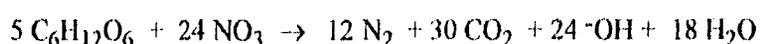
##### 4.1 Antecedentes

Hay evidencias de haber encontrado desnitrificantes viables en lodos de un cultivo enriquecido con metanogénicas por dos años, con acetato como única fuente de carbono y energía (Buswell y Pagano, (1952), así como en sedimentos lacustres metanogénicos (Chen y col. 1972). Kaspar y col.(1981), se plantearon el objetivo de determinar si en periodos largos de anaerobiosis es posible mantener la capacidad desnitrificante sin suministro de nitrato, nitrito u oxígeno. El material biológico que seleccionaron fue lodos de un digestor de una planta de tratamientos de aguas municipales y un cultivo enriquecido con metanogénicas alimentadas con acetato como única fuente de carbono por dos años y medio. Otro aspecto que les interesó esclarecer fue cuantificar el potencial de reducción desasimilativo de nitrato a amonio con los lodos del digestor y compararlo con el potencial desnitrificante, a concentraciones de nitrato del orden de 3-300  $\mu\text{M}$ . Los resultados fueron que la capacidad desnitrificante persistió en ambos lodos y que el potencial de los lodos del digestor para reducir el nitrato a amonio fue dos veces más grande que su potencialidad para desnitrificar

En ésta tesis se diseñó un experimento para saber en que grado el lodo desnitrificante tiene mayor potencialidad de reducir el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) hasta nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) con respecto al lodo metanogénico. Los ensayos consistieron en dos series de cultivos batch inoculados con lodos desnitrificantes y metanogénicos respectivamente, alimentados con glucosa y nitrato a las concentraciones descritas en la Tabla 4.1

Se seleccionó glucosa como donador de electrones porque se evidenció en el capítulo 3 que este sustrato fue el menos adecuado para desnitrificar, queriendo simular un influente real que difícilmente contendrá buenos sustratos para desnitrificar.

Se variaron las concentraciones de glucosa y de nitrato a la vez para mantener constante la relación C/N 1.2 (relación estequiométrica para efectuar la desnitrificación con glucosa).



C/N 1.2

Tabla 4.1.- Concentraciones de C-glucosa, N-NO<sub>3</sub> y sólidos suspendidos volátiles. LD, lodo desnitrificante; LM, lodo metanogénico.

C-glucosa mg/l	glucosa g/l	N-NO <sub>3</sub> mg/l	NaNO <sub>3</sub> g/l	SSV mg/l
LM 5000	12.5	4166	25.3	1668
LM 2500	6.25	2083	12.6	1668
LM 1000	2.5	833	5.1	1668
LD 5000	12.5	4166	25.3	2212
LD 2500	6.25	2083	12.6	2330
LD 1000	2.5	833	5.1	2330

#### 4.2 Perfiles de nitrato, nitrito y amonio

En las Figuras 4.1 a la 4.6 se muestran los perfiles de nitrato, nitrito y N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, con respecto al tiempo, de los cultivos batch inoculados con lodos metanogénicos y desnitrificantes. En la Figura 4.1 se observa el perfil de consumo de nitrato con lodos desnitrificantes, y en el transcurso de 50 horas, la disminución de la concentración es continua. Aproximadamente a las 70 horas, el consumo de nitrato se estaciona para permanecer a una concentración aproximada de 800 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l. También se advierte

que la concentración máxima transitoria de nitrito fué de 290 mgN-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l. Cabe mencionar que la concentración de amonio fué pequeña con respecto al N inicial (3840 mg/l N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), del orden de 80 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/l. No se observó acumulación de éste, lo que pudiera ser efecto de la relación C/N a la que se realizó el cultivo.

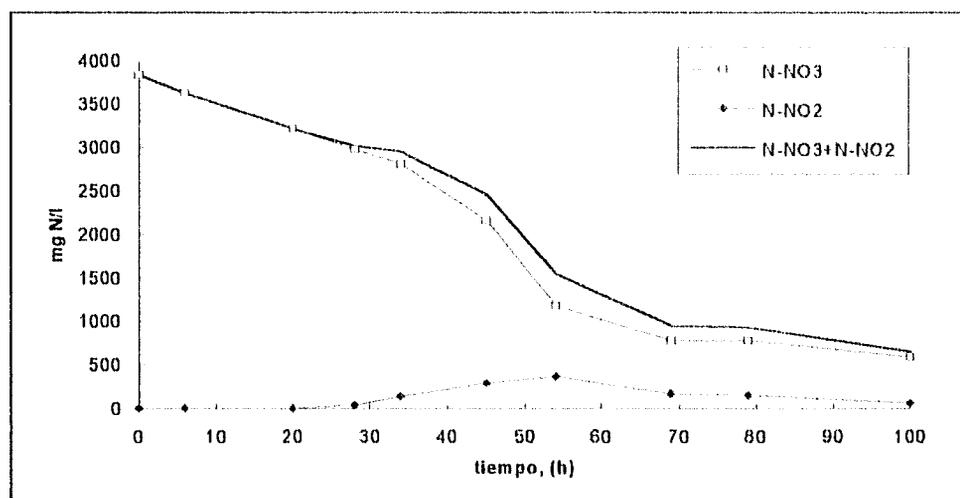


Figura 4.1.- Evolución de nitrato, nitrito y amonio con respecto al tiempo. El cultivo fue realizado en batch con lodos desnitrificantes y las concentraciones de glucosa y nitrato fueron respectivamente 5000 mg C/l y 4166 mg N/l.

En la Figura 4.2 se observa un consumo lento de nitrato por parte del lodo metanogénico el cual se estaciona a las 45 horas, a partir del cual se mantiene una concentración de aproximadamente 3000 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l. Se observa una acumulación continua de nitrito a partir de las 30 horas, alcanzándose una concentración máxima de 500 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l. No se advierte acumulación de amonio, al final del ensayo se determinaron concentraciones del orden de 30 mg/l.

Al comparar la evolución de nitrato con respecto al tiempo en las Figuras 4.1 y 4.2 se observa que la microflora del lodo metanogénico no desnitrifica y no reduce el nitrato a amonio. Solamente hay formación de nitrito proporcional al consumo de nitrato, por lo que se infiere que la concentración inicial de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(3660 mg/l) fue tóxica para la

microflora del lodo anaerobio. Sin embargo, en el cultivo realizado con el inóculo desnitrificante en la Figura 4.1, bien se puede observar actividad desnitrificante, una pequeña cantidad de nitrito acumulado y sorprendentemente no se observa acumulación significativa de amonio. De acuerdo con los resultados de los experimentos del capítulo tres, se esperaba que hubiera acumulación de amonio, dado que el sustrato utilizado fue el adecuado para la actividad de bacterias que reducen el nitrato a amonio.

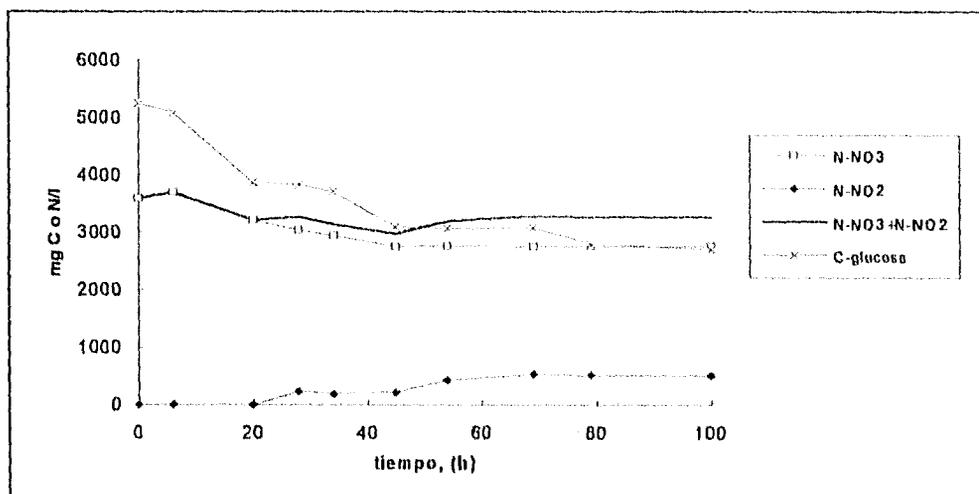


Figura 4.2.- Evolución de nitrato, nitrito, amonio y glucosa con respecto al tiempo. El cultivo fue realizado en batch con lodo metanogénico y las concentraciones de glucosa y nitrato fueron respectivamente 5000 mg C/l y 3600 mg N/l.

En la Figura 4.3 se observa el rápido consumo de nitrato con lodos desnitrificantes a una concentración inicial de 1938 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l, hasta detenerse a las 40 horas aproximadamente (~500 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), además se inicia la acumulación de nitrito a partir de las 25 horas, continuando este patrón hasta el final del ensayo. No se observó acumulación de amonio en el transcurso, siendo éste del orden de 20 mg N/l.

