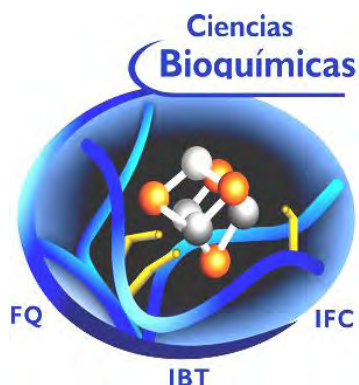


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA**



**DESNITRIFICACIÓN DE AGUAS RESIDUALES  
CON METANO COMO FUENTE DE CARBONO Y  
ENERGÍA**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

Facultad de Química

P R E S E N T A :

**ING. MARGARITA ELIZABETH CISNEROS ORTIZ**

TUTOR:

**DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES**



ABRIL DE 2009

---

*Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía*



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente:	Dra. Ma. Del Carmen Wacher Rodarte
Secretario:	Dra. Susana Saval Bohórquez
Vocal:	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
1 <sup>er.</sup> Suplente:	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
2 <sup>do.</sup> Suplente:	Dr. Francisco Ruiz Terán

Lugar donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM.

**TUTOR DE TESIS:**

---

DR. ADALBERTO NOYOLA ROBLES

---

*Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía*

# AGRADECIMIENTOS

Con mi gratitud para:

Dr. Adalberto Noyola Robles.

Por la dirección, asesoría y revisión de este trabajo. Gracias por su confianza.

Dra. Ma. Del Carmen Wachter Rodarte

Dra. Susana Saval Bohórquez

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Dr. Francisco Ruíz Terán

Por su asesoría y revisión de este trabajo.

A mi madre: Ma. Concepción Ortíz Villalpando por su gran cariño y porque siempre ha buscado mi bienestar.

A toda mi familia, porque siempre han estado pendientes de todo lo que hago

Dr. Germán Buitrón Méndez por formar parte de mi comité tutorial

Mis compañeros y amigos del Instituto de Ingeniería: Norma Angélica Beltrán Zarza, mi amiguita; Ana Laura Deyta Tecó, Catalina Maya Rendón, Rosevelia Ruenes Morales, Rosa Dávila Zamora, Lucila Mendoza Sánchez, Lorenzo Sánchez Ibarra, Roberto Briones Méndez, Soledad Lucario y Juan Manuel Morgan Sagastume por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo. Amigos gracias por sus palabras de aliento y por apoyarme en todo momento.

Mis amigas y compañeras de trabajo: Guadalupe Urquiza Moreno, Neftalí Rojas Valencia, Adriana Ramírez González, Isaura Yañez Noguez, Gloria Moreno Rodríguez y Leticia García Montes de Oca; tienen razón: Si se puede!!!!,

A los becarios del Grupo de Investigación en Digestión Anaerobia: Alejandra Pavía Espinoza, Lisrevé Monter Santos, Luis Antonio Rubio Loza y en especial a Antonio Tinajero Torres: gracias por tu apoyo incondicional.

Al posgrado de Ciencias Bioquímicas, al Instituto de Ingeniería y al CONACyT por el apoyo para la realización de este trabajo.

A Leticia García Gutiérrez por tu buena disposición y tu apoyo incondicional para la gestión de los trámites administrativos en el posgrado pero en especial gracias por tu confianza y amistad.

# CONTENIDO

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
AGRADECIMIENTOS.....	8
RESUMEN.....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 EL NITRÓGENO EN LA NATURALEZA Y EN LAS ACTIVIDADES HUMANAS.....	13
2.1 Formas del nitrógeno en la naturaleza.....	13
2.1.1 Ciclo del nitrógeno.....	13
2.1.2 Nitrógeno como ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ).....	15
2.1.3 Nitrógeno como ión amoniaco ( $\text{NH}_3$ ).....	15
2.1.4 Nitrógeno en forma de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ).....	16
2.1.4 Nitrógeno en forma de nitratos ( $\text{NO}_2^-$ ).....	16
2.2 Métodos para la remoción de nitrógeno de aguas residuales.....	17
2.2.1 Desorción o stripping de amoniaco.....	17
2.2.2 Intercambio iónico.....	18
2.2.3 Cloración hasta el punto de ruptura.....	18
2.2.4 Osmosis inversa.....	19
2.2.5 Normatividad Mexicana. Límites máximos permisibles para contaminantes básicos (nitrógeno total).....	19
2.2.6 Desnitrificación biológica.....	20
2.5 Remoción biológica del nitrógeno.....	22
2.3.1 Desnitrificación Heterótrofa.....	22
2.3.2 Desnitrificación Autótrofa.....	22
2.3.3 Bacterias que intervienen en el proceso de nitrificación.....	23
2.3.4 Bacterias que intervienen en el proceso de desnitrificación... ..	23
2.3.5 Factores que afectan el proceso de desnitrificación.....	24
3 USO DE METANO COMO SUSTRATO PARA LA DESNITRIFICCIÓN ESTADO DEL ARTE.....	25
3.3 Sistema A <sup>2</sup> /O Anaerobic-Aerobic-Oxic).....	27
3.4 DNS (Simultaneous Nitrification-Denitrification).....	28
3.5 Sistema ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXdation).....	28
3.6 Sistema SHARON (Single-reactor High-activity Ammonium Removal over Nitrite).....	28
3.7 Sistema SURAMOX SULphate Reduction and Ammonium Oxidation)... ..	29
3.8 Sistema Anaerobio-Anóxico-Aerobio (AAA).....	29
3.9 Uso del metano como fuente de energía para la desnitrificación.....	31
4 OBJETIVO GENERAL.....	42
4.1 Objetivos específicos.....	42
4.2 Hipótesis.....	42
5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	43
5.1 Obtención del inóculo desnitrificante.....	43

5.1.1 Caracterización del inóculo desnitrificante.....	43
5.2 Prueba en columna en lote.....	44
5.2.1 Descripción del dispositivo Experimental.....	44
5.2.2 Inoculación del reactor.....	45
5.2.3 Seguimiento de la fase líquida.....	45
5.2.4 Seguimiento de la fase gaseosa.....	46
5.3 Pruebas microbiológicas.....	47
5.3.1 Número Más Probable (NMP). Prueba presuntiva.....	47
5.3.2 Tinción de Gram y Prueba de la Catalasa.....	47
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
6.1 Inóculo desnitrificante.....	49
6.2 Prueba en lote en columna.....	50
6.3 Pruebas microbiológicas.....	53
7 CONCLUSIONES.....	57
8 RECOMENDACIONES.....	58
9 BIBIOGRAFÍA.....	59
ANEXO 1.....	64
A.1.1 Medio para bacterias desnitrificantes.....	64
A.1.2 Solubilidad del metano.....	64
• Ley de Henry.....	64
ANEXO 2.....	67
METANO COMO FUENTE DE CARBONO Y ENERGIA PARA LA DESNITRIFICACIÓN BIOLÓGICA DE AGUAS RESIDUALES	67

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 2.1 Solubilidad del amoniac.....	17
Tabla 2.2 Límites máximos permisibles de nitrógeno total (NOM-001-SEMARNAT-1996).....	20
Tabla 3.1 Velocidad de remoción de nitrato obtenida en diferentes investigaciones usando metano.....	40
Tabla 5.1 Parámetros analizados durante el monitoreo del digestor anóxico.....	46
Tabla 6.1 Valores de IVL y VS del inóculo desnitrificante.....	49
Tabla A.1.1 Medio para bacterias desnitrificantes.....	64
Tabla A.1.2 Constante de Henry para CH <sub>4</sub> a 20°C.....	64
Tabla A.1.3 Concentración de CH <sub>4</sub> disuelto a 20°C en función de la presión.....	66
Figura 2.1 Principales etapas del ciclo del nitrógeno y algunos organismos asociados.....	14

Figura 2.2 Ciclo del nitrógeno.....	15
Figura 2.3 Solubilidad del amoníaco a distintos potenciales de hidrógeno.....	18
Figura 2.4 Curva obtenida en la cloración a punto de quiebre.....	19
Figura 3.1 Sistema BANDENPHO para la remoción de nitrógeno.....	25
Figura 3.2 Sistema ANANOX para la remoción de nitrógeno.....	26
Figura 3.3 Sistema A <sup>2</sup> /O para la remoción de nitrógeno.....	27
Figura 3.4 Posibles rutas para remover/recuperar nitrógeno del tratamiento biológico de aguas residuales.....	29
Figura 3.5 Sistema ANAEROBIO-ANÓXICO-AEROBIO (AAA) para la remoción de nitrógeno.....	30
Figura 5.1 Dispositivo Experimental (Reactor anóxico).....	44
Figura 5.2. Tinción diferencial de Gram.....	48
Figura 6.1 Cinéticas de desnitrificación del lodo adaptado.....	50
Figura 6.2 Actividad desnitrificante (AD) y comportamiento de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) con respecto al tiempo.....	51
Figura 6.3 Relación entre la actividad desnitrificante y el consumo de metano un proceso de desnitrificación biológica (lotes semanales).....	52
Figura 6.4 Tubos en campana de Durham para número más probable (NMP).....	53
Figura 6.5 a) Tinción de Gram y b) Prueba de la catalasa.....	54

## ABREVIATURAS

IVL.....	Índice volumétrico de lodos
VS.....	Velocidad de sedimentación
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	Ión amonio
NH <sub>3</sub> .....	Amoníaco
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	Nitrato
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	Nitrito
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L.....	Nitrógeno como nitratos por litro
mg de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L*h.....	Velocidad de desnitrificación en mg de nitrógeno como nitratos por litro por hora
mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /g SSV*d.....	Actividad desnitrificante en mg de nitrógeno como nitratos por gramo de sólido suspendido volátil por día
N <sub>2</sub> .....	Nitrógeno molecular o dinitrógeno
NO.....	Óxido nítrico
N <sub>2</sub> O.....	Óxido nitroso
NADH.....	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina
CO <sub>2</sub> .....	Bióxido de carbono
H <sub>2</sub> O.....	Agua
S <sup>o</sup> .....	Azufre elemental

SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> .....	Ión sulfato
C.....	Carbono
N.....	Nitrógeno
S.....	Azufre
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> .....	Glucosa
CH <sub>3</sub> COOH.....	Ácido acético
H <sup>+</sup> .....	Ión hidruro
mg/L.....	mg por litro
Sistema BARDENPHO.....	BARnard DENitrification PHOSphorus
Sistema ANANOX.....	ANerobic-ANoxi-OXic
Sistema A <sup>2</sup> /O.....	Anaerobic-Aerobic-Oxic
Sistema DNS.....	Simultaneous Nitrification-Denitrification
Sistema ANAMMOX.....	ANAerobic AMMonium OXidation
Sistema SHARON.....	Single-reactor High-activity Ammonium Removal Over Nitrite
Sistema SURAMOX.....	SULphate Reducction and AMmonium OXidation
Sistema AAA.....	Anaerobio-Anóxico-Aerobio
UASB.....	Upflow Anaerobic Sludge Blanket o reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente
KNO <sub>3</sub> .....	Nitrato de potasio
AME-D + Asimilación.....	Oxidación aerobia de metano acoplada a desnitrificación + asimilación
AME-D.....	Oxidación aerobia de metano acoplada a desnitrificación + asimilación
ANME-D.....	Oxidación anaerobia de metano acoplada a desnitrificación
ME-SND + Asimilación.....	Asimilación (Oxidación de metano acoplada a reducción no asimilativa de nitrato a nitrógeno molecular
KJ/reacción.....	Kilo Joule por reacción
NaNO <sub>3</sub> .....	Nitrato de sodio
SST.....	Sólidos suspendidos totales
SSV.....	Sólidos suspendidos volátiles
SSF.....	Sólidos suspendidos fijos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Peróxido de hidrógeno
NMP.....	Número Más Probable
CH <sub>4</sub> .....	Metano
O <sub>2</sub> .....	Oxígeno
C/N.....	Relación carbono nitrógeno
C/O.....	Relación carbono oxígeno



# 1 INTRODUCCIÓN

Las actividades industriales, comerciales, agrícolas y domésticas son fuentes generadoras de aguas residuales, las cuales presentan características físicas, químicas y biológicas tan diversas como las materias primas y los productos involucrados en tales actividades. El impacto negativo que pueden causar sobre el medio ambiente estas descargas incontroladas tiene implicaciones no sólo ecológicas, sino también económicas y sociales cada vez más graves. Debido a esto, el control de las descargas, la remoción y la disposición adecuada de las aguas residuales, ha tomado un papel relevante dentro del campo del control ambiental. Esto hace necesario recolectar los residuales para darles un tratamiento efectivo antes de devolverlas al ambiente. Además en muchos casos las aguas residuales tratadas pueden ser reusadas en la agricultura y la industria.

El nitrógeno es uno de los principales contaminantes comúnmente encontrados en aguas residuales, con impactos potencialmente importantes en cuerpos de agua (ríos, lagos y lagunas). Este elemento presenta diferentes formas contaminantes como el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), amoniaco  $\text{NH}_3$ , nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).

Por otro lado, el nitrógeno es un nutriente importante que se adiciona al suelo para mejorar su fertilidad en forma de sales de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Cuando estas especies de nitrógeno alcanzan a los cuerpos de agua son causa de graves problemas. Un ejemplo de esto es la eutroficación, la cual provoca un gran daño ambiental.

Otros ejemplos de contaminación con nitratos en agua residual y potable los podemos observar en algunas industrias como las emparadoras de cárnicos y de pescados, las productoras de fertilizantes, de explosivos, de absorción de óxidos nitrogenados en equipos de lavado de aire y de efluentes de curtiduría, por mencionar algunos, debido a que contribuyen de manera importante en la contaminación de los cuerpos de agua ya que sus descargas incrementan las concentraciones de nitritos y nitratos. Esto representa un problema en la salud humana pues la ingestión de agua contaminada con altas concentraciones de estos compuestos está relacionada con enfermedades como la metahemoglobinemia (conocida también como síndrome del bebé azul) y el cáncer gástrico por mencionar algunas (Bryson y Boeckman, 1989; Dorsh *et al.*, 1984 y Comly, 1945).

Por lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica (SSPEUN) establecieron normas de calidad para el agua potable y el nivel fijado fue de 10 mg N- $\text{NO}_3^-$ /L debido a que la contaminación por nitratos no solo

En México los procesos de tratamiento de agua residual poco se enfocan en la eliminación de nitritos. La legislación mexicana vigente, NOM-001-SEMARNAT-1996 establece como límite máximo permisible un valor de 40 mg/L de nitrógeno total para descargas de aguas a ríos con uso para riego agrícola, y de 15 mg/L para protección de vida acuática (Diario oficial de la Federación, 1997).

Ante esta problemática es necesario desarrollar nuevos procesos biológicos de tratamiento de aguas para la eliminación de nitritos y nitratos.

En 1994 Morgan-Sagastume *et al.* desarrollaron el Sistema Anaerobio-Anóxico-Aerobio (Sistema triple A) para la remoción de nitrógeno. La diferencia del Triple A con otros sistemas radica en que la mayoría poseen un sistema de remoción de nitrógeno en lodos activados con zona anóxica, esto genera el uso de sedimentadores y de recirculación de lodos lo cual eleva el costo del sistema de tratamiento. En el proceso triple A se tienen reactores con biomasa fija (tipo lecho de lodos y filtro empacado). En ese proceso, el agua residual entra al reactor anaerobio en donde se elimina el 60-80% del contenido de materia orgánica y se transforma el nitrógeno orgánico en amoniacal. El agua evacuada se mezcla con la corriente de recirculación proveniente del reactor nitrificador, la cual contiene nitrógeno oxidado en forma de nitratos principalmente. En el segundo reactor, los nitratos son transformados en nitrógeno molecular que es inocuo al medio ambiente y se consume el contenido de materia orgánica biodegradable evacuada por el reactor anaerobio. El nitrógeno amoniacal que pasa sin cambios a través de este reactor se oxida a nitratos en el tercer reactor y al ser recirculados al reactor desnitrificador se convierten en nitrógeno molecular y así se entrega un agua tratada con un mínimo de compuestos nitrogenados. Este arreglo puede ser complementado con un segundo reactor desnitrificador al final del proceso, con el fin de incrementar la eficiencia de remoción del nitrógeno sobre un 95%.

Quezada (1993) implementó una sencilla metodología en lote que permitió observar la actividad desnitrificante de los microorganismos presentes en un lodo usando metano como única fuente de carbono y energía. Probó 4 diferentes temperaturas (13, 20, 27 y 30°C) y 16 concentraciones de nitrato (16, 20, 30, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 140, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L). Los resultados mostraron que es factible utilizar metano como donador de electrones en el proceso de desnitrificación aún cuando las tasas fueron bajas (0.16-0.52 mg de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h) comparadas con las que se reportan usando metanol (4.6 mg de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h Sollo *et al.* (1976).

En los últimos 30 años, se ha publicado un número limitado de trabajos donde se usa el metano como fuente de carbono y energía en la desnitrificación biológica. Los trabajos reportados difieren en sus resultados ya que no ha quedado claro si en metano puede ser o no usado como única fuente de carbono y energía en un proceso de desnitrificación biológica dejando una línea de investigación por explorar. El metano, por ser el principal subproducto de la digestión anaerobia; es una opción práctica de sustrato barato y del que se podrían obtener tasas

---

### ***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

razonables de remoción de nitrato. Un ejemplo de ello es el Sistema Triple A mencionado arriba, donde el efluente final no contiene alta concentración de materia orgánica y el biogás generado en el reactor anaerobio puede ser usado para la remoción de nitratos.

# RESUMEN

La descarga de contaminantes industriales o municipales a los cuerpos de agua ha elevado la concentración de carbono y nitrógeno dando como resultado desequilibrios ecológicos. Su eliminación puede llevarse a cabo por procesos fisicoquímicos y biológicos, siendo estos últimos los más adecuados debido a su relativo bajo costo y adecuada eficacia para la remoción. Las principales fuentes de contaminación nitrogenada son de origen industrial y agrícola. En nuestro país a la fecha se han instalado pocos procesos para la eliminación de nitrógeno de las aguas residuales.

La desnitrificación es un proceso respiratorio que necesita de un donador de electrones que sirva como fuente de carbono y energía. Las bacterias desnitrificantes son generalmente heterótrofas y necesitan carbono orgánico para reducir el nitrato a gas nitrógeno. En algunos casos, las aguas residuales requieren la presencia de una fuente de carbono externa para eliminar los nitratos, por lo que se hace necesario adicionar metanol, etanol, glucosa o acetato, por nombrar los más comunes. Sin embargo, la adición de estos sustratos incrementa el costo del tratamiento y su adición debe ser controlada pues pueden ser tóxicos. La literatura reportada hasta el momento sugiere que el metano puede ser usado como única fuente de carbono y energía por cualquiera de los siguientes procesos: 1) oxidación de metano bajo condiciones desnitrificantes (anóxicas) y 2) oxidación de metano y reducción de nitrato con limitación de oxígeno, a partir de los cuales se considera que los microorganismos metanótrofos son los responsables de oxidar metano produciendo compuestos de más fácil asimilación para las bacterias desnitrificantes, como el metanol.

Termodinámicamente la desnitrificación con metano es posible en ausencia de oxígeno pero existe controversia sobre las condiciones que deben aplicarse para usar el metano como única fuente de carbono y energía en el proceso de desnitrificación biológica. A partir de lo anterior, se realizó el presente trabajo cuyo objetivo fue determinar si el metano puede ser usado como única fuente de carbono y energía en un proceso de desnitrificación biológica en ausencia de oxígeno.

Para el proceso de desnitrificación se generó un inóculo que fue transformado de activado a desnitrificante en presencia de glucosa, el cual presentó buena capacidad de sedimentación y una velocidad de desnitrificación de 21.39 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h. A partir de la inoculación, durante 152 días se operó un reactor anóxico con capacidad de 2.5 L que contenía agua sintética (un litro de medio desnitrificante), un litro de lodo desnitrificante (2.9 g/L) y una concentración de 35 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (relación C/N = 1.5). Se introdujo metano puro (99.0%) al sistema hasta alcanzar una presión parcial de 0.56 kg/cm<sup>2</sup> (8 lb/pulgada<sup>2</sup>). Para dar seguimiento al dispositivo experimental, se realizaron determinaciones de nitratos, sólidos suspendidos volátiles, fijos y totales y pH. Se cuantificó el metano presente en la fase gaseosa y se realizaron las pruebas microbiológicas de Número Más Probable (NMP), tinción de Gram y prueba de la catalasa.

La actividad desnitrificante obtenida al término de este trabajo fue de 2.3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*d (6.7 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h) la cual es baja, comparada con lo que se reporta en la literatura cuando se usa metano bajo condiciones aerobias limitadas (<2 mg/L O<sub>2</sub>). La concentración de sólidos suspendidos volátiles cayó de 2.9 a 0.81 g/L. Lo anterior indica que el metano no puede ser usado como fuente de carbono para la desnitrificación bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta investigación, por lo tanto no podría ser un sustrato viable para la desnitrificación biológica en aguas residuales. Entre las probables causas de la baja actividad desnitrificante se pueden citar, el uso de glucosa para la transformación del lodo activado a desnitrificante, además de una pobre transferencia de masa en el reactor utilizado.

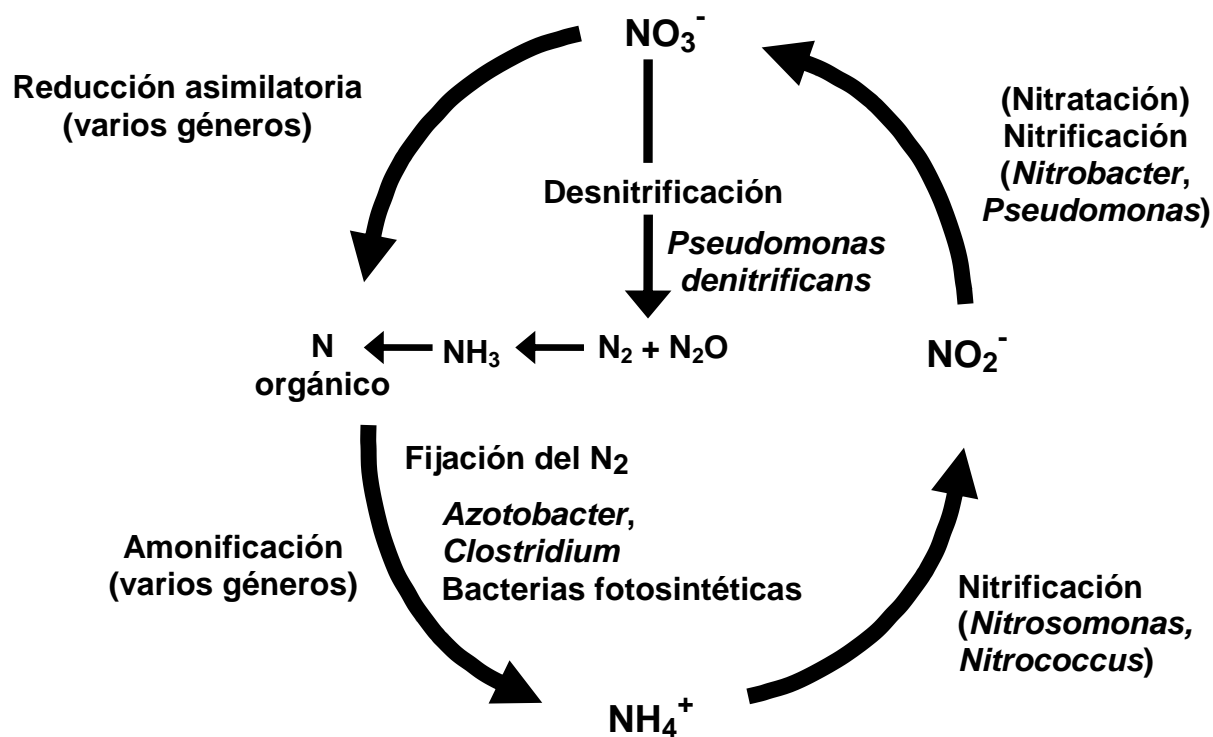
## 2 EL NITRÓGENO EN LA NATURALEZA Y EN LAS ACTIVIDADES HUMANAS

### 2.1 Formas del nitrógeno en la naturaleza

**2.1.1 Ciclo del nitrógeno.** El nitrógeno es esencial para la vida en la tierra, es un componente de las proteínas y ácidos nucleicos. Aún cuando como nitrógeno molecular su reserva en la atmósfera es abundante (78%) esta forma no es utilizada por la mayoría de los microorganismos. Sólo a través de una serie de transformaciones microbianas llega a ser disponible para las plantas, las que a su vez son sustento de toda vida animal. Las etapas que interviene en la transformación del nitrógeno se clasifican como sigue: Fijación de nitrógeno, asimilación, amonificación, nitrificación y desnitrificación (Figura 2.1).

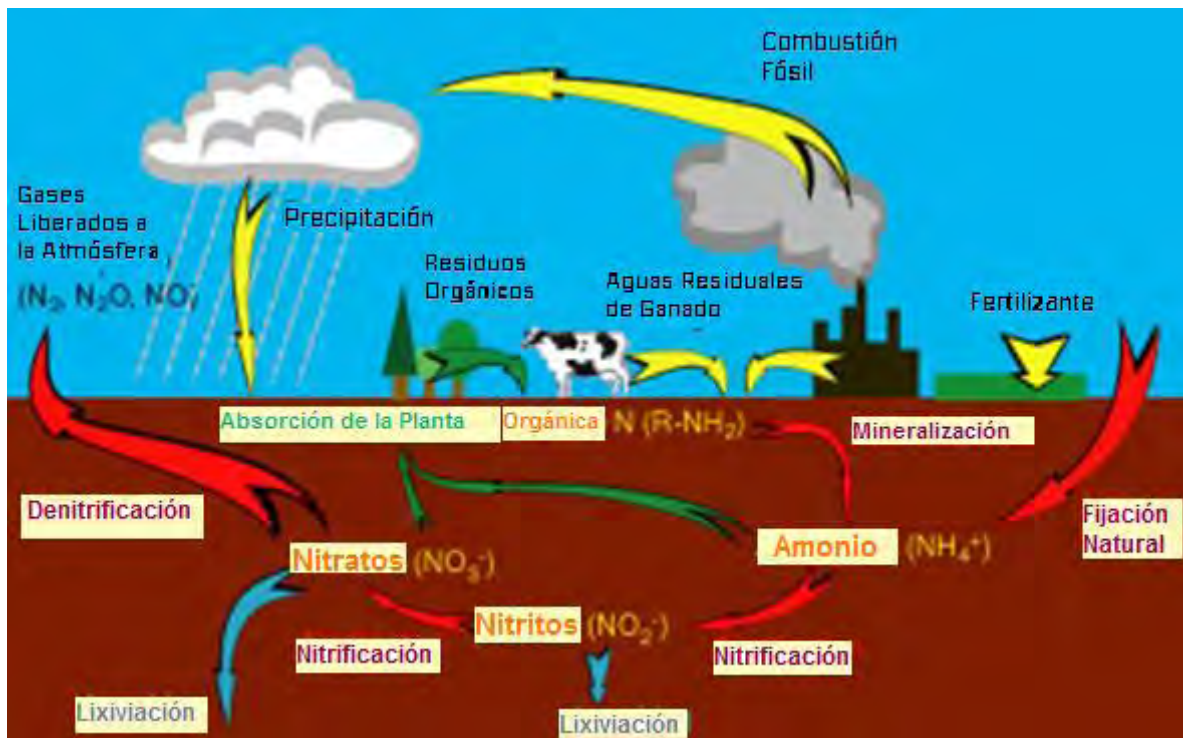
En la etapa de la fijación del  $N_{\text{atmosférico}}$ , una mayor proporción (90%) del nitrógeno molecular es convertida a compuestos de nitrógeno inorgánico principalmente por ciertas bacterias y algas. El 10% de nitrógeno libre es fijado por mecanismos abióticos como la radiación ultravioleta y la luz solar.

El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) resultantes de la fijación del  $\text{N}_2$ , son asimilados como componentes específicos en los tejidos de las algas y plantas mayores. Los animales que ingieren estas plantas los incorporan como componentes de su propio cuerpo. Los desechos de los animales, o bien, cuando éstos llegan a morir, entran en descomposición en presencia de ciertos microorganismos conduciendo así el proceso de amonificación para producir  $\text{NH}_4^+$ . Dependiendo de las condiciones del suelo, el  $\text{NH}_4^+$  es liberado al suelo o convertido a otros compuestos de nitrógeno.



**Figura 2.1** Principales etapas del ciclo del nitrógeno y algunos microorganismos asociados (Madigan *et al.*, 1998).

En la nitrificación, el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> del suelo es transformado a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que es incorporado por las plantas a sus tejidos. El NO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede ser metabolizado por bacterias desnitrificantes las cuales son especialmente activas en condiciones anaerobias. En el suelo la acción de estas bacterias tiende a disminuir el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> formando N<sub>2</sub> el cual es liberado a la atmósfera (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Ciclo del nitrógeno. Las flechas amarillas indican las fuentes humanas de nitrógeno para el ambiente. Las flechas rojas indican las transformaciones microbianas del nitrógeno. Las flechas azules indican las fuerzas físicas que actúan sobre el nitrógeno y las flechas verdes indican los procesos naturales y no microbianos que afectan la forma y el destino del nitrógeno. (Harrison, 2003).

**2.1.2 Nitrógeno como ión amonio ( $NH_4^+$ ).** El nitrógeno, como ión, es el contaminante que se encuentra con mayor frecuencia, ya que además de ser un producto natural de descomposición, es un producto industrial muy importante. Su olor es desagradable, y a concentraciones en el aire arriba de 0.5 mg/L causa irritación de los conductos respiratorios del hombre. Otro problema que produce, es que ejerce una alta demanda de oxígeno en las corrientes de agua pues se requieren 4.57 mg de oxígeno para oxidar cada gramo de  $N-NH_4^+$  (Barnes y Bliss, 1983).

**2.1.3 Nitrógeno como amoniaco ( $NH_3$ ).** En solución acuosa, el amoniaco es tóxico para la fauna acuática. Los peces expuestos a niveles de amoniaco de 1 mg/L se pueden asfixiar como resultado de una significativa reducción de la capacidad de combinación con el oxígeno en la sangre. Se ha observado que son letales a concentraciones de 3 mg/L para percas, gobidos y truchas arcoiris durante un período de 2 a 20 horas, y de 2.5 mg/L para peces dorados, durante un período de 24 a 96 horas. Por otra parte, el amoniaco reduce la efectividad de la cloración, la cual se usa como una etapa final del tratamiento de agua residual para eliminar trazas de materia orgánica, incluyendo microorganismos (WPCF, 1983). Este aspecto se trata más adelante.

---

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

**2.1.4 Nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).** El nitrato estimula la eutroficación (proceso natural de los lagos por enriquecimiento de nutrientes). Sin embargo, este proceso se ha visto acelerado por aquellos cuerpos de agua en donde hay aporte continuo, y en altas concentraciones, de nutrientes como nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ ) y el fósforo ( $\text{PO}_4^-$ ). Para llegar al estado de lagos eutróficos es necesario pasar por varias etapas, una llamada oligotrófica, la cual se caracteriza por tener una productividad baja como consecuencia de la poca carga de nutrientes. Posteriormente, pasan por un estado mesotrófico, en donde hay una productividad abundante debido a la alta concentración de nutrientes. En el estado eutrófico, debido al gran aporte de nutrientes, aparece un crecimiento excesivo de algas conocido como florecimiento algal. Esto como consecuencia de que durante la noche, las algas utilicen el oxígeno para obtener energía a partir de la ruptura oxidativa de compuestos sintetizados previamente (Margalef, 1989). Estas fluctuaciones de oxígeno disuelto son perjudiciales para las diversas formas de vida en el lago, en especial para los peces. Con el tiempo se mueren y se depositan en el fondo del lago, en donde se descomponen, liberando nitrógeno, restándole profundidad a los cuerpos de agua y dando lugar, en el largo plazo, a la ciénaga o pantano (Mitchell, 1974; WPCF, 1983).

**2.1.5 Nitrógeno en forma de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).** En adultos sanos, los nitritos y nitratos son absorbidos rápidamente por el sistema gastrointestinal y excretados por el riñón. Sin embargo, en el sistema digestivo de los infantes el pH es alcalino debido a que no se ha desarrollado ácido clorhídrico en sus jugos gástricos. Estas condiciones alcalinas permiten que se desarrollen bacterias nitroreductoras que reducen los nitratos a nitritos antes de que los primeros puedan ser absorbidos. Los nitritos formados provocan la enfermedad llamada metahemoglobinemia, pues son reoxidados a nitrato utilizando el hierro de la hemoglobina como agente oxidante. De este modo la hemoglobina que transporta el oxígeno de la sangre es sustituida por metahemoglobina que adquiere una coloración café y es incapaz de transportar oxígeno, lo que provoca la asfixia en lactantes. (Moran, 1988).

Los niños que son alimentados a pecho probablemente reciban nitritos o nitratos de la leche materna, pero el envenenamiento usualmente ocurre cuando el biberón u otros alimentos se preparan con agua contaminada. La metahemoglobinemia también se conoce como cianosis infantil o “síndrome del bebé azul” debido a que la piel adquiere una coloración azulada producto de la cianosis (Moran, 1988).

En los adultos esta metahemoglobinemia se convierte en oxihemoglobina por la acción de los sistemas reductores como la NADH metahemoglobina reductasa. Por otra parte, al utilizar agua con nitratos, se corre el riesgo de que se formen sustancias carcinogénicas denominadas nitrosaminas, a través de la combinación con compuestos de nitrógeno que se forman a su vez por la descomposición de las proteínas presentes en alimentos (Monreal, 1980; Moran, 1988).