Como se puede observar en la Figura 4.4 se describen los cambios de concentraciones de nitrato, nitrito y amonio de los cultivos inoculadas con lodos metanogénicos. Se observa que la concentración de 2083 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l no fue tóxica para la flora microbiana de

lodo metanogénico y puede decirse que la actividad desnitrificante es muy similar a la del lodo desnitrificante (Figura 4.3). Por lo que respecta a la formación de amonio esta fue del orden de 60 mg N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l. De nuevo esta concentración no es significativa con respecto al nitrógeno inicial.

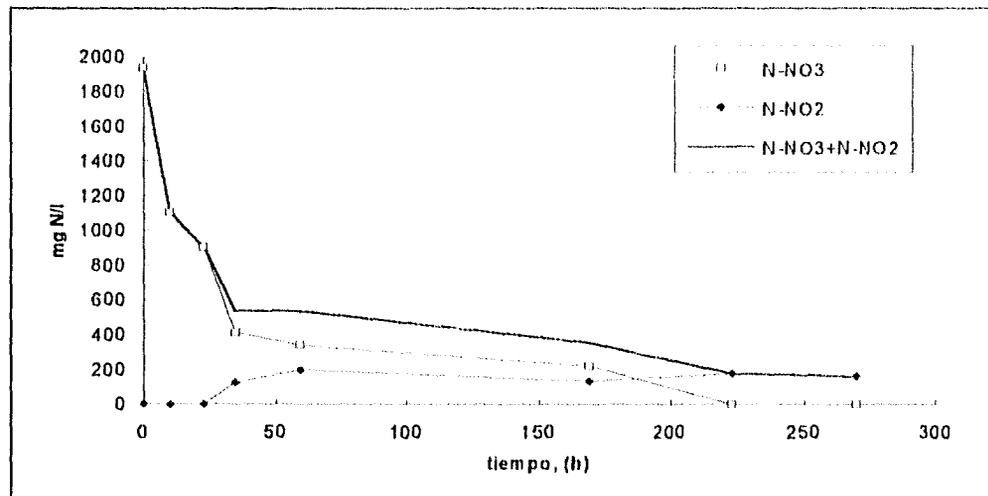


Figura 4.3.- Evolución de nitrato, nitrito y amonio con respecto al tiempo. El cultivo fue realizado en batch con lodo desnitrificante y las concentraciones de glucosa y nitrato fueron respectivamente 2500 mg C/l y 1938 mg N/l.

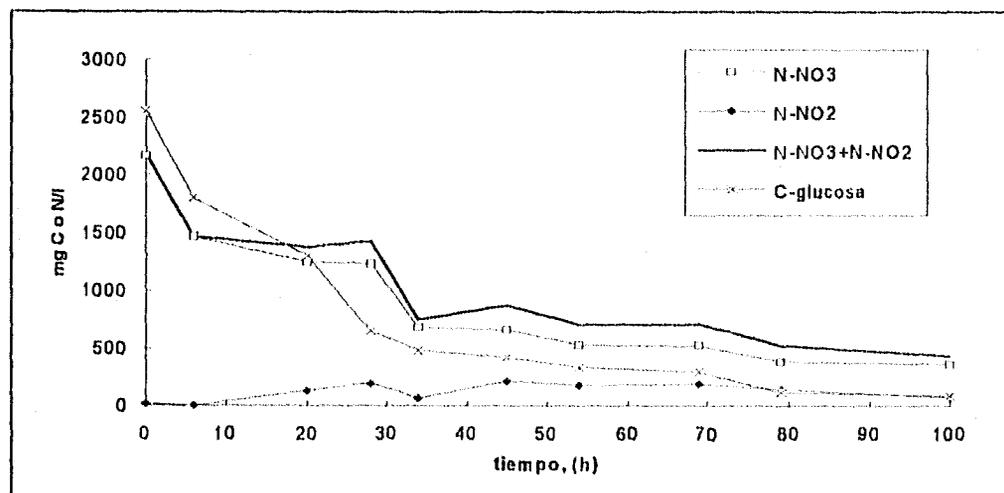


Figura 4.4.- Evolución de nitrato, nitrito, amonio y glucosa con respecto al tiempo. El cultivo fue realizado en batch con lodo metanogénico y las concentraciones de glucosa y nitrato fueron respectivamente 2500 mg C/l y 2083 mg N/l.

Como se puede observar en las Figuras 4.5 y 4.6, el patrón de comportamiento de nitrato, nitrito y amonio es muy similar en ambos cultivos (lodo desnitrificante y lodo metanogénico). Los lodos metanogénicos fueron capaces de desnitricar sin previa aclimatación, a excepción del cultivo cuya concentración inicial de nitrato fue de 4166 mg/l.

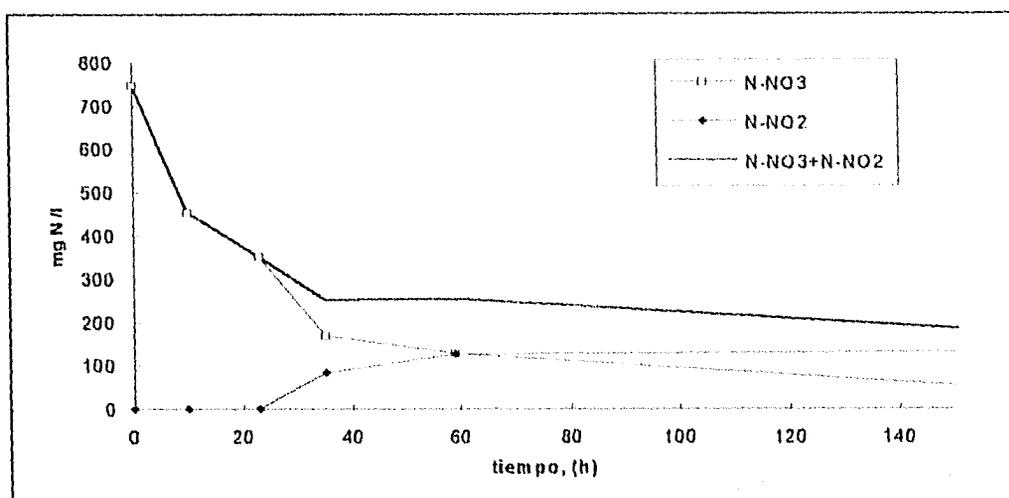


Figura 4.5.- Evolución de nitrato, nitrito y amonio con respecto al tiempo. El cultivo fué realizado en batch con lodo desnitrificante y las concentraciones de glucosa y nitrato fueron respectivamente 1000 mg C/l y 833 mg N/l.

Por otro lado la relación C/N 1.2, la cual se mantuvo constante en todos los ensayos realizados, fue muy baja con respecto a los ensayos del experimento del capítulo 3, en los cuales habia mayor formación de amonio a mayor relación C/N. Es decir, a mayor cantidad de glucosa, mayor concentración de amonio formado; contrario a lo que se esperaba en estos ensayos, pues la concentración de glucosa utilizada fue mayor con respecto a los experimentos descritos en el Capítulo 3. Por lo tanto el pronóstico era que gran parte de la concentración inicial de nitrato fuese convertido a amonio. Esto no sucedió, posiblemente por la relación C/N baja.

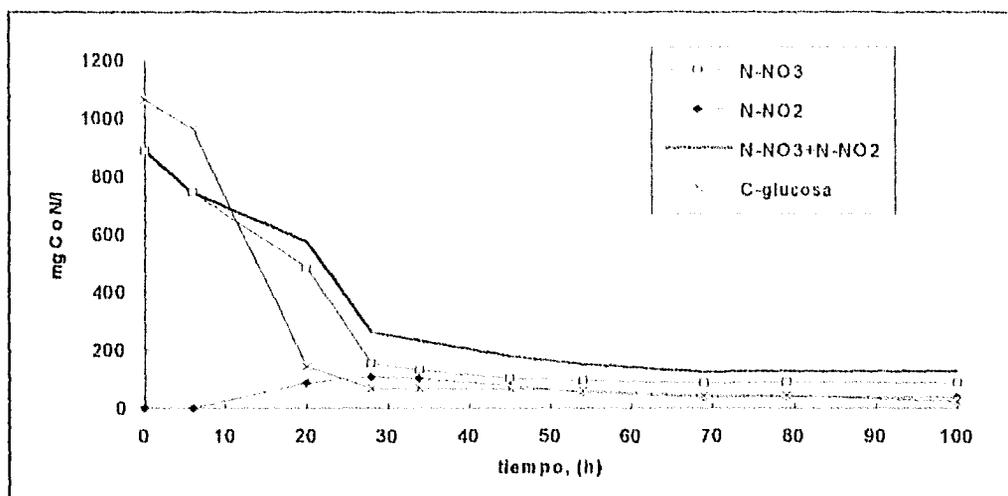


Figura 4.6.- Evolución de nitrato, nitrito, amonio y glucosa con respecto al tiempo. El cultivo fue realizado en batch con lodo metanogénico y las concentraciones de glucosa y nitrato fueron respectivamente 1000 mg C/l y 833 mg N/l.