## 2.2 Métodos para la remoción del nitrógeno de aguas residuales

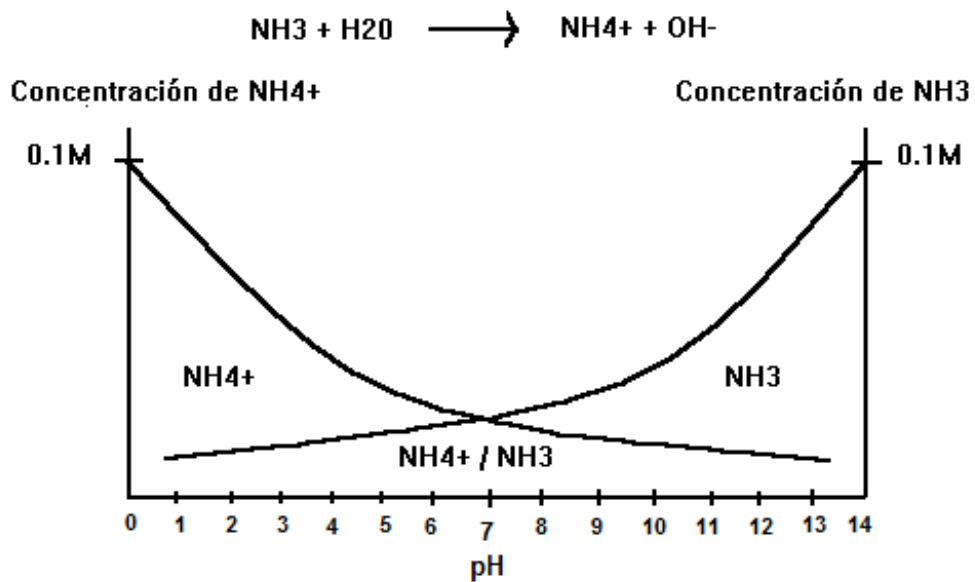
Cinco métodos se aplican a gran escala para la remoción del nitrógeno: la desorción del amoníaco por lavado con una corriente de aire (stripping), el intercambio iónico, ósmosis inversa, cloración hasta el punto de ruptura y desnitrificación biológica.

**2.2.1 Desorción o stripping de amoníaco.** Es un proceso de transferencia de masa, que consiste en alcalinizar el agua residual para aumentar el pH y así convertir el amonio a amoníaco. El efluente con amoníaco se pasa a través de una torre desorbedora, empacada o de platos, en la que el amoníaco es transferido a una corriente de aire que fluye a contracorriente del agua. El amoníaco puede recuperarse en otra columna desorbedora por medio de una disolución ácida (Winkler, 1986). Este proceso presenta algunos problemas, como la formación de incrustaciones de carbonato de calcio dentro de la torre y conductos de alimentación, así como bajo rendimiento al operar a bajas temperaturas (Metcalf y Eddy, 2003).

Para entender el equilibrio químico del  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ , se presenta su solubilidad en agua fría y caliente, en la Tabla 2.2 sus valores de  $\text{pK}_b$  y  $\text{K}_b$  y en la Figura 2.3 su solubilidad a distintos potenciales de hidrógeno (pH's). La solubilidad se da en partes en peso por 100 partes en peso del disolvente; el pequeño índice superior indica la temperatura. En agua equivale a mg/L.

**Tabla 2.1** Solubilidad del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ); Perry y Chilton (1982), Watty (1982) y Fogg y Gerard (1991)

Solubilidad del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) en 100 partes				
Agua fría	Agua caliente	Otros reactivos	$\text{pK}_b$ a 25°C	$\text{K}_b$
89.9 <sup>0°C</sup>	7.4 <sup>96°C</sup>	14.8 a 20°C alcohol etílico al 95%. Soluble en éter etílico	4.78	$1.8 \times 10^{-5}$



**Figura 2.3** Solubilidad del Amoníaco a distintos potenciales de hidrógeno (pH's); Watty (1982)

**2.2.2 Intercambio iónico.** Es un proceso por el cual los iones de una especie dada son desplazados de un material de intercambio insoluble por iones de diferentes especies en solución. Este puede ser operado en lote o continuo. En el proceso por lote, la resina intercambiadora simplemente se agita con agua por tratar en un reactor hasta que la reacción se completa. La resina gastada es removida por sedimentación y posteriormente es regenerada y reusada. En un proceso continuo el material de intercambio es colocado en un lecho o en una columna empacada y el agua a ser tratada se pasa a través de éste.

La operación está limitada por dos problemas. El primero es que no existe una resina de alta selectividad para nitratos sobre iones que están comúnmente presentes en aguas. El segundo problema involucra el disponer de un regenerante para la resina. Se ha observado que la zeolita natural (clinoptilolita), es suficientemente selectiva para la remoción de iones amonio; una vez que la zeolita se agota, es regenerada con una disolución de cloruro de sodio. Los costos principales de este método se deben a que la regeneración del material de intercambio y la solución regenerativa necesitan un tratamiento adicional posterior para remover los iones amonio recuperados (Winkler, 1986).

**2.2.3 Cloración hasta el punto de ruptura.** El proceso se conoce como la cloración hasta el "punto de ruptura", debido a que según aumenta la adición de cloro, las cloraminas formadas a baja concentración de cloro se descomponen, y se llega finalmente a un "punto de ruptura" donde el amoníaco se oxida

prácticamente en su totalidad. Cualquier cloro adicional estará entonces disponible como cloro “libre” (Figura 2.4). A pesar de que este proceso resulta útil para la remoción de trazas de sustancias nitrogenadas y microorganismos residuales como un tratamiento final, la gran proporción de cloro a nitrógeno requerida, de 7.6 a 1, implica un costo excesivo para la remoción de altas concentraciones de nitrógeno. Además, las altas dosis de cloro tienden a producir trihalometanos y otros compuestos organoclorados que han sido identificadas como carcinógenos. En este proceso se añaden iones cloruro al agua y según la cantidad de cloro involucrado, puede darse una reducción del pH y la corrección del mismo aumentará aún más el contenido de sales disueltas (Winkler, 1986).

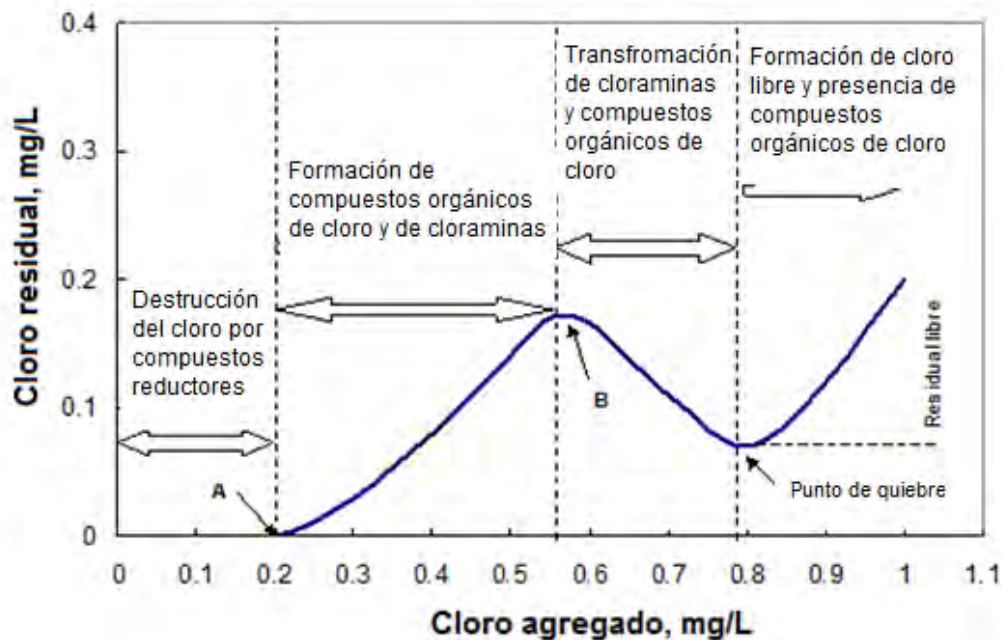


Figura 2.4 Curva obtenida en la cloración a punto de quiebre (Metcalf and Eddy, 2003)

**2.2.4 Ósmosis inversa.** En el proceso de ósmosis inversa se remueve del 90 al 95% de todos los minerales disueltos en el agua, del 95 al 97% de casi todos los compuestos orgánicos disueltos y el 100% de la materia coloidal. Este es un proceso en el que el agua se separa de las sales disueltas mediante su filtración a través de una membrana semipermeable, a una presión mayor que la osmótica causada por las sales disueltas en el agua residual. Los componentes básicos de una unidad de ósmosis inversa son la membrana, la estructura de soporte para la misma, un tanque y una bomba de alta presión. El acetato de celulosa y el nylon han sido utilizados como materiales para la membrana. Sus limitaciones fundamentales son su elevado costo tanto de inversión como de operación y una aún escasa experiencia en el tratamiento de aguas residuales domésticas (Metcalf y Eddy, 2003).

**2.2.5 Normatividad Mexicana. Límites máximos permisibles para contaminantes básicos (nitrógeno total).** La NOM-001-SEMARNAT-1996 establece los siguientes límites máximos permisibles para contaminantes básicos en el caso de Nitrógeno total (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2** Límites máximos permisibles para nitrógeno total (NOM-001-SEMARNAT-1996)

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA CONTAMINANTES BÁSICOS																				
PARAMETRO	RÍOS						EMBALSES NATURALES Y ARTIFICIALES				AGUAS COSTERAS				SUELO					
	Uso en riego agrícola (A)		Uso público urbano (B)		Protección de vida acuática (C)		Uso en riego agrícola (B)		Uso público urbano (C)		Explotación pesquera, navegación y otros usos (A)		Recreación (B)		ESTUARIOS (B)		Uso en riego agrícola (A)		HUMEDALES NATURALES (B)	
Miligramos por litro	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.
Nitrógeno Total	40	60	40	60	15	25	40	60	15	25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	15	25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

P.D. = Promedio Diario; P.M. = Promedio Mensual.

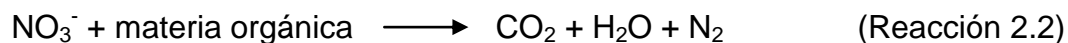
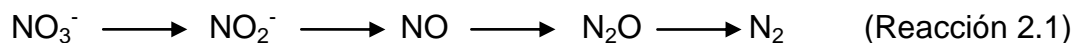
N.A. = No es aplicable

(A), (B) y (C): Tipo de Cuerpo receptor según la Ley Federal de los Derechos. (Son las corrientes, depósitos naturales de agua, causes, zonas marinas o bienes nacionales donde se descargan aguas residuales, así como los terrenos donde se filtran o inyectan dichas aguas cuando pueden contaminar los suelos o los acuíferos).

El nitrógeno total es la suma del nitrógeno orgánico en sus diversas formas (proteínas y ácidos nucleicos en diferentes estados de degradación, urea, aminos etc.) el ión amonio  $\text{NH}_4^+$  (nitrógeno amoniacal) y los nitritos y nitratos.

**2.2.6 Desnitrificación biológica.** La eliminación del nitrógeno amoniacal se lleva a cabo en dos etapas; la nitrificación que es un proceso aerobio en el cual microorganismos autótrofos transforman el amonio en nitritos y/o nitratos y la segunda conocida como desnitrificación (proceso anóxico) en el cual microorganismos heterótrofos reducen el nitrato y nitrito a nitrógeno molecular que es un gas no contaminante (Knowles, 1982).

El proceso biológico de desnitrificación implica la reducción del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a óxidos nitrogenados. El principal producto es el  $\text{N}_2$  pero puede formarse óxido nítrico (NO) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Ec. 2.1 y 2.2). La desnitrificación ocurre en condiciones anóxicas, en donde la materia orgánica es oxidada, utilizando nitrato como aceptor de electrones y liberando  $\text{N}_2$ .



En el proceso de la respiración anóxica, como la desnitrificación, la oxidación de compuestos orgánicos implica un mecanismo de oxidación-reducción en donde como parte final de la cadena de transporte de electrones se tiene como aceptor de

---

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

éstos un compuesto inorgánico diferente al  $O_2$ . El aceptor más favorable para las condiciones mencionadas es el  $NO_3^-$ , pero puede también ser utilizado  $CO_2$  o formas oxidadas de azufre ( $S^0$ ,  $SO_4^{2-}$ ) (Halling y Jörgensen, 1993).

El mecanismo de reducción puede tomar dos vías:

- 1) Reducción asimilatoria, en donde el compuesto se reduce para ser usado como elemento nutricional para la célula y satisfacer los requerimientos de C, N ó S.
- 2) Reducción desasimilatoria, el compuesto se reduce como parte del metabolismo energético para la producción de energía. El producto reducido ( $N_2O$ ,  $N_2$ ,  $H_2S$ ) es normalmente liberado como gas.

En los procesos de respiración anaerobia los compuestos oxidados de nitrógeno son muy comunes como aceptores de electrones. En otra sección se darán más detalles.

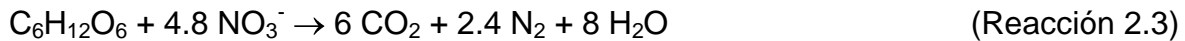
Los procesos biológicos ofrecen alternativas potenciales a los relativamente costosos y, algunas veces, ineficientes procesos ya mencionados de tratamiento fisicoquímicos para la eliminación de especies nitrogenadas.

En el campo de la potabilización, la experiencia práctica en Europa con sistemas de tratamiento para remoción de nitrógeno por actividad biológica ha sido favorable y con costos efectivos. Este método ha sido usado por años en el tratamiento de aguas, ya que es altamente selectivo para remover nitrato y la eficiencia del proceso es muy alta. Tiene el inconveniente de requerir una fuente de carbono orgánico (sustrato) para que se lleve a cabo (Matêju *et al.*, 1992). En los Estados Unidos el tratamiento biológico es raramente utilizado en las plantas de tratamiento para agua de consumo humano, ya que en esas instalaciones se inhibe el desarrollo de la actividad biológica mediante la precloración, una rigurosa limpieza del medio filtrante y retrolavado frecuente del carbón activado granular. Con relación a la aplicación en aguas residuales, los procesos biológicos para el tratamiento de desechos orgánicos se remonta al siglo XIX. Sin embargo, no es sino hasta mediados del siglo pasado que las bases teóricas comenzaron a ser planteadas. De acuerdo al aceptor final de electrones involucrado en la vía metabólica, se tienen dos tipos de sistemas biológicos para el tratamiento de aguas residuales: aerobios y anaerobios. En los procesos aerobios el oxígeno es el aceptor final de electrones; en los procesos anaerobios, debido a que ocurren en ausencia de oxígeno, los compuestos oxidados como nitratos, sulfatos o bióxido de carbono actúan como aceptores finales de electrones. En ausencia de oxígeno molecular disuelto se tiene tres vías de degradación, que se presentan en las siguientes reacciones globales:

---

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

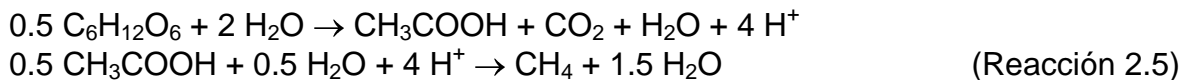
Desnitrificación (medio anóxico)



Sulfatorreducción



Metanogénesis



En ausencia de oxígeno disuelto, la presencia de nitratos o sulfatos en el agua residual a tratar y las condiciones de operación de los bio-reactores son los principales factores que determinan la ruta a seguir durante la degradación de la materia orgánica.

## 2.3 Remoción biológica del nitrógeno

**2.3.1 Desnitrificación Heterótrofa.** La desnitrificación heterótrofa es el proceso biológico comercialmente más usado y más estudiado para la eliminación de nitrógeno de las aguas subterráneas destinadas a consumo humano. En este proceso se usa una fuente orgánica de carbono como donador de electrones y de energía para el crecimiento biológico. Entre estas fuentes, el etanol es el más usado, luego el metanol y por último el ácido acético (Akunna *et al.*, 1993; Jiménez, 1986 y Matêju *et al.*, 1992). El metano, como se verá más adelante, ha sido poco estudiado como posible fuente de carbono para aguas residuales.

La principal ventaja de la desnitrificación biológica es que el nitrato es eliminado mediante su conversión de nitrógeno a gas y no se producen desechos, excepto por pequeños volúmenes de biomasa (al contrario de lo que ocurre en los procesos físico-químicos). Además, la velocidad de reacción en estos procesos es mucho mayor que en los autótrofos. Sin embargo, los procesos biológicos requieren un mayor control y son más sensibles a bajas temperaturas que los fisicoquímicos.

**2.3.2 Desnitrificación Autótrofa.** Se refiere a la reducción de los óxidos de nitrógeno por bacterias autótrofas usando productos inorgánicos como hidrógeno, sulfuro o derivados reducidos de azufre como fuente de energía y como donador de electrones. Entre las ventajas que presenta la desnitrificación autótrofa está el que el proceso no requiere de la adición de un donador de electrones orgánico, lo cual reduce los problemas asociados con los compuestos orgánicos disueltos en el efluente. Al producirse menor cantidad de biomasa, se reduce el tratamiento de los lodos. Las desventajas son: a) el proceso es mucho más lento que los procesos heterótrofos, b) en caso de que el compuesto añadido sea un sulfuro pueden existir problemas de corrosión y c) el contenido resultante de sulfato a veces excede el límite de calidad en el agua potable. Cuando el compuesto que se añade es hidrógeno, el proceso de remoción del contaminante es más lento (Halling and, Jörgensen, 1993).