Los resultados obtenidos aquí concuerdan con las observaciones de Tiedje y col., (1982), con las que llegaron a la conclusión de que en condiciones limitadas de carbono, la desnitrificación es favorecida con respecto a la RDNA.

En las Figuras 4.1, 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 se aprecia que cuando la relación C/N fue 1.2 con una alta concentración de nitrato y de glucosa, no se produce amonio lo que es indicativo de que la fracción de microorganismos fermentadores, entre ellos algunas enterobacterias que utilizan la vía RDNA no compitieron eficazmente por los iones nitrato, lo anterior se observó tanto en las fermentaciones inoculadas con lodos metanogénicos y lodos desnitrificantes. Posiblemente sea efecto de la relación C/N tan baja.

#### 4.3 Velocidades específicas iniciales de eliminación de nitrato

Se calcularon las velocidades específicas iniciales de eliminación de nitrato de cada una de las condiciones ensayadas así como los porcentajes de eliminación de (N-NO<sub>3</sub>). El

cálculo se realizó como la diferencia entre el nitrógeno en forma de nitrato inicial y las tres diferentes formas de nitrógeno residual ( $N-NO_3 + N-NO_2 + NH_4$ ), los cuales se muestran en la Tabla 4.2. La velocidad específica de consumo de nitrato fue calculado a partir de la pendiente de la curva representada por  $N-NO_3^- + N-NO_2^-$  y la concentración de SSV (g/l).

Tabla 4.2 Velocidades específicas de consumo de nitrato y porcentajes de eliminación de  $N-NO_3^-$ . LD (lodo desnitrificante). LM (lodo metanogénico).

Ensayo Concentración C-glucosa mg C/l	Velocidad Específica Inicial consumo de nitrato mg N/g SSV h	% $N-NO_3^-$ inicial eliminado
1000 L D	7.0	81.5
2500 L D	18.6	82.0
5000 L D	13.2	82.3
1000 L. M.	8.0	82.9
2500 L M	-	78.7
5000 L M	-	9.0

Como se puede observar las velocidades específicas de eliminación de nitrato en los ensayos inoculados con lodos desnitrificantes son del orden de 7 a 18  $mgN-NO_3^-/g$  SSV h. En los cultivos con lodos metanogénicos y concentraciones de C-glucosa (2500 y 5000 mg/l), no se calculó la velocidad de inicial de consumo de nitrato debido a que la correlación entre la concentración de nitrato y tiempo (h) no fué lineal, dado que el coeficiente de correlación fué inferior a 0.5.

Akunna y col., 1993 obtuvieron velocidades promedio de eliminación de nitrato del orden de 2.7  $mg N-NO_3^-/g$  SSV h, cuando la relación C/N de cultivos batch alimentados con glucosa fue de 5.4 y una concentración inicial de 200  $mg N-NO_3^-/l$ . Además observaron que la vía de reducción del nitrato a amonio fue dominante con respecto a la

desnitrificación, esta observación ya había sido contemplada en los pruebas descritas en el Capítulo 3 de esta tesis. Se citan velocidades de específicas de desnitrificación en condiciones no limitadas y limitadas de carbono (metabolismo endógeno) de 2.08 y 0.83 mg N-NO<sub>3</sub> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /g SSV h, respectivamente. Por otro lado Bishop y col., 1976 obtuvieron una velocidad desnitrificante de 0.95 mg N-NO<sub>3</sub> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /g SSV h, a una relación C/N 1.5 con metanol (20 mg/l). Como se puede apreciar las velocidades calculadas en ésta tesis son aproximadamente una orden de magnitud superior con respecto a las citadas en la literatura. Cabe enfatizar que cuando la relación C/N fué de 1.2, la vía predominante de reducción de nitrato fue la desnitrificación, lo cual sugiere que la fuente de carbono (glucosa), deja de tener un efecto positivo en la desasimilación de nitrato a amonio cuando se utilizan relaciones C/N a 1.2.

Con respecto a los porcentajes de eliminación obtenidos no es muy apreciable la diferencia entre realizar la desnitrificación con un tipo determinado de lodo, a excepción del cultivo que fue inoculado con lodo metanogénico, alimentado con 5000 mg C/l. En este ensayo solamente el 9% del nitrato inicial fue eliminado, por lo que cabe pensar que pudo haber sucedido que se verificase una inhibición por cambio de pH en la etapa de fermentación.

Como era de esperarse, dada las concentraciones altas de nitrato y por ende la relación C/N francamente desnitrificante, no hubo actividad metanogénica debido a que probablemente hubo inhibición de algunas enzimas clave de la metanogénesis. Por ejemplo se señala que la actividad metanogénica de Methanobacterium thermoautotrophicum fue inhibida en un 25% en presencia de 15 mM de nitrato y en un 66-82%, en presencia de 1 mM de nitrito (Balderston y Payne, 1976).

#### 4.4 Conclusiones:

De la comparación de los dos lodos se observó que:

1.- El lodo proveniente de un digestor anaerobio (metanogénico) tiene un potencial desnitrificante equiparable con el lodo desnitrificante, cuando la relación C/N es 1.2 y además, si la concentración es similar o inferior a 2168 mg N-NO<sub>3</sub>/l. Si se duplica la concentración de nitrato el potencial desnitrificante decrece agudamente en el lodo metanogénico.

2.- A relación C/N cercana a la estequiométrica (1.2), de la reacción desnitrificante con sustrato glucosa, la vía preponderante de reducción de nitrato en cultivos anaerobios intermitentes es la desnitrificación, por lo que la naturaleza de la fuente de carbono (glucosa) parece ser que no tiene efecto positivo en la reducción de nitrato a amonio. A relaciones C/N mayores, se favorece la amonificación, como ya ha sido citado en la literatura (Akuna, y col, 1994).

3.- Con base en los resultados de éste experimento es factible realizar eliminación de altas concentraciones de nitrato, con lodos digestores anaerobios mediante el proceso desnitrificante.

4.- Se obtuvieron velocidades de eliminación de nitrato superiores en un orden de magnitud con respecto a los citados en la literatura.

CAPITULO V

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA EN LA DESNITRIFICACION  
CON LODOS METANOGENICOS

---

## 5. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN LA DESNITRIFICACIÓN EN CULTIVOS INOCULADOS CON LODOS METANOGENÉTICOS.

### 5.1 Condiciones experimentales

Se realizaron ensayos que permitieron confirmar que a mayor concentración de la glucosa, se observa mayor concentración de amonio formado a partir de nitrato. Por esto se mantiene constante la concentración de nitrato y se varía la concentración de glucosa. Las condiciones experimentales se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Relaciones C/N-NO<sub>3</sub>, concentraciones de C-glucosa, N-NO<sub>3</sub> y sólidos suspendidos volátiles.

C/N	C-glucosa mg/l	N-NO <sub>3</sub> mg/l	SSV mg/l
5	500	100	2657.5
1.8	810	450	2657.5
7.4	3330	450	2657.5

### 5.2 Perfiles de nitrato, nitrito y amonio

En la Figura 5.1 se muestran los perfiles de las tres diferentes formas de nitrógeno (nitrato, nitrito y amonio) con respecto al tiempo, de los cultivos batch ensayados a una relación C/N 1.85. Como se puede advertir en la Figura 5.1, hay un descenso de la concentración de nitrato, se observa acumulación transitoria de nitrito y amonio casi equivalente, cuyas concentraciones corresponden a 67 y 77 mg N/l respectivamente. El porcentaje de amonio (concentración pico) es de 17%, con respecto al nitrógeno inicial (450 mg/l). También se muestra una curva de la suma de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, la cual es indicativa de la velocidad de desnitrificación.