**2.3.3 Bacterias que intervienen en el proceso de nitrificación.** Las bacterias nitrificantes pertenecen a los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, que se caracterizan por ser aerobias obligadas, Gram negativas y no forman esporas. Son autótrofas aunque existen microorganismos heterótrofos de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nocardia* y *Streptomyces* que son capaces de efectuar la nitrificación (Winkler, 1986).

La oxidación del amonio a nitritos es realizada por bacterias del género *Nitrosomonas* y la especie aislada con mayor frecuencia de los sistemas de tratamiento de aguas es *Nitrosomonas europaea* (Barnes y Bliss, 1983; Winkler, 1986).

La oxidación de nitrito a nitrato se efectúa por bacterias del género *Nitrobacter* y la especie identificada en los sistemas de tratamiento de aguas residuales es *Nitrobacter agilis* (Barnes and Bliss, 1983).

**2.3.4 Bacterias que intervienen en el proceso de desnitrificación.** Las bacterias desnitrificantes son heterótrofas en su mayoría con algunas especies autótrofas y realizan la reducción de nitratos por desasimilación. Una gran variedad de bacterias anaerobias facultativas, entre las que se incluyen *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Spirillum*, *Staphylococcus* y *Vibrio* reducen los nitratos bajo condiciones anaerobias a nitritos. Además, bajo condiciones apropiadas, algunos de estos géneros reducen nitritos vía hidroxilamina a amonio (nitrato amonificación). Estos organismos no producen compuestos nitrogenados gaseosos, es decir, no desnitrifican, si no que producen amonio, lo cual es contraproducente para fines de tratamiento de aguas (Knowles, 1982).

Las bacterias nitrato reductoras desnitrificantes tales como *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*, y varios géneros de *Pseudomonas* (aún cuando son aerobios estrictos en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones) tienen una ruta de reducción más completa, en la que

---

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

convierten nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) a través de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). En el suelo los principales géneros desnitrificantes son *Pseudomonas* y *Alcaligenes*; otros géneros adicionales, tales como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas* y *Propionibacterium* (Knowles, 1982; Winkler, 1986) han sido reportados.

**2.3.5 Factores que afectan el proceso de desnitrificación.** Se ha observado que la tasa de desnitrificación depende de la temperatura (temperatura óptima  $30^\circ\text{C}$ ), pH (7-9), concentración de nitratos ( $35 \text{ mg/L N-NO}_3^-$ ), oxígeno disuelto ( $\leq 1 \text{ mg/L}$ ), tipo de compuesto utilizado como fuente de carbono (fuente de energía y donador de electrones) y de los microorganismos participantes (Henze y Harremoes 1977, Knowles, 1982; Grabinska-Loniewska *et al.*, 1985; Jiménez, 1986, Henze, 1991 y Hiscock *et al.*, 1991).

La fuente de carbono utilizada con frecuencia es el metanol, ya que se obtienen altas tasas de desnitrificación (Rhee and Fuhs, 1978 y Henze, 1991); también pueden ser utilizados como donadores de electrones glucosa, glicerol, ácido acético y ácido láctico (Akunna *et al.*, 1993). Sin embargo, como el metanol es un compuesto relativamente caro y tóxico (de 20 a 100 mL) para el ser humano si se le compara con las fuentes de carbono mencionadas anteriormente, en el presente trabajo se propone utilizar metano, el cual puede obtenerse de plantas de tratamiento anaerobias. Esto implicaría poder desnitrificar aguas con nitritos y/o nitratos sin gasto adicional por el uso de otras fuentes donadoras de electrones.



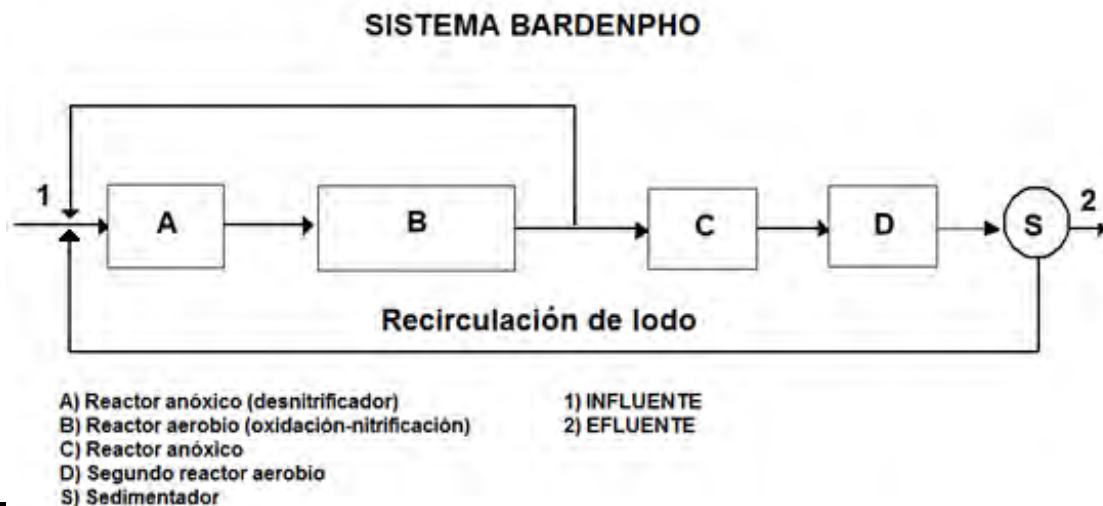
### 3 USO DE METANO COMO SUSTRATO PARA LA DESNITRIFICACIÓN: ESTADO DEL ARTE

La eliminación de nitrógeno del agua es compleja debido a la alta solubilidad de todas las formas de nitrógeno ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). Por ello se han diseñado numerosas configuraciones para su remoción biológica; en todas se incluyen alternativas con zonas de tratamiento anaerobias, anóxicas y aerobias.

Los procesos convencionales para la recuperación de nitrógeno se basan en dos procesos biológicos: la nitrificación y la desnitrificación. Inicialmente estos se realizaban en tanques separados debido a las diferentes condiciones ambientales necesarias para cada uno de estos procesos.

Dentro de las configuraciones que se proponen para la remoción de nitrógeno, destacan el sistema BARDENPHO, ANANOX, Anaerobio-Aerobio ( $\text{A}^2/\text{O}$ ), DNS, ANAMMOX, SHARON, SURAMOX y AAA (Triple A), los cuales se describen a continuación.

3.1 Sistema BARDENPHO (BARnard DENitrification PHOsphorus). El sistema típico de estas configuraciones es el de cuatro etapas llamado BARDENPHO (Figura 3.1). Este tipo de sistemas utiliza el carbono del agua residual así como el carbono endógeno procedente de la lisis celular de los microorganismos presentes en el medio para llevar a cabo la desnitrificación. Se compone de reactores con biomasa suspendida y un sedimentador. El sistema puede remover fósforo mediante purga del lodo del sedimentador.

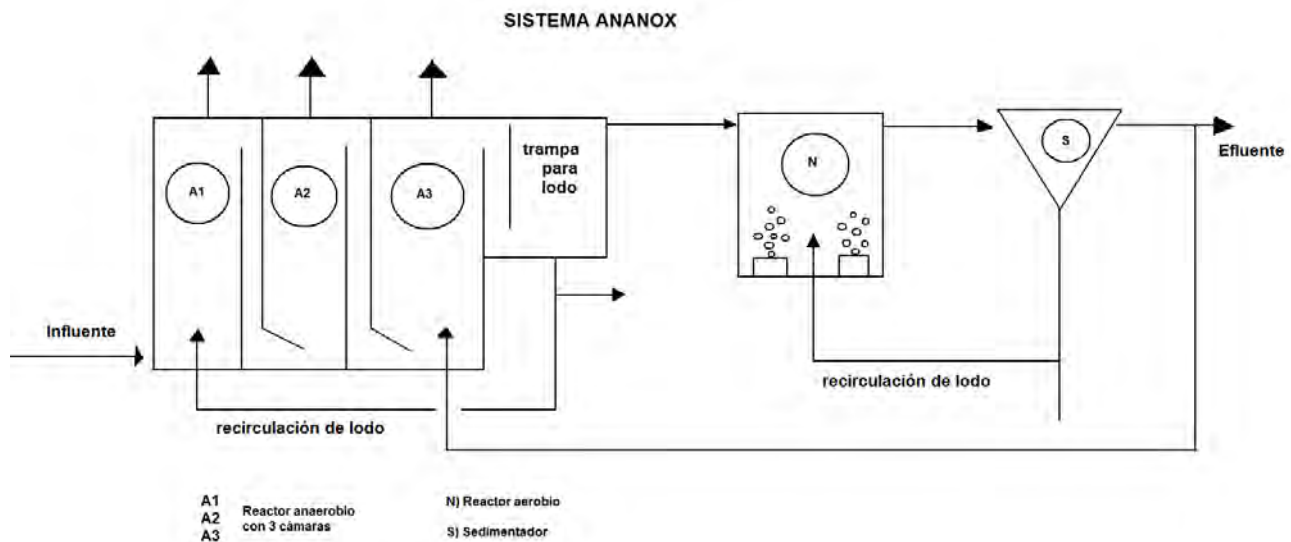


**Figura 3.1** Sistema BARDENPHO para la remoción de nitrógeno (Metcalf y Eddy, 1985).

El agua residual a tratar entra en la zona anóxica (en ausencia de oxígeno), en la cual se realiza la desnitrificación. En esta etapa, la tasa de desnitrificación es muy rápida debido a que se utiliza como fuente de carbono y energía el carbono presente en el agua residual. En la siguiente zona (aerobia) el amonio es nitrificado y el licor mezclado se recircula a la primer zona anóxica. Posteriormente, el agua pasa por una segunda zona anóxica, en la cual se realiza una desnitrificación adicional. En este caso es una reacción lenta debido a que se utiliza una fuente de carbono endógena (Metcalf y Eddy, 2003).

Previo al sedimentador, se encuentra una segunda zona aerobia que permite la liberación del gas nitrógeno formado durante la desnitrificación y una mejor estabilización del lodo. En esta zona se nitrifica el amonio liberado de los lodos de la segunda zona anóxica (Horan, 1991, Sedlak, 1991).

**3.2 Sistema ANANOX (ANaerobic–ANoxi–OXic).** Este sistema consta de un reactor anaerobio con tres cámaras de flujo ascendente, en el que se realiza la fase anaerobia y anóxica. (Figura 3.2). La tercera cámara esta empacada con material de poliuretano para aumentar la retención de los sólidos biológicos bajo condiciones de altas tasas de flujo.



**Figura 3.2** Sistema ANANOX para la remoción de nitrógeno (Metcalf y Eddy, 1985).

Posteriormente, se tienen un tanque de oxidación, en el que se realiza la nitrificación y un clarificador. El efluente clarificado es parcialmente recirculado a la zona anóxica para su desnitrificación, mientras el lodo almacenado es recirculado al tanque aerobio (Garuti *et al.*, 1991).

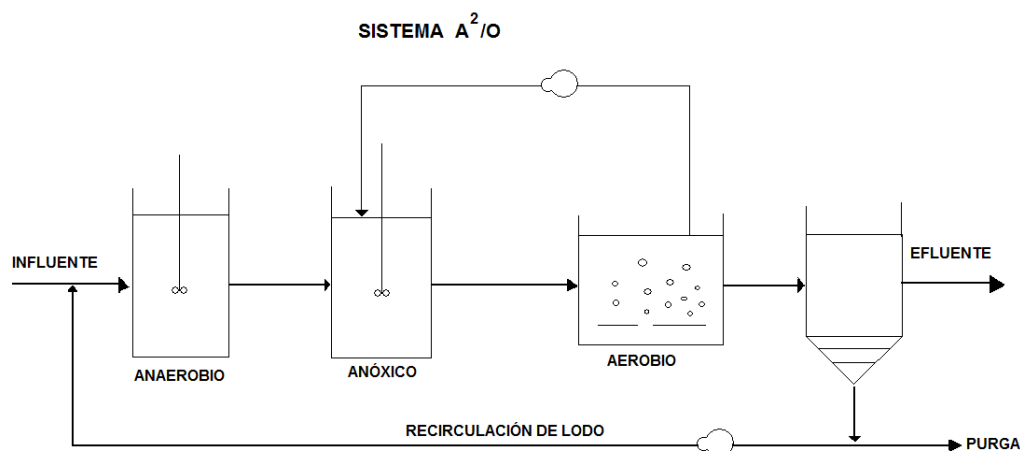
---

**Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía**

El proceso se ha utilizado en el tratamiento de aguas residuales y ha demostrado una eficiencia del 90% de remoción para la DQO y los SST, 92% de remoción para nitrógeno en forma amoniacal, 63% de remoción en forma de nitrato y una producción de lodos de 0.2 Kg SST/Kg DQO removida. Este último valor es aproximadamente 50% menor si se compara con el proceso tradicional de nitrificación-desnitrificación (Garuti *et al.*, 1991).

**3.3 Sistema A<sup>2</sup>/O (Anaerobic-Aerobic-Oxic).** El sistema A<sup>2</sup>/O está constituido por tres zonas, una anaerobia seguida de una anóxica y al final una aerobia (Figura 3.3). En la primera zona, se lleva a cabo la remoción de la mayor parte de la materia orgánica y el influente es mezclado por medio de una recirculación, con el lodo activado que se obtiene al final del proceso.

En el segundo reactor (anóxico), se recircula el licor mezclado de la zona aerobia, de modo que las bacterias desnitrificantes realicen la reducción de nitratos hasta nitrógeno molecular. En este caso se utiliza la DBO remanente del influente como fuente de carbono. En la tercera zona, que es la aerobia, se oxida el nitrógeno amoniacal a nitrato (nitrificación) y hay remoción de fósforo el cual se elimina en los lodos de purga.



**Figura 3.3** Sistema A<sup>2</sup>/O para la remoción de nitrógeno (Metcalf y Eddy, 1985).

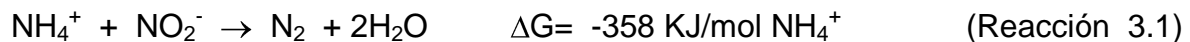
La característica destacable del sistema A<sup>2</sup>/O es su alta tasa de operación. Este sistema comparado con el sistema BARDENPHO modificado, tiene un tiempo de retención de sólidos relativamente corto y una alta tasa de carga orgánica, de tal manera que se obtiene un incremento en la producción de lodo y por lo tanto una tasa de remoción de fósforo relativamente alta. Con este sistema se puede remover del 40 al 70 % de nitrógeno (Horan, 1991; Sedlak, 1991).

3.4 DNS (Simultaneous Nitrification-Denitrification). Estudios recientes han demostrado la posibilidad de que ocurra de manera simultánea la nitrificación-desnitrificación (SND). Este proceso requiere de pequeñas instalaciones y bajo consumo de oxígeno en comparación con los procesos convencionales lo que representa una ventaja en cuanto a costo de la instalación. La SND puede ser explicada considerando la naturaleza del fenómeno físico o bioquímico que la causa. Para algunos autores esto ocurre como consecuencia de la existencia de gradientes de concentración de oxígeno en los gránulos y en la biopelícula debido a las limitaciones difusionales.

Se sabe que los microorganismos nitrificantes están localizados en las regiones con alta concentración de oxígeno mientras los microorganismos desnitrificantes están localizados en las regiones con baja concentración de oxígeno. Se asume que existen microorganismos hábiles para realizar los dos procesos en condiciones ambientales diferentes a las consideradas ideales ya que esto está en función de la concentración de carbono y oxígeno presentes en el medio.

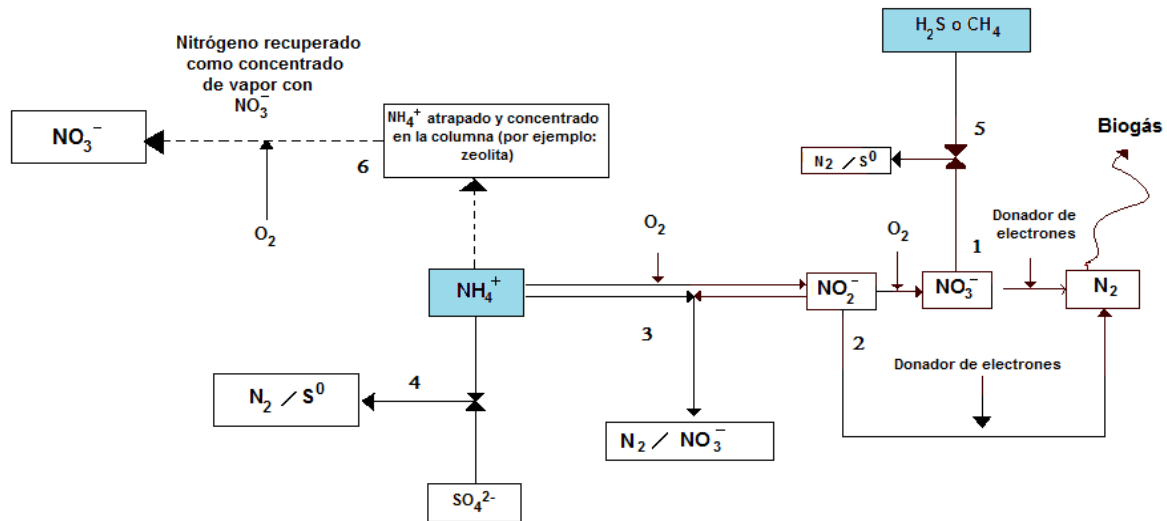
La SND puede ser aplicada en 1) reactores en continuo ya que elimina la necesidad de otro reactor, 2) cuando no se necesita cambiar las condiciones de operación para proporcionar un ambiente favorable para la biomasa por la aplicación de cualquiera de los dos procesos (nitrificación o desnitrificación) y 3) en un reactor SBR (*Sequencing Batch Reactor*, por sus siglas en Inglés) ya que ambos procesos se realizan en un corto tiempo Foresti *et al.* (2006).