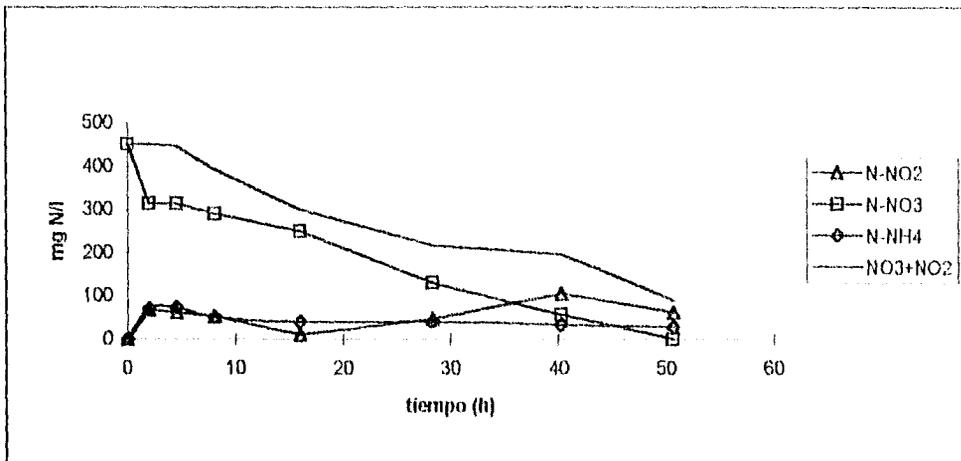


Figura 5.1.-Evolución de nitrato, nitrito y amonio con respecto al tiempo del cultivo batch el cual le fue adicionado 810 mg C-glucosa/l y 450 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, lo que corresponde a una relación C/N 1.8

En la Figura 5.2 se muestra el ensayo correspondiente al de mayor concentración de glucosa (3330 mgC-glucosa/l) donde se mantiene constante la concentración de nitrato (450 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l). Se observa que tanto la concentración acumulada transitoria de nitrito como de amonio es superior a la observada en la Figura 5.1. La concentración pico de amonio representa el 43% y del nitrito el 18%, con respecto al nitrógeno inicial (450 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l). Se muestra también la curva que representa la velocidad de desnitrificación (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

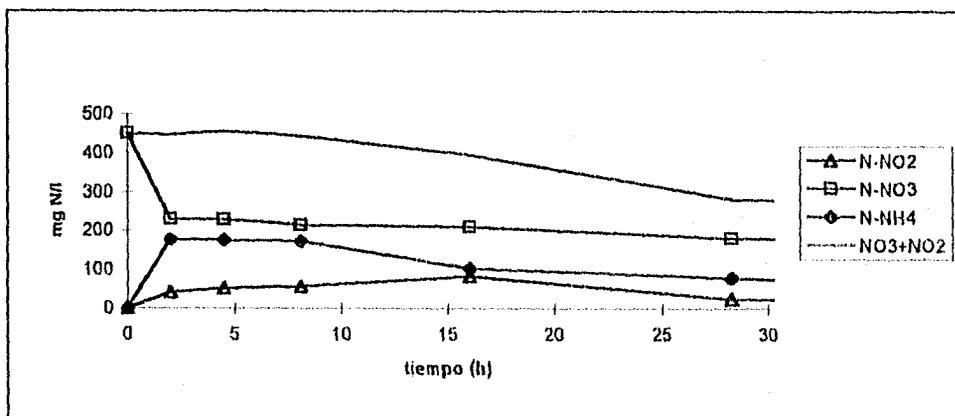


Figura 5.2.-Evolución de nitrato, nitrito y amonio con respecto al tiempo del cultivo batch el cual le fue adicionado 3330 mg C-glucosa/l y 450 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, lo que corresponde a una relación C/N 7.4

También puede notarse que el consumo de nitrato se estaciona después de una rápida caída de la concentración. Estos resultados reiteran nuevamente lo observado en el primer experimento del Capítulo 3, donde se mantuvo constante la concentración de nitrato y se varió la concentración de glucosa, se encontró que a mayor relación C/N mayor fue la formación de amonio. En otros términos, si se mantiene la concentración de nitrato constante, y se varía de forma creciente la concentración de glucosa, se observará un aumento de la concentración de amonio, como resultado de la reducción de nitrato mediante la RDNA.

En la Figura 5.3, se muestran los perfiles de todas las formas nitrogenadas con respecto al tiempo. En esta condición experimental se varió tanto la concentración de glucosa como la concentración de nitrato, para tener una relación C/N intermedia entre 1.8 y 7.4.

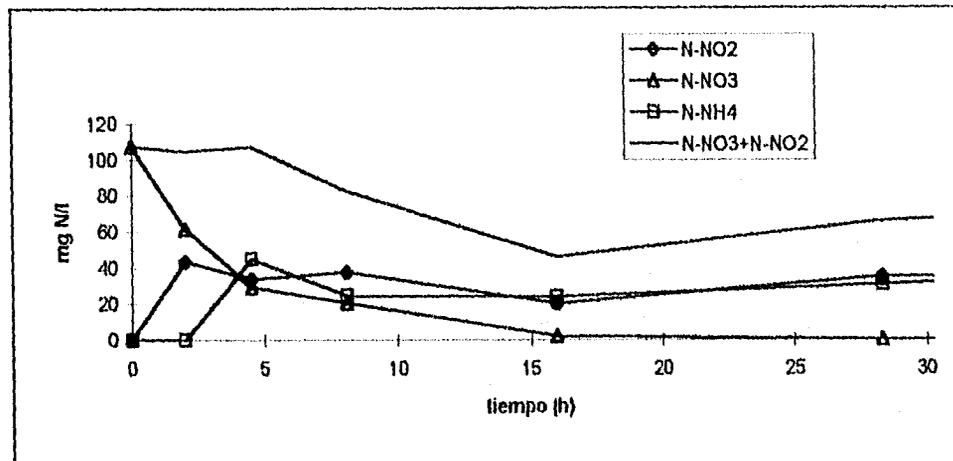


Figura 5.3.-Evolución de nitrato, nitrito y amonio con respecto al tiempo del cultivo batch el cual le fue adicionado 500 mg C-glucosa/l y 100 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, lo que corresponde a una relación C/N 5.

Como se puede observar el nitrato se reduce totalmente a las 16 horas a dos formas nitrogenadas amonio y nitrito en cantidades similares al inicio y al final del ensayo. Es alto el porcentaje de amonio formado y representa más de un 40%, con respecto al

nitrógeno inicial. Se puede notar el efecto negativo sobre la desnitrificación cuando se baja la concentración de nitrato de 450 a 100 mg N/l.

Con base a los resultados obtenidos y mostrados en las Figuras 5.1 a la 5.3, se infiere que cuando la desnitrificación se lleva a cabo a una relación C/N diferente a la estequiométricamente necesaria con glucosa, se pueden presentar dos efectos negativos de la desnitrificación. El primero de ellos está en relación a concentraciones crecientes de glucosa manteniendo constante la concentración de nitrato, es decir a mayor concentración de glucosa menor actividad desnitrificante. Por otro lado se observó el efecto de disminuir la concentración de nitrato, manteniendo constante la concentración de glucosa, la relación fue que a menor concentración de nitrato menor actividad desnitrificante. En conclusión, lo anteriormente observado está directamente relacionado con el cociente C/N, así que de forma general se puede decir que, si se quiere orientar el proceso hacia el metabolismo desnitrificante es importante que éste se realice a una relación C/N cercana a 1.2 y como consecuencia el efecto del poder reductor (glucosa), ya no influiría de forma negativa en la desnitrificación.

### **5.3 Porcentajes y velocidades de desnitrificación**

En la tabla 5.2 se detallan los porcentajes de desnitrificación calculados para cada condición, y se observa que el máximo porcentaje de desnitrificación fue de 80.15%, correspondiendo a la relación C/N 1.8. Como se preveía, la relación 7.4 tuvo menor actividad desnitrificante y la vía predominante fue la reducción desasimilativa de nitrato a amonio. El ensayo que corresponde a la relación C/N intermedia de 5 también tuvo un comportamiento similar, es decir, no desnitrificó en más de 25% del nitrógeno inicial.

Tabla 5.2.- Porcentajes y velocidad de desnitrificación.

Condición Experimental C/N	% desnitrificación	Velocidad específica de desnitrificación mg/ g SSVh	Via predominante
1.8	80.15	5.73	desnitrificación
5.0	57.2	1.97	no hay predominio
7.4	36.6	0.56	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$

Con respecto a las velocidades iniciales de desnitrificación, las cuales fueron calculadas a partir del primer cambio de pendiente de  $\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$  (Figuras 5.1-5.3), se observa que a menor relación C/N, mayor es la velocidad de desnitrificación específica.

En la Figura 5.4 se muestran los consumos de glucosa en función del tiempo de las tres condiciones. Como se puede advertir, en las tres curvas hay un periodo de retardo (8 h), en el que no se consume glucosa, después de este tiempo el consumo es gradual y se agota totalmente a las 30 horas.

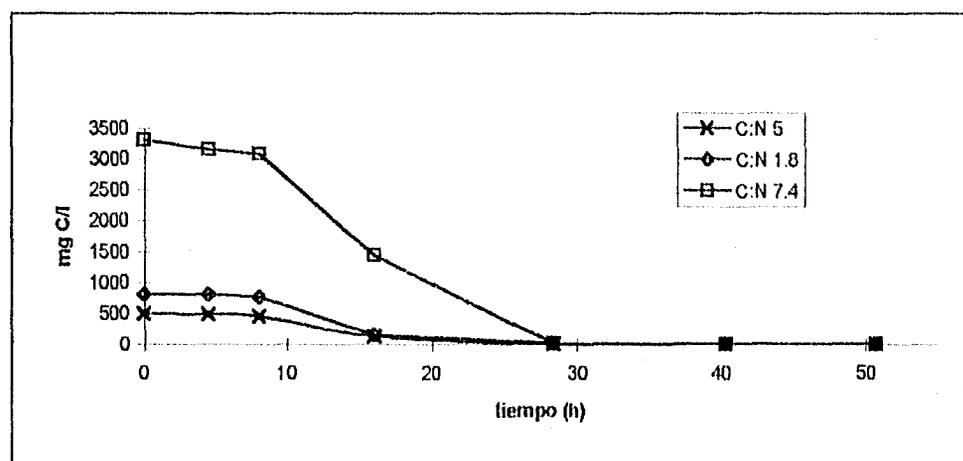


Figura 5.4.- Perfiles de consumo de glucosa en función del tiempo.

Se calcularon las velocidades de consumo de glucosa las cuales fueron 15.5, 29.2 y 78.0 mg C/g SSV h, a las relaciones C/N de 5, 1.8 y 7.4 respectivamente. No parece haber ninguna relación entre la velocidad de consumo de glucosa y relación C/N, pero se puede notar que a mayor concentración de glucosa mayor es la velocidad de consumo de ésta. Se realizaron análisis de gases, hasta casi 700 horas de seguimiento analítico y se graficaron los perfiles de producción de metano postdesnitrificante, como se muestra en la Figura 5.5.

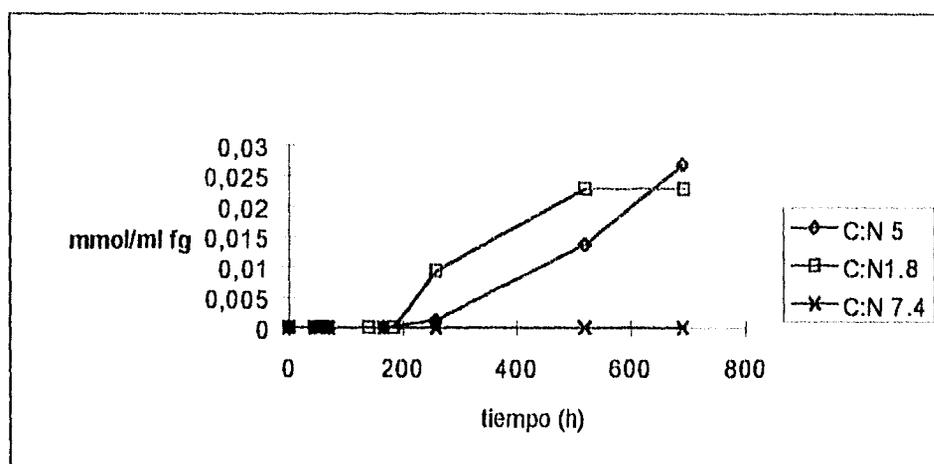


Figura 5.5 Producción de metano postdesnitrificante de cada uno de los cultivos a relaciones C/N 5, 7.4 y 1.8,

En la Figura 5.5, se aprecian tres curvas que representan la evolución de formación metano de cultivos desnitrificantes a tres relaciones C/N (5, 1.8 y 7,4). En ningún caso se produjo metano antes de 190 horas de cultivo, lo que parece confirmar, que mientras hubo nitrato o nitrito en el medio de cultivo, fue inhibida la formación de metano. A pesar de que no haya limitaciones de carbono orgánico. Nótese que a la relación 7,4 no hay producción de metano sin embargo hay una total degradación de glucosa a ácidos grasos. Cabe señalar que un comportamiento similar fue observado en cultivos batch a relación C/N 7.4, pero con concentraciones 100 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/l, el cual se discutió en el Capítulo 3. La inhibición de la producción de metano pudiera deberse a razones de

control del pH. En cambio en los cultivos a relaciones C/N de 5 y 1.8, se observa el doble de la concentración de metano esperado, es decir que todo carbono residual que ya no interviene en la desnitrificación y que estaría disponible para ser utilizado en la metanización, se transformó al 100% en metano. Con lo cual se infiere que se esta eliminando la mayoría de la materia orgánica inicial en forma de metano y  $\text{CO}_2$ .

De acuerdo a los resultados de este ensayo se pueden obtener las siguientes conclusiones.

### **Conclusiones**

La relación C/N tiene un efecto sobre la desnitrificación de mayor importancia, que la naturaleza de la fuente de carbono (glucosa).

La mejor relación C/N para llevar a cabo la desnitrificación con glucosa, fue la estequiométrica de la reacción desnitrificante con dicho sustrato (relación C/N 1.2 aproximadamente)

Como era de esperarse dada la concentración de nitrato (niveles tóxicos de metanización) no era factible que un sistema batch se efectuara simultaneamente la desnitrificación y metanogénesis.

Dependiendo de la naturaleza de la fuente de carbono se observa un efecto positivo o negativo sobre la desnitrificación, con glucosa se observó un efecto negativo, pero este efecto puede anularse cuando el proceso se lleva a cabo a una relación C/N baja (próxima a la relación requerida en la reacción estequiométrica)

## REFERENCIAS

## Referencias

- Akunna J. C., Bizau C and Moletta R. (1994).** Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: ammonium, denitrification and methanogenic activities. *Environ. Tech.* **15**, 41-49.
- Akunna J. C., Bizau C and Moletta R. (1993).** Nitrate and nitrite reduction with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glicerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Wat. Res.* **27**, 1303-1312.
- Akunna J. C., Bizau C. and Moletta R. (1992).** Denitrification in anaerobic digesters: possibilities and influence of wastewater COD/N-NO<sub>x</sub> ratio. *Environ Technol.* **13**, 825-836.
- Almeida J. S., Reis M. A. M. and Carrondo M. J. T. (1993).** Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. Second International Specialized Conference on Biofilms Reactors. Sep-Oct. Paris. Francia.
- Anderson G. K. and Ibrahim A. B. (1978).** Treatment of high nitrate wastewaters by plastic media anaerobic filters with particular reference to latex processing. *Prog. Wat. Tech.* **10**, 5/6, 237-253.
- Anderson B. and Rosen B. (1990).** Upgrading for biological nitrogen removal-some full-scale experiences from Sweden. *Wat. Sci. Technol.* **22**, 93-104.
- APHA. (1989).** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17<sup>a</sup> ed. American Public Health Association. Washington, D. C.
- Balderston W. L., Sherr B. and Payne W. J. (1976).** Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction. En: *Pseudomonas perfectomarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 504-508.
- Bang W. G., Beherendt U., Lang S. and Wagner F. 1983.** Continuous production of L-citrulin from indole and L-serine by inmovilized *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 1013-1019.
- Beccari M., Passino R., Ramadori R. and Tandoi V. (1983).** Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in supende growth culture. *Journal WPCF* **55**, 58-64
- Bell R. G. (1969).** Studies on the decomposition of organic matter in flooded soil. *Soil Biol. biochem.* **1**, 105-116.
- Betlach M. R. and Tiedje J. M. (1981).** Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 1074-1084.

## REFERENCIAS

- Binnerup** S. J., Jensen K., Rvsbech N. P., Jensen M.H. and Sorensen J. (1992). Denitrification, dissimilatory reduction of nitrate to ammonium, and nitrification in a bioturbated estuarine sediment as measured with  $^{15}\text{N}$  and microsensor techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 303-313.
- Biswas** N. and Warnock R. G. (1985). Nitrogen transformations and fate of other parameters in columnar denitrification. *Wat. Res.* **19**, 1065-1071.
- Bitton** G. and Gerba C. P. (1984). *Groundwater Pollution Microbiology*. Wiley, New York, USA.
- Blaszczyk** M. (1993). Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Env. Micro.* 3951-3953.
- Blaszczyk** M. (1992). Comparison of denitrification by *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiol Pol.* **41**, 203-210.
- Blaszczyk** M. (1983). Effect of various sources of organic carbon and high nitrite and nitrate concentration on the selection of denitrifying bacteria II. Continuous cultures in packed bed reactors. *Acta Microbiologica Polonica.* **32**, 65-71.
- Blaszczyk** M., Przytocka-Jusiak M., Kruszewska U. and Mycielski R. (1981). Denitrification of high concentration of nitrites and nitrates in syntetic medium with different sources of organic carbon. I. Acetic acid. *Acta Microbiologica Polonica.* **30**, 49-58.
- Bode** H. (1988). Mesophile and thermophile Hochlastdenitrifikation bei stark nitrathaltigem Abwasser. *Korrespondenz Abwasser.* **5**, 436-438.
- Bock** E., Sundermeyer Klinger H. and Stackerbrandt E. (1983). New facultative lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* **136**, 281-284.
- Boehler** E., Haldenwang L. and Schwabe G. (1993). Results and experience with the Nebio Tube Reactor process in the water treatment plant Coswig near Dresden. Second International Specialized Conference on Biofilms Reactors. Sep-Oct. Paris. Francia.
- Bollag** J. M. and Czlonkowski S. T. (1973). Inhibition of methane formation in soil by various nitrogen-containing compounds. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 673-678.
- Boogerd** F. C., van Verseveld H. W. and Stouthamer A. H. (1980). Electron transport to nitrous oxide in *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett.* **113**, 279-284.
- Bosman** J., Eberhard A. A. and Basker C. I. (1978). Denitrification of concentrate industrial effluent. *Prog. Wat. Technol.* **10**, 297-305.