3.5 Sistema ANAMMOX (ANAerobic AMMonium OXidation). En este proceso el amoníaco es oxidado a nitrógeno gaseoso usando nitrito como aceptor final de electrones. Es un proceso autótrofo estrictamente anaerobio y en consecuencia, no puede oxidar el amoníaco a nitrato; esto implica que el proceso requiere de una fuente de nitrito para remover el amoníaco del sistema. La reacción total del proceso Anammox (Ec. 3.1) es exotérmica con un  $\Delta G = -358$  kJ/mol  $\text{NH}_4^+$  (Figura 3.4) (Villaverde 2004, Foresti *et al.* 2006).



3.6 Sistema SHARON (Single-reactor High-activity Ammonium Removal Over Nitrite). Este sistema es una alternativa de la nitrificación convencional basado en el hecho de que la nitrificación puede ser detenida cuando los microorganismos que oxidan al nitrito son eliminados del reactor (Figura 3.4). En este caso, el segundo paso (producción de nitrato) no ocurre y el nitrito es reducido a nitrógeno. Este proceso opera a altas temperaturas (30-40°C) y a pH's de 7 a 8 lo que requiere de estrictas condiciones de operación. A estas temperaturas, las bacterias oxidadoras del amoníaco que convierten el amonio a

nitrito crecen más rápidamente que las bacterias oxidantes de nitritos. En consecuencia en un reactor donde el lodo es lavado continuamente del reactor, no hay suficiente tiempo para que el nitrito sea oxidado a nitrato. En una subsecuente fase anaerobia, este es transformado en nitrógeno gaseoso. Este proceso solo tiene aplicación cuando el reactor se opera sin recirculación de lodo (Villaverde, 2004, Foresti *et al.* 2006).



**Figura 3.4** Posibles rutas para remover/recuperar nitrógeno del tratamiento biológico de aguas residuales. Los compuestos en las cajas azules representan efluentes de reactores anaerobios. Las líneas punteadas refieren a procesos donde la recuperación del compuesto de interés es posible. (1) Nitrificación convencional + desnitrificación para la remoción de N. (2) Nitrificación parcial + desnitrificación (por ejemplo SHARON + desnitrificación con metanol). (3) Desnitrificación quimolitotrófica de nitrito con amoníaco como donador de electrones (ANAMMOX). (4) Reducción de sulfato vía oxidación de amoníaco (SURAMOX). (5) Desnitrificación quimolitotrófica con sulfuro o metano. (6) Regeneración de columnas de zeolita para capturar y concentrar amoníaco, seguida por recuperación de N como corriente rica en nitrato Foresti *et al.* (2006).

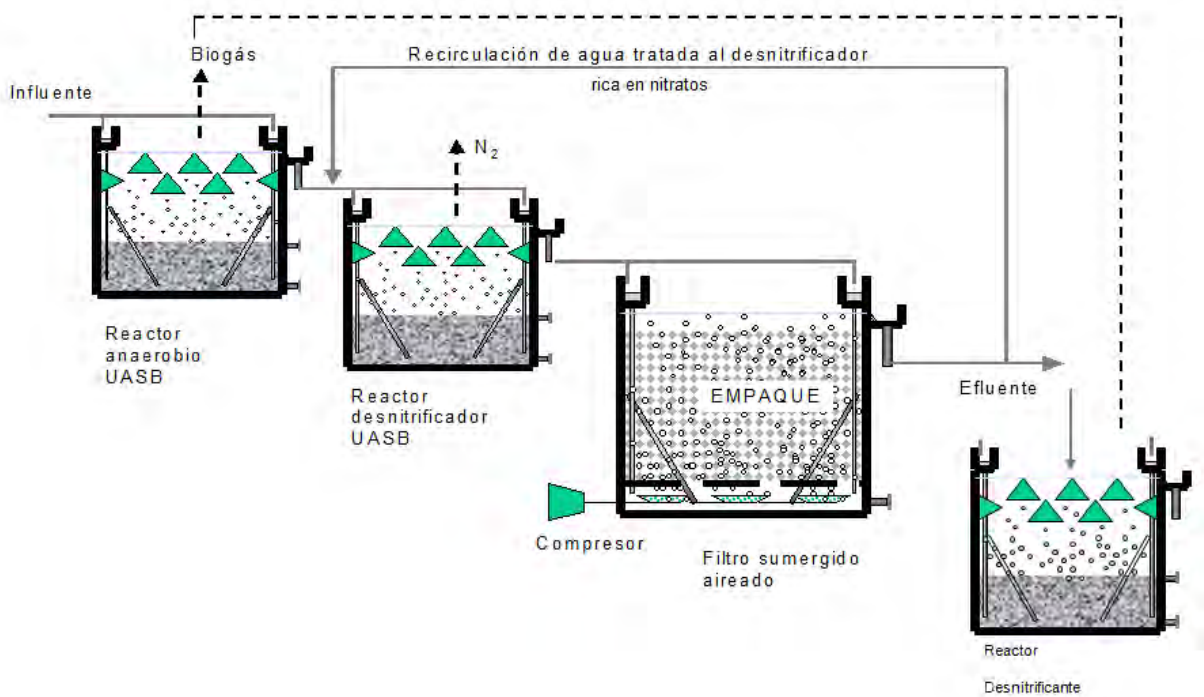
**3.7 Sistema SURAMOX (SULphate Reduction and AMmonium OXidation).** La conversión de compuestos de sulfuro involucra grupos específicos de microorganismos algunos de los cuales son capaces de usar los iones amonio y/o sulfato como aceptor final de electrones. Recientemente en el tratamiento anaerobio de aguas residuales industriales ricas en materia orgánica, nitrógeno y sulfato reportaron la remoción de compuestos de N y S a lo que dieron el nombre de SURAMOX (Figura 3.4). Este proceso no ha sido verificado o reportado en otras investigaciones (Villaverde, 2004).

**3.8 Sistema Anaerobio-Anóxico-Aerobio (AAA).** El sistema AAA es un ejemplo en donde se utiliza el metano como fuente de carbono y energía para remover materia orgánica y nitrógeno de aguas residuales. (Figura 3.5). Este sistema desarrollado en el Instituto de Ingeniería UNAM (Morgan-Sagastume *et al.*, 1994), remueve el nitrógeno de la siguiente manera: El agua residual entra al reactor anaerobio en donde se elimina el 60-80% del contenido de materia

---

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

orgánica y se transforma el nitrógeno orgánico en amoniacal. El agua evacuada se mezcla con la corriente de recirculación proveniente del reactor nitrificador, la cual contiene nitrógeno oxidado en forma de nitratos principalmente. En el segundo reactor, los nitratos son transformados en nitrógeno molecular que es inocuo al medio ambiente y se consume el contenido de materia orgánica biodegradable evacuada por el reactor anaerobio. El nitrógeno amoniacal, que pasa sin cambios a través de este reactor, se oxida a nitratos en el tercer reactor y al ser estos recirculados al reactor desnitrificador se convierten en nitrógeno molecular y así se entrega un agua tratada con un mínimo de compuestos nitrogenados. El proceso soporta cargas orgánicas y es sumamente estable. Los costos de operación y mantenimiento son más bajos que los procesos convencionales empleados para los mismos fines. Si el agua tratada se destina para un reúso estricto, debido a que todavía contiene nitritos y/o nitratos que pueden favorecer la formación de algas, se requiere otro reactor desnitrificador (anóxico) para tratar el efluente proveniente del sistema Triple A e incrementar la eficiencia de remoción del nitrógeno por arriba del 95%. A este segundo reactor desnitrificador hay que adicionarle una fuente externa de sustrato.



**Figura 3.5** Sistema ANAEROBIO-ANOXICO-AEROBIO (AAA) para la remoción de nitrógeno.

Debido a que el arreglo del efluente del triple A ya no contiene materia orgánica, se puede utilizar como fuente de carbono y energía al biogás (metano) producido en el primer reactor (anaerobio). Lo anterior podría aplicarse también a la

---

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

desnitrificación de aguas con carencia de materia orgánica, ya que en este caso se puede obtener metano por fermentación de residuos agrícolas o ganaderos, que hacen atractiva su aplicación desde el punto de vista económico y ambiental.

En este tren, los reactores están físicamente separados y son, en un sentido amplio, de tipo biomasa fija. El sistema consiste en un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente UASB, un reactor anóxico del mismo tipo y un reactor nitrificador (filtro aerobio sumergido) con biomasa fija. Conforme al diseño de un reactor UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) tanto el reactor anaerobio como el anóxico (desnitrificador) tienen en la parte superior un sistema de separación sólido-líquido-gas, lo cual evita el arrastre de sólidos suspendidos por el efluente y favorece la evacuación del biogás formado.

### 3.9 Uso del metano como fuente de energía para la desnitrificación.

A lo largo de poco más de 30 años, se han publicado un número limitado de trabajos sobre el empleo de metano como fuente de carbono y energía. A continuación se resumen todos ellos.

**Davies (1973)** en una columna empacada a escala laboratorio consiguió desnitrificar en un 50% usando metano como fuente de carbono y energía con una población mixta adaptada a desnitrificar con metanol, por lo que concluye que el metano es una buena alternativa para remover el nitratos del agua residual. Sin embargo, **Mason (1977)** discute estos resultados ya que revisando lo realizado por Davies encontró que el medio contenía pequeñas cantidades de otras fuentes de carbono que pudieron servir como donadores de electrones en vez del metano adicionado al medio. Como ejemplo cita el uso etanol (aproximadamente 280 mg/L disponibles para llevar a cabo el proceso de desnitrificación) para solubilizar la vitaminas A y B (compuesto adicionado al medio desnitrificante). Por ello, este autor concluyó que la desnitrificación se llevó a cabo debido a la presencia de otras fuentes carbonadas. Además, argumentó que no hubo manera de probar que el metano presente fue oxidado en esas condiciones de operación para hacerlo disponible a los microorganismos presentes en el sistema.

**Sollo et al. (1976)** llevaron a cabo un estudio de la desnitrificación en una columna de vidrio empacada con arena y metano como fuente de carbono y energía. El metano era alimentado por la parte superior de la columna y el medio lo recircularon con flujo ascendente para promover una mayor transferencia del metano a la fase líquida. La tasa de desnitrificación obtenida fue de 0.70 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h, que es pequeña si se compara con la obtenida con metanol (4.60 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h) de acuerdo con los mismos autores. Se especuló que este valor se debió a una insuficiente concentración de metano en solución, por lo que realizaron otro estudio con adición continua de metano. La tasa de desnitrificación que obtuvieron fue similar a la anterior, con 0.74 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h. Con base a los resultados obtenidos, concluyeron que no es realmente factible utilizar metano

---

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

como fuente de carbono y energía en procesos de tratamiento de aguas con eliminación de nitrógeno.

**Rhee and Fuhs (1978)** experimentaron la desnitrificación en un reactor de lecho fluidizado el cual funcionó adecuadamente cuando se le adicionó metanol como fuente de carbono y energía. Ellos describen sus resultados con la identificación de algunas bacterias que favorecen el proceso de desnitrificación y discuten la posibilidad de sustituir el metanol por metano. Aislaron diversas bacterias reportadas como características de los inóculos anóxicos (principalmente del género de las metanotróficas y *P. stutzeri*). Trabajaron a temperatura de 20° a 22°C y usaron como fuente de nitratos  $\text{KNO}_3$  al 0.2%. La tasa de desnitrificación que obtuvieron usando metano como fuente de carbono fue de 0.24 mg  $\text{N-NO}_3^-$  /L\*h. Concluyeron que la desnitrificación con metano es un proceso atractivo principalmente para agua potable rica en  $\text{NO}_3^-$  la cual es tratada por intercambio iónico y sugieren que también puede ser factible para sustituir los costosos procesos tales como la ósmosis inversa.

**Werner y Kayser (1991)** hicieron un estudio de desnitrificación en presencia de oxígeno y metano como fuente de carbono y energía en tres reactores a escala laboratorio: uno de lodos activados, un filtro percolador y un lecho fluidizado. Observaron tasas de desnitrificación de 2.50, 6.25, y 22.91 mg  $\text{N-NO}_3^-$ /L\*h respectivamente. El medio líquido siempre tuvo una concentración de oxígeno disuelto de 1 mg/L. A diferencia de lo propuesto por Sollo *et al.* (1976), Werner y Kayser concluyeron que el metano sí puede ser utilizado como fuente de carbono y energía, pero con la adición limitada de oxígeno, sugiriendo como etapa intermedia la oxidación del metano a metanol.

**Wisotzky y Bardke (1992)** a escala laboratorio usaron un reactor en forma de columna para experimentar el proceso de desnitrificación. El reactor fue inoculado con un cultivo combinado de *Methylococcus* sp. e *Hyphomicrobium* sp. Las bacterias fueron crecidas previamente en tubos con tapón de silicón donde el medio gaseoso estuvo compuesto por metano y oxígeno. Usaron agua potable con adición de nitrato y fosfato. No encontraron relación entre el consumo de nitrato y la producción de nitrógeno molecular. Tampoco pudieron probar si el nitrato fue consumido asimilatoriamente o desasimilatoriamente y concluyeron que el nitrato fue asimilado por la gran cantidad de biomasa obtenida al final del experimento. No reportan el consumo de nitrato durante la fase experimental.

**Quezada *et al.* (1993)** utilizaron metano como fuente de carbono y energía en pruebas en lote. Se realizaron cinco corridas, probando cuatro temperaturas (13°, 20, 27° y 30°C) y diferentes concentraciones de nitratos (16, 20, 30, 60, 80, 90, 100, 120, 140, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 mg  $\text{N-NO}_3^-$ /L). Se observó que la tasa de desnitrificación aumenta conforme se incrementa la temperatura, por lo que la máxima tasa de desnitrificación se obtuvo a los 30°C. Las tasas de desnitrificación obtenidas fueron de 0.16 a 0.52 mg  $\text{N-NO}_3^-$ /L\*h (4.50 a 14.73 mg  $\text{N-NO}_3^-$ /g SSV\*d como actividad específica), por lo que concluyó que si bien es



posible llevar a cabo la desnitrificación con metano, los rendimientos son sensiblemente más bajos en comparación con otras fuentes de carbono.

**Thalasso et al. (1997)** estudiaron la desnitrificación usando metano como fuente de carbono bajo dos diferentes condiciones: 1) en presencia de oxígeno y 2) bajo estrictas condiciones anóxicas ambas en reactores en lote. Sus resultados muestran que la desnitrificación utilizando metano como fuente de carbono y energía en presencia de oxígeno es posible (25 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*h), pero en condiciones anóxicas la tasa de desnitrificación fue no significativa por lo que sugieren que la desnitrificación con metano es debida a su previa oxidación a otros compuestos carbonados.

**Houbron et al. (1999)** primero trabajaron con un reactor en lote con y sin adición de cobre para mostrar que las bacterias metanotróficas y desnitrificantes están involucradas en el proceso de desnitrificación. El cobre induce modificaciones en la estructura y en el funcionamiento de la metano mono oxigenasa, enzima que cataliza la oxidación de metano a metanol lo que favorece que las bacterias metanotróficas oxiden más metano. Este elemento también participa en la composición de la nitrógeno reductasa involucrada en la desnitrificación (Knowles, 1982). Posteriormente trabajaron con un reactor en lote con la finalidad de remover NO<sub>3</sub><sup>-</sup> adicionando oxígeno en concentraciones menores a 1mg/L y usando metano como fuente de carbono y energía (mezcla CH<sub>4</sub>/aire = 25/75). La velocidad máxima de desnitrificación que obtuvieron fue de 3.30 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h con 80µg/L de cobre. La relación O<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> consumido fue de 1.27. Finalmente en un cultivo continuo probaron la desnitrificación con agua sintética y con agua real en las mismas condiciones que en el reactor en lote con la finalidad de comprobar los resultados obtenidos por Werner y Kayser (1990). La tasa de desnitrificación fue de 6.10 y 9.47 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/gSST\*h con una relación C/N de 3.60 y 4.60 para el agua sintética y el agua real respectivamente. Concluyeron que es posible llevar a cabo la desnitrificación con metano y concentraciones de oxígeno disuelto menores a 1mg/L.

**Rajapakse y Scutt (1999)** investigaron la desnitrificación biológica probando varios tipos de soportes (arena, Etapak, Pall-rings, IP-spacers y carbón activado granular) en un reactor donde adicionaron cultivos (puros) denitrificantes y gas natural (metano) como fuente de energía. En la primera etapa establecieron las condiciones de operación usando una cama de arena alimentando el sistema con metanol para después sustituirlo por gas natural. En la segunda etapa operaron el reactor con gas natural (95% metano) hasta que los microorganismos lo usaran como fuente de carbono y energía. Usando metanol después de 35 días de operación, la velocidad de desnitrificación fue de 133.33 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h. Con metano, la mayor remoción fue de 10.83 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h usando IP-spearcers como soporte trabajando a una temperatura de 14.5 a 24°C en la corrida número 35. Concluyeron que es posible el uso de metano en la desnitrificación biológica manteniendo condiciones anaerobias y aerobias dentro del reactor. Los cultivos microbianos puros se adaptaron fácilmente al uso de metano después de dos

semanas de operación estable del sistema. El mejor soporte probado fue el IP-speacers. Sugieren que el metano sea usado preferentemente en plantas de tratamiento de aguas con concentraciones no mayores a 30 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$  para garantizar buenos resultados en el proceso de desnitrificación biológica.

**Costa et al. (2000)** identificaron bacterias desnitrificantes presentes en su inóculo y estudiaron el efecto de la concentración de oxígeno en el proceso de desnitrificación con metano a una sobrepresión de 0.3 atmósferas (4.41 psi y 112 mg/ $\text{CH}_4$  disuelto a 20° C). Ellos concluyeron que la desnitrificación con metano en condiciones limitadas de oxígeno parece ocurrir por un consorcio de bacterias metanotróficas y desnitrificantes. Consideraron que el acetato producido por las bacterias metanotróficas bajo condiciones limitadas de oxígeno, es el donador de electrones para la desnitrificación. Esto fue demostrado ya que marcaron al metano con  $^{13}\text{C}$ . La formación de acetato fue confirmada por la presencia de estructuras características para grupos carboxilo y metilo en el espectro los cuales fueron comparados con los grupos carboxilo y metilo del acetato marcado también con  $^{13}\text{C}$ . Inducen que el acetato u otro derivado de la vía bioquímica de la serina fue el donador de electrones para la desnitrificación, esto lo atribuyen al gran número de bacterias degradadoras de acetato desnitrificantes encontradas en el reactor. No reportan tasas de remoción ya que el objetivo de este estudio fue analizar una población microbiana usando metano como donador de electrones para la desnitrificación bajo condiciones microaerófilas.

**Eisentraeger et al. (2001)** probaron que el metano puede ser usado *in situ* para llevar a cabo la desnitrificación en agua subterránea a 10°C. Sugieren que la oxidación del metano puede ser realizada en un proceso de dos etapas con bacterias metanotróficas aerobias las cuales usan el metano como fuente de carbono y energía y producen metabolitos que pueden ser usados como donadores de hidrógeno por las bacterias desnitrificantes no metanotróficas en ambientes anaerobios. En este trabajo se llevaron a cabo ensayos en lote con agua subterránea proveniente de la planta piloto de Gelsenwasser AG, Alemania con dos inóculos tomados de la misma planta a diferentes profundidades, los cuales previamente estuvieron en contacto con metano y oxígeno durante algunos meses. Experimentos enriquecidos con bacterias metanotróficas con y sin oxígeno fueron realizados usando el mismo inóculo. Distinguen en lo que llamaron una desnitrificación “directa” (condiciones anóxicas) y una desnitrificación “indirecta” (condiciones aerobias/anóxicas). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la desnitrificación usando el agua subterránea como sustrato puede ser posible debido a que los nitratos presentes en el medio fueron reducidos a nitrógeno molecular a una temperatura de 10°C obteniendo tasas de remoción de 8.95 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}\cdot\text{h}$  y 26.87 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}\cdot\text{h}$  para la desnitrificación “directa” y para la desnitrificación “indirecta” respectivamente.

**Islas-Lima et al. (2004)** investigaron a nivel laboratorio la desnitrificación en condiciones anóxicas con metano como donador de electrones y 35 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$  (relación C/N = 1.8). El inóculo fue lodo producido en un reactor

desnitrificante usando acetato como co-sustrato (velocidad de desnitrificación obtenida: 32.50 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*h) para posteriormente adicionar metano a presiones parciales desde 0.02 a 0.35 atm (0.26 a 5.19 psi). Se necesitaron aproximadamente 20 horas para agotar el sustrato residual. Como parámetros midieron la reducción de nitrato y la producción de nitrógeno. Observaron que la velocidad de desnitrificación fue independiente de la presión parcial de metano cuando esta fue igual o superior a 0.09 atm equivalente a 1.28 psi. La velocidad de desnitrificación observada al comienzo de la fase experimental fue de 10.42 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*h seguida por una disminución que se estabilizó en 0.20 mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*h. Se descartó la remoción de nitrógeno abiótico y otras posibles fuentes de carbono debido a que se corrió un control con ausencia de metano con un inóculo estéril. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el metano puede ser usado como donador de electrones en un proceso de desnitrificación biológica aún cuando las tasas obtenidas fueron muy bajas.

**Gavazza dos Santos et al. (2004)** estimaron las constantes cinéticas para la desnitrificación comparando tres fuentes de carbono: metanol, etanol y metano. La experimentación se realizó en tres reactores en lote de 3 litros inoculados cada uno con 1.5 litros con lodo anaerobio granular procedente del tratamiento de aguas del matadero de aves de corral y un litro de agua sintética con 20 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Los reactores fueron operados durante 4 meses (divididos en dos fases A y B, la primera corresponde a los meses uno y dos y la segunda a los meses tres y cuatro de operación). Los mejores resultados los obtuvieron usando etanol, metanol y metano respectivamente (remoción en 50, 120 y 315 minutos). Obtuvieron dos tasas de remoción para cada sustrato, para etanol 2.23 y 6.63 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h; para metanol fueron de 2 y 1.75 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h; y para metano de 1.50 y 2.37 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h. Encontraron que el paso limitante en todo el proceso usando etanol y metano fue la conversión de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. El metano solo se ajustó al modelo de orden cero, debido principalmente al problema de transferencia de masa que se presenta ya que el metano es poco soluble en agua. Este trabajo apoya la hipótesis de usar metano como fuente de carbono y energía aún cuando la tasa de remoción de nitrato obtenida es baja.

**Khin y Annachhatre (2004)** con un reactor de lecho fluidizado evaluaron la nitrificación y desnitrificación simultánea usando un cultivo de lodos mezclado bajo condiciones limitadas de oxígeno (0.5 a 2 mg/L) con metano como única fuente de carbono y energía a tres velocidades de flujo: 90, 400 y 650 mL/min para metano y tres concentraciones de flujo: 0.5 a 0.9 mL/min, 1.1 a 1.6 mL/min y 1.8 a 2 mL/min de oxígeno. Observaron que en la fase nitrificante no hubo la transformación esperada de nitrógeno amoniacal a nitritos y nitratos pero que el nitrato presente en el influente fue removido significativamente. Los resultados experimentales de remoción de nitratos obtenidos fueron 0.37, 0.49 y 0.67 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*h correspondientes a cada uno de las tres velocidades manejadas. Estos valores que apoyan la hipótesis de que el metano puede ser usado como fuente de carbono y energía en el proceso de desnitrificación biológica. Concluyen además que el oxígeno y la concentración de metano disueltos son los principales

parámetros a controlar para garantizar una eficiente transformación de nitratos a nitrógeno molecular.

**Waki et al. (2005)** afirman que sí es posible la desnitrificación con biomasa suspendida con metano como sustrato, pero en presencia de oxígeno. Diseñaron un reactor dividido en la parte superior, ocupada por la fase gaseosa, con capacidad de 10.5 L (9 L para la fase líquida y 1.5 L para la fase gaseosa). Usaron agua sintética con 200 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$ . El reactor fue inoculado con lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales de ganadería. El lodo fue aclimatado a la desnitrificación con agua sintética que contenía extracto de levadura, durante 1 mes a 20°C burbujeando aire y una mezcla de  $\text{CH}_4\text{-CO}_2$ .

El reactor fue operado en siete etapas durante 54 días (I = 0-11 días; II = 12-19 días; III = 20-25 días; IV = 26-36 días; V = 35-40 días; VI = 41-47 días y VII = 48 a 54 días). Aplicaron dos estrategias: una mezcla de  $\text{CH}_4\text{-CO}_2$  (60-40%) y aire ( $\text{O}_2 = 21\%$ ) y, posteriormente; adicionaron  $\text{CH}_4$  y  $\text{O}_2$  por separado (68-71% de  $\text{CH}_4$  y 0.6 a 0.8% de  $\text{O}_2$ ) para comparar las tasas de desnitrificación. La mayor tasa de desnitrificación obtenida fue de 25 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}^*\text{h}$  equivalente a 0.0072 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{gSSV}^*\text{h}$  y concluyen que es factible usar metano para llevar a cabo el proceso de desnitrificación pero que para la oxidación de este compuesto se requiere la adición de pequeñas cantidades de oxígeno.

**Cuba y Foresti (2006)** presentaron los resultados parciales derivados de 100 días de operación de un reactor secuencial aerobio/anaerobio usando gas metano como donador de electrones para la remoción de nitrógeno mediante un proceso biológico de nitrificación/desnitrificación. Los periodos secuenciales fueron de 6 horas para la aireación (nitrificación), 0.5 horas para la reducción de la concentración del oxígeno disuelto en el medio, 16.5 horas para la desnitrificación con adición de metano y una hora para la sedimentación. Los resultados obtenidos demostraron que este tipo de sistemas es eficiente para la remoción completa de nitrógeno amoniacal. Sin embargo, a pesar de que el sistema presenta buenas condiciones para la solubilización del metano no fue posible detectar disminución de este gas en el sistema lo que atribuyeron a la alta concentración de lodos en el medio (mezcla de lodo UASB y lodo activado aproximadamente de 7 g/L), los elevados periodos de aireación (nitrificación) pero principalmente a los periodos anóxicos que permitieron la desnitrificación usando los subproductos del metabolismo endógeno. Concluyen que con los resultados parciales obtenidos no pueden afirmar que este tipo de sistemas pueda ser eficiente para la desnitrificación biológica usando al metano como única fuente de carbono y energía.

**Modin et al. (2008a)** compararon la eficiencia de la desnitrificación usando metano como fuente de carbono y energía en un sistema que denominaron AME-D (oxidación aerobia de metano acoplada a la desnitrificación) en dos reactores, uno con biomasa suspendida y otro con membrana.

Emplearon un reactor con biomasa suspendida con capacidad de 1.1 L y medio sintético con 1444 mg/L de  $\text{KNO}_3$  que ocupaba un volumen de 250 mL. Este reactor se operó por 8 días. Se inoculó con 10 mL de cultivo enriquecido (proveniente de lodos activados) incubado en un cuarto de temperatura a 25°C. En los 850 mL de volumen restante adicionaron metano, oxígeno y helio a 0.44, 0.46 y 0.99 atmósferas respectivamente. El helio fue adicionado para aumentar la presión interna del sistema. Para favorecer la transferencia de masa, el reactor fue colocado sobre una parrilla de agitación.

El bio-reactor con membrana sumergida se operó por 12 días y consistió de tres secciones: una membrana (por donde se suministró la fase gas), colocada en medio en un tubo de acrílico de 2.5 cm de diámetro interno; una bio-película (donde se realizó la metano oxidación y la desnitrificación) y una fase líquida (para contener el medio con nitrato) que se mantuvo siempre en agitación. La membrana fue construida usando un tubo de silicón permeable a gas de 30 cm de largo con un diámetro interno de 3 mm y grosor de la pared de 0.5 mm. El volumen total de la fase líquida fue de 800 mL. El reactor fue inoculado de la misma manera que el reactor con biomasa suspendida. El tubo de silicón fue conectado a un tanque de gas con metano, oxígeno y helio.

Concluyen que es posible desnitrificar con metano como fuente de carbono y energía usando bio-reactores de membrana (relación C/N = 2.2) ya que su eficiencia es mayor se compara con los reactores de biomasa suspendida (relación C/N = 8.7). La tasa de desnitrificación alcanzada usando una membrana fue de 1.04 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}\cdot\text{h}$ .

**Modin et al. (2008b)** en otro estudio operaron el mismo reactor con membrana sumergida reportado por Modin et al. (2008a) durante 59 días con el propósito de estudiar la oxidación aerobia de metano acoplada a la desnitrificación (AME-D).

Proponen que las bacterias metanótrofas oxidan aeróbicamente al metano que se encuentra en contacto con la fase gaseosa del sistema liberando compuestos orgánicos que pueden ser usados como donadores de electrones para la desnitrificación, la cual tomaría lugar en la parte interna de la bio-película formada.

Los primeros 30 días de operación sirvieron para dar oportunidad al crecimiento de la bio-película, los días restantes fueron para el seguimiento de los parámetros analíticos. Durante la fase experimental, monitorearon el comportamiento del metano y del oxígeno, dependientes de las presiones parciales aplicadas para su flujo sobre la membrana; la desaparición de nitrato (cromatografía de gases con detector de conductividad térmica) y la producción de carbono orgánico disuelto dentro del reactor (TOC). Con este dispositivo y asumiendo que la cantidad de biomasa dentro del sistema era de 150 mg/L SV, la tasa de remoción de nitrato que reportan fue de 1.80 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}\cdot\text{h}$ .

Concluyeron que la bio-película formada sobre la membrana reguló por sí misma la cantidad de metano y oxígeno suplementado al sistema. A pesar de la variación de la presión intramembrana la relación entre C/O tendió siempre a 1.68 afirmando que este es un buen sistema para desnitrificar agua contaminada con nitratos usando metano como fuente de carbono externa.

**Modin et al. (2008c)** investigaron la remoción simultanea de nitratos y cuatro pesticidas (atrazina, aldicarb, alaclor y melation) en agua subterránea usando un reactor de membrana con biopelícula alimentado con metano como fuente de carbono y energía.

Colectaron muestras ambientales de lodos activados, suelo, agua subterránea y sedimentos de estanques. Las muestras fueron diluidas 1:10 en un medio que contenía  $\text{KNO}_3^-$  como fuente de nitratos. 30 mL de muestra fueron enriquecidas en viales de 120 mL a los que agregaron aire/metano o metano puro con la finalidad de promover el crecimiento de las bacterias desnitrificantes. No observaron crecimiento en los viales con metano pero si un alto crecimiento en los que se adicionó aire/metano.

La membrana usada en éste estudio fue Mitsubishi-Rayon MHF200TL. Cada modulo de membrana contenía 192 fibras con un diámetro de 280  $\mu\text{m}$ . El área de la superficie de la membrana fue de 0.014  $\text{m}^2$  por modulo. El reactor estaba conformado por dos módulos paralelos de membrana por donde se hacía pasar de manera independiente metano y oxígeno. El agua fue recirculada a través de la membrana usando una bomba peristáltica. El pH fue controlado en 7.5 adicionando ácido clorhídrico. El experimento fue dividido en cuatro corridas operadas durante 96 días: A = 54 - 61, B = 61 - 71, C = 71 - 85 y D = 85 - 96. Calcularon la velocidad de desnitrificación asumiendo que la biomasa producida contenía 12% en peso de nitrógeno ( $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ ). Las velocidades de desnitrificación obtenidas fueron de 36.80, 17.30, 12 y 13.60  $\text{mg N-NO}_3^-/\text{g SSV}\cdot\text{h}$  para cada una de las corridas. Reportan que la concentración de oxígeno disuelto en cada corrida fue despreciable.

Refieren que el burbujear aire a través de la membrana debería beneficiar la oxidación aerobia de metano acoplada a la desnitrificación (AME-D), esto implicaría que las bacterias metanótrofas pudieran oxidar más metano para hacerlo un compuesto orgánico de mayor disponibilidad para las bacterias desnitrificantes.

En lo que refiere a los pesticidas, afirman que las bacterias metanótrofas son hábiles para remover aldicarb, alaclor y melation pero no atrazina.

Concluyen que este estudio muestra que la remoción de nitratos y algunos pesticidas es posible usando cultivos microbianos adaptados a metano como fuente de carbono y energía usando un reactor de membrana con bio-película.

**Rodríguez y Foresti (2008)** reportan los resultados obtenidos en una planta de tratamiento de aguas a escala piloto conformada por dos unidades dispuestas secuencialmente. La primera unidad fue un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB) con un volumen útil de  $0.2 \text{ m}^3$ . El efluente del reactor UASB fue tratado en una segunda unidad, un filtro percolador aerobio-anóxico. En la parte superior se llevó a cabo la remoción del carbono orgánico disuelto (200 L) y en la inferior (60 L) operada en condiciones anóxicas, la desnitrificación. El reactor fue empacado con anillos de plástico y anillos corrugados con el propósito de aumentar el área de contacto entre los microorganismos adheridos y el agua residual a tratar además de favorecer la resistencia del paso del biogás dentro del sistema. El biogás utilizado como donador de electrones fue suministrado por dos sistemas manifolds localizados dentro del compartimiento anóxico conectados a la línea de salida del biogás producido por reactor UASB.