## REFERENCIAS

- Bringman G., Kühn R. Wagner B.** (1959). Modellversuche zur biologischen stickstoffabgasung aus klärwässern. *Ges. Ing.* **80**, 364.
- Brock T. D. and Madigan M. T.** (1991). *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall. 6<sup>a</sup> ed. Englewood Cliffs. N. J. USA.
- Bryson D. D. y Boeckman O.C.** (1989). Well water methemoglobinemia and water with less than 22.6 mg NO<sub>3</sub>-N/l. *Proc. Am. Chem. Soc. Div. Environ. Chem.* April 9-14. Dallas Texas USA.
- Calder K., Burke K. A. and Lascelles J.** (1980). Induction of nitrate reductase and membrane cytochromes in wild type and chlorate-resistant *Paracoccus denitrificans*. *Arch. Microbiol.* **126**, 149-159.
- Carley B. N. and Mavinic D. S.** (1991). The effects of external carbon loading on nitrification and denitrification of a high-ammonia landfill leachate. *Res. J. WPCF.* **63**, 51-59.
- Çeçen F. and Gönenç I. E.** (1992). Nitrification-denitrification of high-strength nitrogen wates in to up-flow submerged filters. *Wat. Sci. Tech.* **26**, 2225-2228.
- Champ D. R., Gulens J. and Jackson R. R.** (1979). Oxidation-reduction sequences in groudwater flow systems. *Can. J. Earth Sci.* **16**, 12-23.
- Chen G. H., Ozaki H. and Terashima Y.** (1992). Endogenous denitrification in biofilm. *Wat Sci. Technol.* **26**, 523-534.
- Chen K-C. and Lin Y-F.** (1993). The relationship between denitrifying bacteria and methanogenic bacteria in a mixed culture system of acclimated sludges. *Wat Res.* **27**, 1949-1959.
- Christensen M. H. and Harremoes P.** (1972). *Biological denitrification in water treatment*. Dep. of sanitary Engineering, Technical University of Denmark.
- Cole J. A.** (1968). Cytochrome *c*<sub>552</sub> and nitrite reduction in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **162**, 356.
- Cole J. A and Ferguson S. J.** (1988). Assimilatory and dissimilatory reduction of nitrate to ammonia. In "Nitrogen and Sulphur Cycles" Syposium 42, The Society for General Microbiology, Cambridge University Press, U. K.
- Cole, J. A.** (1991). The environmental implications of the biological nitrogen cycle. *International Syposium Environmetal and Biotechnology.* 27-35.

## REFERENCIAS

- Comly H. H. (1945). Cyanosis in infants caused by nitrate in well water. J. Am. Med. Assoc. **129**, 112-116.
- Dawson R. N. y Murphy. (1972). The temperature dependency of biological denitrification. Wat. Res. **6**, 71-83.
- Diario Oficial de la Federacion de los Estados Unidos Mexicanos** (1993).
- Dodd D. J. and Bone D. H. (1975). Nitrate reduction by denitrifying bacteria in single and two stage continuous flow reactors. Wat. Res. **10**, 323.
- Dorsh M. M., Scragg R. K. R., McMichael A. J. , Baghrst P. A. and Dyar K. F. (1984). Congenital malformations and maternal drinking water supply in rural South Australia: a case-control study. Am. J. Epidem. **119**, 473-486.
- Downey R. J., Kizskiss, D. F., and Nuner, J. H. (1969). Induction of nitrate reductase under conditions of nitrogen depletion. Life Sci. **6**, 855-861.
- Edholm, Hultman, Lowen and Sven-Nilson. (1970). Continued studies on denitrification. KTH. Publ. **70**, 1, Stockholm.
- Engberg D.J. and Schroedder E. D. (1975). Kinetics and stoichiometry of bacterial denitrification as a function of cell residence time. Wat. Res. **9**, 1051-1054.
- Eramo B., Gavasci R., Misiti A. and Viotty P. (1993). Validación de a multisubstrate mathematical model for the simulation of the denitrification process in fluidized bed biofilm reactors. Second Internationa Specialized Conference on Biofilms Reactors. Sep-Oct. Paris Francia.
- Fabig W. and Ottow J. C. G. (1979). Isolierung und identifizierung neuer denitrifizierender bakterien aus einer modell-Kläranlage mit anaeroben festbettreaktoren. Arch. Hydrobiol. **85**, 372-391.
- Fass S., Ganaye V., Urbain V., Manem J. and Block J. C. (1994). Volatile fatty acids as organic carbon & sources in denitrification. Environ Technol. **15**, 459-467.
- Fernández Llorente. (1989). Desnitrificación biológica en reactores de lecho fluidizado. Tesis de Licenciatura. Universidad de Valladolid España.
- Fewson C. A. and Nicholas D. J. D. (1961). Nitrate reductase from Pseudomona aeruginosa. Biochim. Biophys. Acta **49**,335-349.
- Forsythe S. J., Dolby, J. M., Webster A. D. B. and Cole J. A. (1988). Nitrate and nitrite-reducing bacteria in the achlorhydric stomach. J. Med. Microbiol. **25**, 253.

## REFERENCIAS

- Francis C. W. and Callahan M. W. (1975).** Biological denitrification and its application in treatment of high nitrate wastewater. *J. Env. Qual.* **4**, 153.
- Francis C. W. and Malone C. D. (1975).** Anaerobic columnar denitrification of high nitrate wastewater. *Proc. IAWPR. Specialized Conference on Nitrogen as a Water Pollutant. Copenhagen, Vol.3.*
- Freeze R. A., and Cherry J. A. (1979).** *Groundwater*, 604 pp. Prentice Hall, Englewood Cliffs. N. J. USA.
- Fujita T. and Sato R. (1967).** Studies on soluble cytochromes in Enterobacteriaceae V. Nitrite-dependent gas evolution in cells containing cytochrome  $c_{552}$ . *J. Biochem.* **62**, 230.
- García-Plazaola J. I., Becerril J. M., Arrese-Igor C., Hernández A., González-Murua C. and Aparicio Tejo P. M. (1993).** Denitrifying ability of thirteen *Rhizobium meliloti* strains. *Plant and Soil.* **149**, 43-50
- Gauntlett R. B. and Craft D. G. (1979).** Biological removal of nitrate from river water. Rep. TR 98, Water Res. Centre, Medmenham.
- Gerber A., Moster E. S., Winter C. T. and Villiers R. H. (1987).** Interaction between phosphate, nitrate and organic substrate in biological nutrient removal processes. *Wat Sci. Technol.* **19**, 183-194.
- Goering J. J. (1972).** The role of nitrogen in eutrophic processes. pp 43-68. In *Water Pollution Microbiology*. Edited by Mitchell R. Wiley -Interscience, New York. USA:
- Grabinska-Loniewska A. y Slavikowa E. (1990).** Fungi in denitrification unit biocenosis. *Wat. Res.* **24**, 565-572.
- Grabinska-Loniewska A., Slomczynski T. and Kanska Z. (1985).** Denitrification studies with glycerol as a carbon source. *Wat. Res.* **19**, 1471-1477.
- Green M., Tarre S., Schnizer M., Bogdan B, Aemon R. and Shelef G. (1994).** Groudwater denitrification using an upflow sludge blanket reactor. *Wat. Res.* **28**, 631-637.
- Gros H., Schnoor G. and Rutten P. (1986).** Nitrate removal from groundwater by autotrophic microorganims. *Wat Supply.* **4**, 11-21.
- Haga K., Osada T. and Harada Y. (1989).** Characterization of piggery wastewater and the control of nitrogen and phosphorus. *Environ. Inf. Sci.* **18**, 57-60.
- Hall T. and Zabel T. (1984).** Biological denitrification of potable water. Rep. 319-S/1. Water Res. Centre, Medmenham.