Dos son los compuestos presentes en el biogás que son potencialmente usados como donadores de electrones:  $\text{CH}_4$  y  $\text{H}_2\text{S}$ . Que se use uno u otro depende de las condiciones ambientales y la presencia o ausencia de oxígeno disuelto. En este estudio la materia orgánica disponible del agua residual fue muy baja (carbono orgánico disuelto  $< 20 \text{ mg/L}$ ).

Considerando que el oxígeno disuelto presente en el compartimiento anóxico fue bajo ( $1 \text{ mg/L}$ ), asumieron que este hecho favoreció la oxidación de metano presente en el biogás a otros compuestos orgánicos intermediarios los cuales fueron usados para llevar a cabo el proceso de desnitrificación. Por otro lado, es sabido que la desnitrificación ocurre cuando se incrementa la concentración de sulfatos por lo que debido a la presencia de oxígeno disuelto en el compartimiento anóxico, los autores sugieren que el ión sulfato fue producido por la oxidación completa del  $\text{H}_2\text{S}$  presente en el biogás y, probablemente, usado también para la desnitrificación.

Concluyen que la configuración propuesta arroja resultados satisfactorios para su aplicación en el postratamiento de efluentes de reactores anaerobios que tratan agua residual doméstica, especialmente para remover la materia orgánica residual y los nitratos ya que una fracción de  $\text{N-NO}_3^-$  fue desnitrificada en el compartimiento anóxico (53%) en presencia de biogás lo que indica el potencial uso de este subproducto del tratamiento anaerobio como donador de electrones para la desnitrificación donde la fracción de metano es el principal constituyente usado como donador de electrones.

En la tabla 3.1 se presenta un resumen de los procesos descritos indicando tipo de reactor, medio empleado, velocidad de remoción de nitratos, relación C/N y proceso involucrado.

Tabla 3.1 Velocidad de remoción de nitrato obtenida en diferentes investigaciones usando metano

Tipo de reactor	Medio	Velocidad de remoción de nitratos		C/N	Proceso involucrado	Referencia
		mg NL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg Ng <sup>-1</sup> VSSh <sup>-1</sup>			
Columna empacada	Sintético	50% de remoción			No conocido	Davies (1973)
Columna empacada		0.70 con metano			No conocido	Sollo <i>et al.</i> (1976)
Columna empacada	Sintético				No conocido	Mason (1997)
Lecho fluidizado	Sintético	0.24 (con O <sub>2</sub> )			AME-D + Asimilación	Rhee y Fuhs (1978)
Lodos activados (16L)	Lixiviado de relleno sanitario	2.5		12	AME-D + Asimilación	Werner and Kayser (1991)
Filtro percolador (4.8L)		6.25				
Lecho fluidizado		22.91 (todos con O <sub>2</sub> )				
Reactor en lote	Agua potable				AME-D	Wisotzky y Bardtke (1992)
Botellas serológicas en lote (0.05L)	Sintético	0.16 a 0.52	4.50 a 14.73		ANME-D	Quezada <i>et al.</i> (1993)
Reactor en lote (0.4L)	Sintético	2.08	25 (con O <sub>2</sub> )	4 a 5.9	AME-D + Asimilación	Thalasso <i>et al.</i> (1997)
Reactor lote (5L)	Sintético (80 µg <sup>1</sup> de Cu)	3.3		12.7	AME-D + Asimilación	Houbron <i>et al.</i> (1999)
	Sintético Real	6.10 9.47 (con O <sub>2</sub> )	3.6 4.6 (con O <sub>2</sub> )	7.7 7.7		
Reactor en lote (4L)	Sintético	10.83 (Con O <sub>2</sub> )			AME-D + Asimilación	Rajapakse y Scutt (1999)
Experimentos en lote (0.05L)	Sintético				AME-D + Asimilación	Costa <i>et al.</i> (2000)
<i>In situ</i>	Agua subterránea	8.95 26.87 (con O <sub>2</sub> )			ANME-D AME-D	Eisentraeger <i>et al.</i> (2001)
Reactor en lote (0.55L)	Sintético	5.80		1.8	ANME-D	Islas-Lima <i>et al.</i> (2004)
Reactor lote (3.5L)	Sintética	2.37 con metano			ANME-D	Gavazza dos Santos <i>et al.</i> (2004)
Lecho fluidizado (21L)	Sintética		0.37 0.49 0.67 (con O <sub>2</sub> )		ME-SND + Asimilación	Khin y Annachhatre (2004)
Reactor secuencial (9L)	Sintética	25 (con O <sub>2</sub> )	0.01		AME-D + Asimilación	Waki <i>et al.</i> (2005)
Reactor secuencial (1.6L)	Sintética	(Con O <sub>2</sub> )			ME-SND + Asimilación	Cuba y Foresti (2006)
Reactor con biomasa suspendida	Sintético	1.04 (con O <sub>2</sub> )		2.2	AME-D	Modin <i>et al.</i> (2008a)
Reactor con membranas						
Reactor con membrana sumergida	Sintético	1.80 (con O <sub>2</sub> )			AME-D	Modin <i>et al.</i> (2008b)
Reactor en lote (5L)	Sintético		36.80 (con O <sub>2</sub> )		AME-D	Modin <i>et al.</i> (2008c)
Filtro percolador a nivel piloto (60L)	Efluente de un reactor UASB	53% de remoción con O <sub>2</sub>			AME-D	Rodríguez y Foresti (2008)

AME-D + Asimilación (Oxidación aerobia de metano acoplada a desnitrificación + asimilación)

AME-D (Oxidación aerobia de metano acoplada a desnitrificación)

ANME-D (Oxidación anaerobia de metano acoplada a desnitrificación)

ME-SND + Asimilación (Oxidación de metano acoplada a reducción no asimilativa de nitrato a nitrógeno molecular)

### Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía



Del análisis de la literatura, aún existe la controversia si la desnitrificación puede llevarse a cabo con metano en ausencia de oxígeno. Termodinámicamente la oxidación del metano con el nitrato como aceptor de electrones es favorable como lo muestra la reacción:



En este contexto, considerando los trabajos publicados sobre el tema, se tiene una discrepancia en la necesidad o no de adicionar pequeñas cantidades de oxígeno durante el desarrollo del proceso. Por lo anterior, se considera importante definir claramente si el metano puede ser usado como la única fuente de carbono para llevar a cabo la desnitrificación biológica como lo han reportado Davies (1973), Rhee y Fuhs (1978), Quezada *et al.* (1993), Thalasso *et al.* (1997), Eisentraeger *et al.* (2001), Islas-Lima *et al.* (2004), Gavazza dos Santos *et al.* (2004) y Cuba y Foresti (2006). Las implicaciones son importantes, ya que en ciertos procesos de tratamiento, como el descrito anteriormente (Sistema Triple A), el metano es un subproducto que puede ser aprovechado en la desnitrificación, sin costos adicionales de operación por motivo de la adición de un reactivo externo como metanol.

## 4 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el metano puede ser usado como única fuente de carbono y energía en un proceso de desnitrificación biológica en ausencia de oxígeno.

### 4.1 Objetivos específicos.

- Inducir la transformación de un lodo activado a lodo desnitrificante.
- Determinar la cinética de desnitrificación del lodo desnitrificante adaptado.
- Determinar la factibilidad técnica de llevar a cabo un proceso de desnitrificación en continuo utilizando metano como fuente de carbono y energía para el tratamiento de aguas residuales.

### 4.2 Hipótesis.

El metano, presente en el biogás subproducto de la digestión anaerobia, constituye una fuente económica de sustrato, por lo que puede ser usado como única fuente de carbono y energía para llevar a cabo la desnitrificación biológica de aguas residuales con baja carga orgánica y baja concentración de nitratos en ausencia de oxígeno.

## 5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 5.1 Obtención del inóculo desnitrificante

La metodología se desarrolló en el Laboratorio de Bioprocesos e Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM con el propósito de evaluar la capacidad de desnitrificación de un lodo aerobio adaptado a condiciones anóxicas usando metano como única fuente de carbono y energía.

Durante un periodo de cuatro meses se adaptó un lodo aerobio proveniente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria (UNAM). En un tinaco Rotoplas con capacidad de 500 L se colectó aproximadamente 460 L de agua y lodo proveniente de la caja partidora. Diariamente el sobrenadante era decantado y se rellenaba con más agua y lodo de la caja partidora, para posteriormente alimentarlo con una concentración de 35 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\text{NaNO}_3$ ) y glucosa como fuente de carbono (relación C/N = 1.5). Esta mezcla era agitada mecánicamente al menos dos veces al día.

Se optó usar glucosa como fuente de carbono y energía por su bajo costo y por ser un sustrato de fácil asimilación para la mayoría de los microorganismos presentes en el lodo aerobio.

Los parámetros evaluados en esta fase fueron sólidos suspendidos en sus tres componentes (totales, volátiles y fijos), pH, alcalinidad, Índice volumétrico de lodos (IVL) y Velocidad de sedimentación (VS) conforme a los métodos descritos en APHA-AWWA-WPCF (1989).

#### 5.1.1 Caracterización del inóculo desnitrificante

Para caracterizar el lodo se hicieron las siguientes pruebas: Sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), sólidos suspendidos fijos (SSF), índice volumétrico de lodos (IVL) y velocidad de sedimentación (VS) conforme a los métodos descritos en APHA-AWWA-WPCF (1989). Además se realizaron cinéticas de desnitrificación para comprobar la efectividad de los lodos para remover nitratos.

## 5.2 Prueba en columna en lote

### 5.2.1 Descripción del dispositivo experimental

El dispositivo experimental consistió en un reactor cilíndrico de vidrio de 40 cm de altura y 9 cm de diámetro cerrado herméticamente con capacidad nominal de 2.5L. La tapa tenía insertado un manómetro de 2 pulgadas de carátula con entrada inferior de ¼ de pulgada, rango de 0 a 1 atmósfera (0 a 14.5 lb/pulgada<sup>2</sup>) marca METRONMR además de una entrada para alimentación y una toma de muestra como se puede observar en la Figura 5.1. En la parte central de la tapa superior había un dispositivo para tomar la muestra de la fase gaseosa. Para homogenizar el sistema y favorecer la transferencia de metano gaseoso a la fase líquida se usó una parrilla agitadora Cole - Parmer y dentro del reactor se colocó una barra agitadora de teflón modelo polygon de 2 x 3/8 de pulgada marca Spinbar.

El reactor fue operado por un periodo de 152 días. Durante los primeros 82 días de operación, la toma de muestra y la alimentación se realizó diariamente. Después de este periodo, y debido a la baja velocidad de remoción de nitrato observada en el sistema, posterior al día 83 de operación, se optó por realizar el seguimiento de la fase líquida cada semana y cada tercer día de la fase gas, pero siguiendo la presión interna del sistema de manera diaria con la finalidad de tener disponible el metano en la fase líquida para que los microorganismos pudieran usarlo como sustrato.

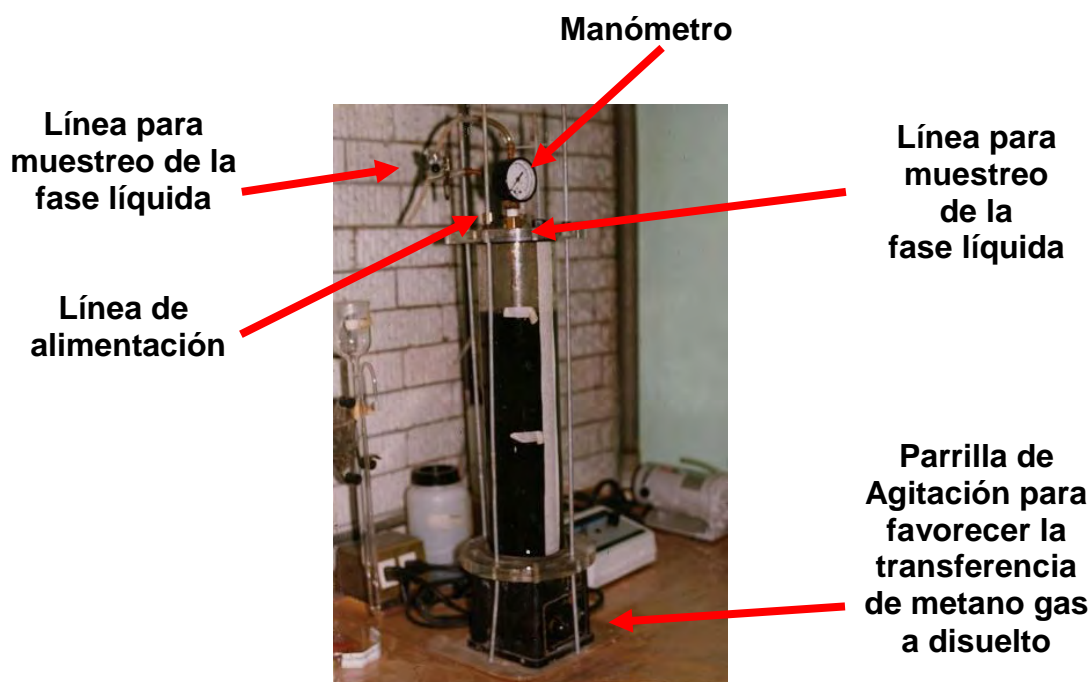


Figura 5.1 Dispositivo experimental (Reactor Anóxico)

### 5.2.2 Inoculación del reactor

Se colocó 1 litro de lodo anóxico (2.9 g/L de SSV) y 1 litro de medio desnitrificante propuesto por Timmermans y Van Haute (1983) con el objeto de ocupar 2 litros del volumen del reactor (Anexo 1).

El reactor fue alimentado inicialmente con 35 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Después de cada toma de muestra se introdujo al reactor medio desnitrificante para ajustar la concentración de nitratos y mantener constante el volumen de trabajo en el sistema.

Se cambió la atmósfera interna del reactor por metano durante 5 minutos (500 mL de volumen del reactor) de la siguiente forma: con una aguja de jeringa adaptada a una manguera que se conectó a un tanque de metano, se introdujo una corriente de gas a una presión de 0.3 kg/cm<sup>2</sup> (4.41 lb/pulgada<sup>2</sup>) la cual era evacuada con una segunda aguja de jeringa colocada en la parte superior del reactor. Terminado el tiempo para el cambio de atmósfera se retiró la aguja de jeringa y se incrementó la presión interna con metano hasta 8 lb/pulgada<sup>2</sup> (0.56 kg/cm<sup>2</sup>) medida con un transductor de presión Cole Palmer con rango de 0 – 15 lb/pulgada<sup>2</sup>. En el anexo A1 se presenta el cálculo que se usó para definir la presión de metano en fase gas que aseguraría la concentración en la fase líquida a una relación C/N = 1.5, con base en la Ley de Henry.

### 5.2.3 Seguimiento de la fase líquida

Para la realización de las pruebas fisicoquímicas (Tabla 5.1), se tomaron 10 mL de muestra de la fase líquida con la ayuda de una jeringa adaptada a la línea de muestreo del reactor.

**Tabla 5.1** Parámetros analizados en el reactor anóxico alimentado con metano

<i>Parámetro</i>	<i>Método</i>	<i>Frecuencia</i>
Nitratos	Espectométrico ultravioleta selectivo y RQ-Flex	Cada semana
Nitritos	RQ-Flex	Cada semana
Nitrógeno amoniacal	Büchi	Cada semana
Nitrógeno total	Büchi	Cada semana
SST, SSV, SSF	Gravimétrico	Cada semana
Metano en fase gas	Cromatógrafo	Cada tercer día
Presión	Manómetro y transductor	Diario
Alcalinidad	APHA,AWWA,WPCF (1989)	Cada semana
pH	Potenciométrico	Cada semana
Tinción de Gram	APHA,AWWA,WPCF (1989)	Inicio, parte intermedia y final de la fase experimental
Número más probable para identificar bacterias desnitrificantes	APHA,AWWA,WPCF (1989)	Inicio, parte intermedia y final de la fase experimental
Prueba de la catalasa en el inóculo	APHA,AWWA,WPCF (1989)	Inicio, parte intermedia y final de la fase experimental

#### 5.2.4 Seguimiento de la fase gaseosa

Durante el primer mes se tomaron muestras diarias de la fase gas y posteriormente una vez por semana, antes de tomar la muestra líquida, para cuantificar la concentración de metano presente en el reactor. Se inyectaron 0.4 mL del gas en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (Fisher Gas Partitioner Modelo 1200) de doble columna (Porapak Q y malla molecular SA), la temperatura de la columna se mantuvo a 50°C, la corriente del puente a 150 mA y el atenuador en 4. Se empleó helio como gas acarreador a un flujo de 25 mL/min. Posterior a la toma de muestra y a la alimentación del reactor, se re-inyectaba metano para recuperar la presión de operación 0.56 kg/cm<sup>2</sup>. Con los datos obtenidos se calculó la concentración de metano disuelto dentro del reactor la cual se mantuvo alrededor de 206 mg/L (Anexo1).

La actividad de los microorganismos se calculó dividiendo la tasa máxima de desnitrificación (mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> removidos por unidad de tiempo) entre la cantidad de SSV en el reactor la cual se expresa como mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> /g SSV \*d.