## REFERENCIAS

- Hallberg G. R.** (1989). Nitrate in ground water in the United States. pp 35-74. *In: Nitrogen management and ground water protection developments in agricultural and managed-forest ecology*. Elsevier New York. USA:
- Hamon M. y Fustec E.** (1991). Laboratory and field study of an in situ groundwater denitrification reactor. *Res.J. WPCF*. 63: 942-949.
- Hanaki K. and Polprasert C.** (1989). Contribution of methanogenesis to denitrification with an upflow filter. *J. WPCF*. 61, 1604-1611.
- Henze M.** (1991). Capabilities of biological nitrogen removal processes from wastewater. *Wat. Sci. Technol.* 23, 669-679.
- Henze M. y Harremoës P.** (1977). Biological denitrification of sewage: a literature review. *Prog. Wat. Tech.* 8, 509-555.
- Harris R. F.** (1982). Energetic of nitrogen transformation. pp 833-890. *In: Nitrogen in Agricultural soils*, American Society of Agronomy. Madison Wis. USA.
- Hiscock K. M., Loid J. W. and Lerner D. N.** (1991). Review of natural and artificial denitrification of ground water. *Wat. Res.* 25, 1099-1111.
- Hochstein L. I., Betlach M. and Kritikos G.** (1984). The effect of oxygen on denitrification during steady-stage growth of *Paracoccus halodenitrificans* *Arch. Microbiol.* 137, 74-78.
- House of Lords.** (1989). Nitrate in water. 16<sup>th</sup> Report, Session 1988-1989 of the Select Committee on the European Communities. HMSO, London.
- Ibrahim A. B.** (1978). Denitrification of high nitrate waste-water by anaerobic filter. *J. Rubber Res. Inst. Malays.* 26, 85-86.
- Ide, Tohya, Suzuki, Matsuo and Osanaï.** (1972). Removal of nitrogen and phosphorus in wastewater treatment. *Pachec.* 72, Session 16-3.
- Jeris J.S., Beer C. and Mueller J. S.** (1974). High rate biological denitrification using a granular fluidized bed. *Journal WPCF*. 46, 2119-2128.
- Jewell W. J. and Cummings R. J.** (1975). Denitrification of concentrated nitrate wastewaters. *Journal WPCF*. 47, 2281-2291.
- Jiménez B., Capdeville B., Roques H. and Faup G. M.** (1984). Etude comparative de la filtration et de la denitrification dans des filtres granulaires immergés. *Environ. Technol. Letters.* 7, 307-312.

## REFERENCIAS

- John P.** (1977). Aerobic and anaerobic respiration monitored by electrodes. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 231-238.
- John P. and Whatley F. R.** (1975). *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature.* **254**, 495-498.
- Johnson, W. K. and Schroepfer, G. J.** (1964). Nitrogen removal by nitrification and denitrification. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.* **36**, 1015.
- Jones W. L.** (1986). Denitrification using sequestered substrate in a sequencing periodic systems. Ph. D. Civ. Univ. California Davis. USA.
- Jones W. L., Schoroeder E. D. and Wilderer P. A.** (1990). Denitrification in a batch wastewater treatment system using sequestered organic substances. *Research Journal WPCF.* **62**, 259-267.
- Juszczak A. and Domka F.** (1988). The effect of initial concentration of nitrates and nitrites on the reduction by the bacteria of *Pseudomonas* genus. *Chem. Stoisow.* **32**, 299-303.
- Kaspar H. F., Tiedje J. M. and Firestone R. B.** (1981). Denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in digested sludge. *Can. J. Microbiol.* **27**, 878-885.
- Kakutani T., Bappu T. and Arima K.** (1981). Regulation of nitrite reductase in the denitrifying bacterium. *Alcaligenes faecalis* S-6. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 23-28.
- Kandler S. and Hippe H.** (1977). Lack of peptidoglycan in the cell walls of *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **113**, 57-60.
- Kaplan N. and Margaritz M.** (1986). A nitrogen-isotope study of the sources of nitrate contamination in groundwater of the pleistocene coastal plain aquifer, Israel. *Wat. Res.* **20**, 131-135.
- Ketellaper V. L.** (1988). The kinetics and stoichiometry of denitrification using acetate as a carbon source. M. S. Thesis, University of Colorado, Boulder, CO. USA.
- Klapwijk A., Hoeven van der J.C. M. and Lettinga G.** (1981). Biological denitrification in an upflow sludge blanket reactor. *Wat. Res.* **15**, 1-6.
- Knowles R.** (1982). Denitrification. *Microbiological Review.* **46**, 43-70.
- Kodama F., Shimada K. and Mori T.** (1967). Studies on anaerobic biphasic growth of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri*. *Pl. Cell Physiol.* **10**, 855-865.
- Kone S. and Beherens U.** (1981). Zur kinetik der Denitrifikation. Teil I: Mischpopulation und acetat als kohlenstoffquelle. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **9**, 523-533.

## REFERENCIAS

- Koopman B., Stevens C. and Wonderlick.** (1990). Denitrification in a moving bed upflow sand filter. Res. J. WPCF. **62**, 239-145.
- Kucera I., Matyasek R. and Dadak V.** (1986). The influence of pH on the kinetics of dissimilatory nitrite reduction in Paracoccus denitrificans. Bioch. et Bioph. Acta. **848**, 1-7.
- Kristensen G. H. and Jepsen S. E.** (1991). Biological denitrification of waste water from wet lime-gypsum flue gas desulphuration plants. Wat. Sci. Tech. **23**,691-700.
- Krui J. M.** (1977). The synthesis of the dissimilatory nitrate reductase under aerobic conditions in a number of denitrifying bacteria, isolated from activated sludge and drinking water. Wat. Res. **11**, 39-43.
- Kuroda M., Shima H. and Sakakibara Y.** (1988). A study on simultaneous treatment of organic matter and nitrate with a biofilm consisting of methane fermentative bacteria and denitrifying bacteria. Proc. Env. and San. Eng. Res. **24**, 231-239.
- Lam Y. and Nicholas D. J. D.** (1969). A nitrite reductase with cytochrome oxidase activity from Micrococcus denitrificans. Biochim. Biophys. Acta. **180**, 459-472.
- Lewadowski Z.** (1985). Denitrification by packed bed reactors in the presence of chromium (VI). Wat. Res. **19**, 589-596.
- Ludzack, F. J. and Ettinger, M.B.** (1962). Controlling operation to minimize activated sludge effluent nitrogen. J. Wat. Pollut. Control Fed. **24**, 920
- Manoharan R., Liptak S., Parkinson P., Mavinic D. and Randall C. W.** (1989). Denitrification of high ammonia leachate using an external carbon source. Environ. Technol. **10**, 701-706.
- Mavinic D. S. and Koers D. A.** (1982). Fate of nitrogen in aerobic sludge digestion. Journal WPCF. **54**, 352-360.
- Mechalas, B. J., Allen P. M., and Matyskiela W. W.** (1970). A study of nitrification and denitrification. Report from Contract 14-12-498. Federal Water Quality Administration. Dep. of Interior.
- Meiberg J. B., Broinenberg P. M. and Harder W.** (1980). Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated aminas in Hyphomicrobium X in the absence and presence of nitrate: evidencia for "aerobic" denitrification. J. Gen. Microbiol. **120**, 453-463.
- McCarty P. L., Beck L. A. y Amant P. P.** (1969). Biological denitrification of wastewater by addition of organic materials. Proceeding, 24th Industrial Wate Conference, Purdue University, Lafayette, Indiana.

REFERENCIAS

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Misra C., Nielsen D. R., Biggar J. W. (1974). Nitrogen transformations in soil during leachates. III. Nitrate reduction in soil columns. *Soil Sci. Amer. Proc.* **38**, 300-361.
- Moore S. F. and Schroeder E. D. (1971). The effect of nitrate feed on denitrification. *Wat. Res.* **5**, 445-452.
- Mycielski R., Jaworowska-deptuch and Blaszczyk M. (1985). Quantitative selection of denitrifying bacteria in continuous cultures and requirement for organic carbon. I Starch. *Acta Microbiologica Polonica.* **34**, 67-79.
- Mycielski R., Blaszczyk M., Kackowska A. y Olkowska H. (1983). Denitrification of high concentration of nitrites and nitrates in syntetic medium with different sources of organic carbon. II. Ethanol. *Acta Microbiologica Polonica.* **32**, 381-388.
- Myers R. J. K. (1972). The effect of sulphide on nitrate reduction in soil. *Plant Soil.* **37**, 431-433.
- Nurse G. R. (1980). Denitrification with methanol: microbiology and biochemistry. *Water. Res.* **14**, 531-537.
- Payne W. J. (1981). Denitrification as a factor in soil science: general properties. *In: Denitrification.* pp. 118-133. John Wiley and Sons, New York. USA.
- Payne W. J. (1973). Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **37**, 409-452.
- Payne W. J. and Riley P. S. (1969). Suppression by nitrate of enzymatic reduction of nitric oxide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **132**, 258-260.
- Perrone C. y Park H. S. (1986). Advances in anion analysis: Reversed-Phase ion-pair chromatography with indirect photometric detection. Perkin Elmer Corporation Norwak. C. T. 06856.
- Pichinoty F. (1973). La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. *Bull. Inst. Pasteur Paris.* **71**, 317-395.
- Pickard D. (1987). Successful nitrification and denitrification at Hooker's Point. *Biol Nitr. and Phos. Rem. the Florida experience.* TREEO CENT. University of Florida. Gainesville.
- Porte F. y Vignais P. M. (1980). Electron transport chain and energy transduction in *Paracoccus denitrificans* under autotrophic growth conditions. *Arch. Microbiol.* **127**, 1-10.
- Requa D. A. y Schroeder E. D. (1973). Kinetics of packed bed denitrification. *J. WPCF.* **45**, 1695-1702.

REFERENCIAS

ESTA TESIS NO PUEDE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Misra C., Nielsen D. R., Biggar J. W. (1974).** Nitrogen transformations in soil during leachates. III. Nitrate reduction in soil columns. *Soil Sci. Amer. Proc.* **38**, 300-361.

**Moore S. F. and Schoroder E. D. (1971).** The effect of nitrate feed on denitrification. *Wat. Res.* **5**, 445-452.

**Mycielski R., Jaworowska-deptuch and Blaszczyk M. (1985).** Quantitative selection of denitrifying bacteria in continuous cultures and requirement for organic carbon. I Starch. *Acta Microbiologica Polonica.* **34**, 67-79.

**Mycielski R., Blaszczyk M., Kackowska A. y Olkowska H. (1983).** Denitrification of high concentration of nitrites and nitrates in syntetic medium with different sources of organic carbon. II. Ethanol. *Acta Microbiologica Polonica.* **32**, 381-388.

**Myers R. J. K. (1972).** The effect of sulphide on nitrate reduction in soil. *Plant Soil.* **37**, 431-433.

**Nurse G. R. (1980).** Denitrification with methanol: microbiology and biochemistry. *Water. Res.* **14**, 531-537.

**Payne W. J. (1981).** Denitrification as a factor in soil science: general properties. *In: Denitrification.* pp. 118-133. John Wiley and Sons, New York, USA.

**Payne W. J. (1973).** Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **37**, 409-452.

**Payne W. J. and Riley P. S. (1969).** Suppression by nitrate of enzymatic reduction of nitric oxide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **132**, 258-260.

**Perrone C. y Park H. S. (1986).** Advances in anion analysis: Reversed-Phase ion-pair chromatography with indirect photometric detection. Perkin Elmer Corporation Norwak. C. T. 06856.

**Pichinoty F. (1973).** La réduction bactérienne des composés oxygénés minéraux de l'azote. *Bull. Inst. Pasteur Paris.* **71**, 317-395.

**Pickard D. (1987).** Successful nitrification and denitrification at Hooker's Point. *Biol Nitr. and Phos. Rem. the Florida experience.* TREEO CENT. University of Florida. Gainesville.

**Porte F. y Vignais P. M. (1980).** Electron transport chain and energy transduction in *Paracoccus denitrificans* under autotrophic growth conditions. *Arch. Microbiol.* **127**, 1-10.

**Requa D. A. y Schroeder E. D. (1973).** Kinetics of packed bed denitrification. *J. WPCF.* **45**, 1695-1702.

## REFERENCIAS

- Richard Y. R.** (1989). Operating experiences of full-scale biological and ion-exchange denitrification plants in France. *J. Inst. Wat. Environ.* **3**, 154-167.
- Rittman B. E. and Langeland W. E.** (1985). Simultaneous denitrification with nitrification in single-channel oxidation ditches. *Journal WPCF.* **57**, 300-308.
- Robertson L. A. and Kuenen J. G.** (1984). Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.* **139**, 351-354.
- Rogalla E., Ravarini P., Larminat G. and Coutelle J.** (1990). Large-scale biological nitrate and ammonia removal. *J. Inst. and Environ. Mgmt.* **44**, 319-329.
- Salamanca G. G.** (1992). Características generales relativas a la bioquímica de los procesos anaerobios. *Artículos Tec.(España). Tecnología del agua.* **90**, 49-56
- Samuelsson M-O.** (1985). Dissimilatory nitrate reduction to nitrite, nitrous oxide and ammonium by *Pseudomonas putrefaciens*. *Appl. Env. Microbiol.* **50**, 812.
- Sawhney V. and Nicholas D. J. D.** (1978). Sulphide linked nitrite reductase from *Thiobacillus denitrificans* with cytochrome oxidase activity: purification and properties. *J. Gen. Microbiol.* **106**, 119-128.
- Sheng-Kun C., Chin-Kun J. and Sheng-Shung C.** (1991). Nitrification and denitrification of high-strength ammonium and nitrite wastewater with biofilm reactors. *Wat. Sci. Tech.* **23**, 1417-1425.
- Sikora L. J., and Keeney D. R.** (1976). Evaluation of a sulfur *Thiobacillus denitrificans* nitrate removal system. *J. Environ. Qual.* **5**, 298-303.
- Skerman V. B. D. and McRae I. C.** (1957). The influence of oxygen availability on the degree of nitrate reduction by *Pseudomonas denitrificans*. *Can. J. Microbiol.* **3**, 505-530.
- Skrinde J. R. and Bhagat S. K.** (1982). Industrial wastes as carbon sources in biological denitrification. *Journal WPCF.* **54**, 370-377.
- Smith J. M., Masse A. N., Feige W. A. and Kamphake L. J.** (1972). Nitrogen removal from municipal waste water by columnar denitrification. *Environ. Sci. Technol.* **6**, 260-267.
- Southeimer H. and Rohmann U.** (1984). Grundwasserbelastung mit Nitrat-Ursachen, Bedeutung, Lösungswege. *G. W. F.-Wass. Abwass.* **125**, 599-608.
- Sorg T. J.** (1979). Nitrate removal from drinking water. Paper presented at EPA seminar on nitrates in groundwater, 3-4 October Kansas City, Mo. .
- Spector W. S.** (1956). *Handbook of Biological Data.* Saunders, Philadelphia, Pa.

## REFERENCIAS

- Stouthamer A. H.** (1976). Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **14**, 315-375.
- Suwa Y., Suzuki T., Toyohara H., Yamagishi T. and Urushigawa Y.** (1992). Single-stage, single sludge nitrogen removal by an activated sludge process with cross-flow filtration. *Wat. Res.* **26**, 1149-1157.
- Szpyrkowicz L., Rigoni-Stern S. and Zilio Grandi F.** (1991). Nitrification and denitrification of tannery wastewaters. *Wat. Res.* **25**, 1351-1356.
- Tam N. F. Y., Wong Y. S. and Leung G.** (1992). Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrient by the nitrification-denitrification process. *Wat. Res.* **26**, 1229-1236.
- Tiedje J. M. and Zehnder A. J. B.** (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. pp 174-244 *In: Biology of Anaerobic Microorganisms.* John Wiley, New York. USA.
- Tiedje J. M. Page A. L.** (1982). Denitrification. pp 1011-1026. *In: Methods of soil analysis,* part 2, 2<sup>a</sup> ed. American Society of Agronomy. Madison Wis. USA.
- Toit J. C. and Davies C.** (1973). Denitrification studies with laboratory scale continuous flow-units. *Wat. Res.* **7**, 489-500.
- Trevors J. T.** (1985). The influence of oxygen concentrations on denitrification in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 152-155.
- Turk K. O. and Mavinic D. S.** (1987). Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environ. Technol. Letters.* **8**, 419-426.
- Vogel A. I.** (1974). *Química Analítica Cualitativa.* 2<sup>a</sup> ed. Kapeluz. España.
- Watanabe Y., Masuda S. and Ishiguro M.** (1992). Simultaneous nitrification in micro-aerobic biofilms. *Wat. Sci. Technol.* **26**, 511-522.
- Wheatland A. B., Barrett, M. J. and Bruce A. M.** (1959). Some observations on denitrification in rivers and estuaries. *Inst. Sewage Purif., J. Proc.* **2**, 258-271.
- Wilderer P. A. and Schroeder E. D.** (1986). Anwendung des Sequencing Batch reactor (SBR). *Verfahrens zur Siedlungswasserswirtsch.* **4**, Techn. Universität Hamburg.
- Wilderer P. A., Warren L. J. and Dau U.** (1987). Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Research.* **21**, 239-245.

**REFERENCIAS**

**Wimpenny J. W. and Warnsley A. M. H. (1968).** The effect of nitrate on Krebs cycle enzymes in various bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **156**, 297.

**Wimpenny J. W.T. and Cole J. A. (1967).** The regulation of metabolism of facultative bacteria III. The effect of nitrate. *Biochim. Biophys. Acta.* **148**, 233.

**Winter C. T. (1989).** The role of the acetato in denitrification and biological phosphate removal in modified Bardenpho systems. *Wat. Sci. Technol.* **21**, 375-385.

**Woods D. D. (1938).** The reduction of nitrate to ammonia by *Clostridium welchii*. *Biochem. J.* **32**, 2000.

**Wuhrmann, K. (1964).** Nitrogen removal in sewage treatment processes. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **15**, 580

**Zehnder A. J. B. (1988).** Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. pp 174-244 *In: Biology of Anaerobic Microorganisms.* John Wiley, New York. USA.