## 5.3 Pruebas Microbiológicas

Con la finalidad de dar seguimiento a los microorganismos presentes en el inóculo desnitrificante a partir de una muestra de lodo se llevaron a cabo pruebas microbiológicas usando diferentes fuentes de carbono (glucosa, etanol y metano) además de un testigo (sin fuente de carbono exógena) al inicio, en la parte intermedia y al final de la fase experimental.

### 5.3.1 Número Más Probable (NMP). Prueba presuntiva

Esta técnica también llamada de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculada. El método se basa en que las bacterias producen nitrógeno incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 a 48 horas, resultando una producción de gas, el cual se manifiesta en las campanas de fermentación (campanas Durham).

Se usó medio desnitrificante con una dilución del inóculo de 1/100. Se hicieron diluciones hasta  $10^{-7}$  usando las diferentes fuentes de carbono a probar (relación C/N = 1.5) en cada una de las pruebas realizadas.

En series de tres tubos serológicos con campana de Durham se colocaron 9 mL medio desnitrificante y se inocularon con las diluciones de lodo desnitrificante. La glucosa y el etanol fueron agregados en el medio desnitrificante y el metano inyectado por los septos de las tapas de los tubos por medio de jeringas.

### 5.3.2 Tinción de Gram y Prueba de la Catalasa

Se tomaron muestras del inóculo al inicio, en la parte intermedia y al final de cada prueba para la realización de la prueba de Tinción de Gram y Catalasa.

La tinción diferencial de Gram es la más comúnmente empleada en bacteriología. Permite la separación de bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, dependiendo de la composición de la pared celular. Las bacterias Gram-positivas (+) retienen el cristal violeta después de la decoloración y aparecen de color azul intenso. Las bacterias Gram negativas (-) no son capaces de retener el cristal violeta después de la decoloración, y son teñidas de rojo con el colorante de contraste: safranina. Las características de la coloración de Gram pueden ser atípicas en cultivos muy jóvenes, viejos, muertos o degenerados.

La prueba de la catalasa se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Esta prueba se determina positiva cuando se observa burbujeo después de la adición del  $H_2O_2$ , el cual es debido a la descomposición del oxidante en  $H_2O$  y  $O_2$ .

Originalmente, esta prueba era utilizada para diferenciar entre los siguientes géneros:

- *Streptococcus* (-) de *Micrococcus* (+) y/o *Staphylococcus* (+).
- *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-).
- *Lysteria monocytogenes* (+) y/o *Corynebacterium* (+), con las excepciones de *C. pyogenes* y *C. haemolyticum*, ambos (-) de *Erysipelothrix* (-).

La Tinción diferencial de Gram se realizó de acuerdo a la metodología descrita en APHA-AWWA-WPCF (1989) y para la Prueba de Catalasa se colocó una gota de inóculo en un vidrio de reloj y se puso en contacto con una gota de  $H_2O_2$  al 30%.

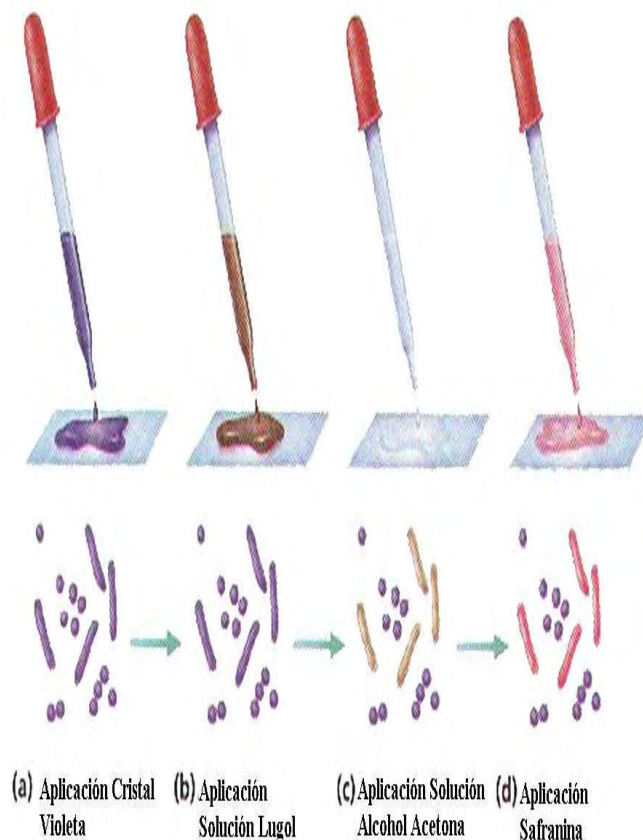


Figura 5.2 Tinción diferencial de Gram



## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Inóculo desnitrificante

La caracterización del inóculo obtenido para esta experimentación (índice volumétrico de lodos (IVL), velocidad de sedimentación (VS) y sólidos suspendidos en sus tres formas) se muestran en la tabla 6.1. Estos valores indican que se trata de un lodo floculento con buena capacidad de sedimentación en comparación con un lodo anaerobio granular.

**Tabla 6.1** Valores del IVL y VS del inóculo desnitrificante

<b>Parámetros</b>	<b>Lodo anóxico</b>
Sólidos suspendidos totales (SST).	3.9 g/L (100%)* ( $\pm 0.1$ )
Sólidos suspendidos volátiles (SSV).	2.9 g/L (74.1%)* ( $\pm 0.1$ )
Sólidos suspendidos fijos (SSF).	1.0 g/L (25.9%)* ( $\pm 0.0$ )
Índice volumétrico de lodos (IVL).	283 mL/g* ( $\pm 0.3$ )
Velocidad de sedimentación (VS).	5.0 m/h* ( $\pm 0.3$ )

\*Los valores son el promedio de tres réplicas.

Posteriormente, en un reactor de vidrio de 1L se realizaron cinéticas de desnitrificación con objeto de verificar la eficiencia del inóculo para remover  $\text{N-NO}_3^-$ . En la figura 6.1 se muestra la cinética de desnitrificación que se ajusta a la cinética de primer orden donde las tasas de cambio que se presentan en cada fase de la velocidad de desnitrificación, se integraron a un modelo que representa la dinámica global de la remoción de nitratos dentro del sistema. La tasa de remoción alcanzada fue de 21.39 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}^*\text{h}$ .

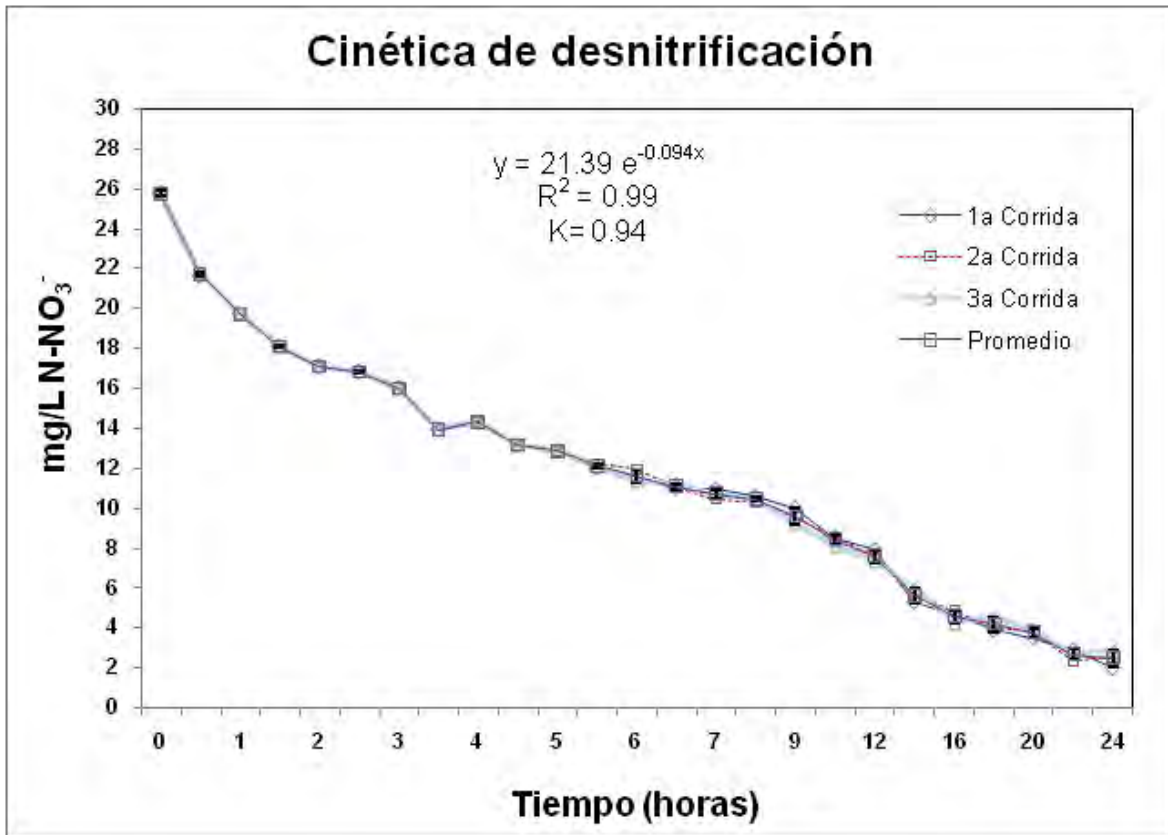
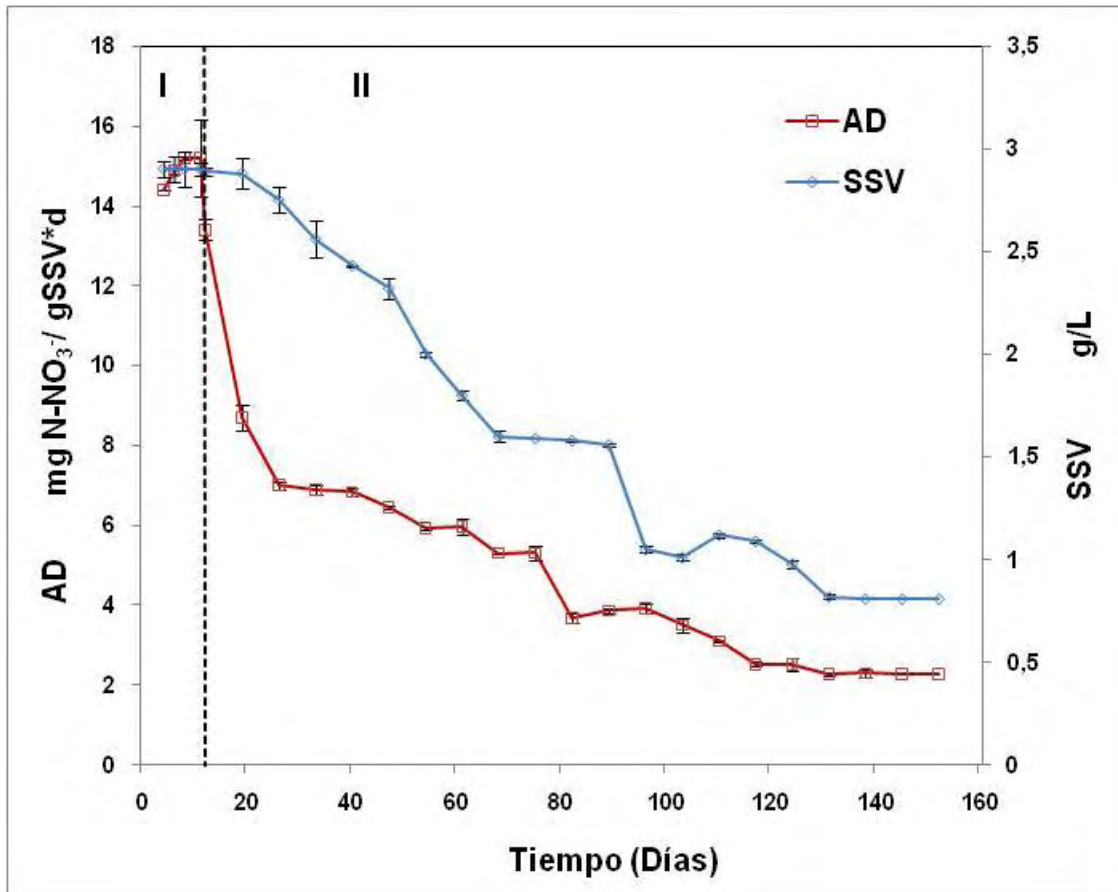


Figura 6.1 Cinéticas de desnitrificación del lodo adaptado

## 6.2 Prueba en lote en columna

El dispositivo experimental de la figura 5.1 fue operado por 152 días; en la Figura 6.2 se observa que al inicio del experimento (primera semana: Fase I) hubo una relativamente alta actividad desnitrificante (AD), la cual se atribuye a la presencia del carbono exógeno (glucosa) con que fue adaptado previamente el lodo. Una vez que el sustrato remanente fue consumido por los microorganismos, en el día 15 se adicionó metano, observándose una reducción de la AD. A partir de ese día, la AD obtenida puede atribuirse al consumo de carbono endógeno (lisis celular) lo que se refleja en la disminución de SST y SSV (3.9 g/L a 1 g/L y 2.9 g/L a 0.81 g/L respectivamente). A pesar de que termodinámicamente la desnitrificación con metano es posible ( $\Delta G = -849.3$  kJ/reacción), ésta no se desarrolló adecuadamente pues la actividad desnitrificante obtenida al final de la fase experimental fue de sólo de 2.3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/gSSV\*d.

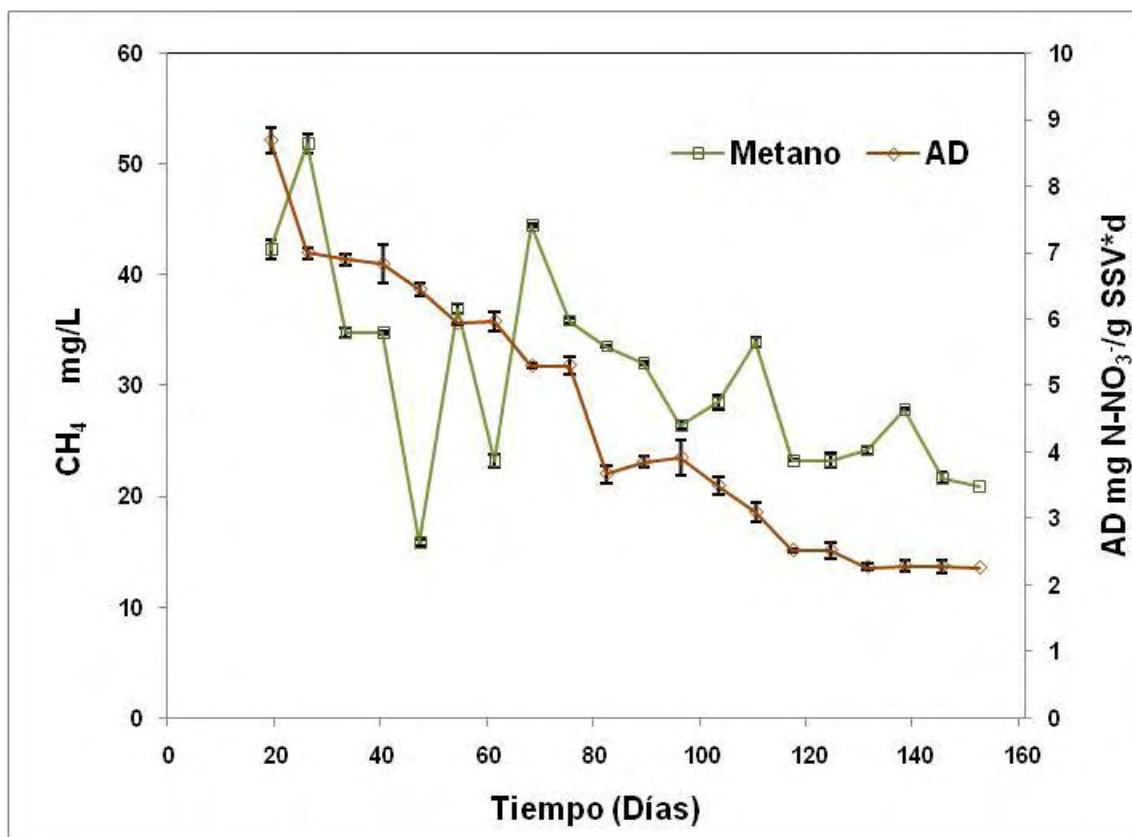
El pH durante el periodo experimental se mantuvo entre 7.2 y 7.9.



**Figura 6.2** Actividad desnitrificante (AD) y comportamiento de los sólidos suspendidos volátiles (SSV) con respecto al tiempo

I: Inicio de la fase experimental donde la AD se debe principalmente al carbono exógeno remanente  
 II: Seguimiento diario de la fase líquida y gaseosa

Estos resultados concuerdan con algunos de los trabajos realizados en el tema donde sugieren que es necesario previo a la adición de metano como fuente de carbono y energía, asegurar el consumo de todo el carbono exógeno presente (Davies (1973), Werner y Kayser (1991), Houbroun *et al.* (1999), Rajapakse y Scutt (1999), Eisentraeger *et al.* (2001), Gavazza dos Santos *et al.* (2004), Khin y Annachatre (2004), y Waki *et al.* (2005).

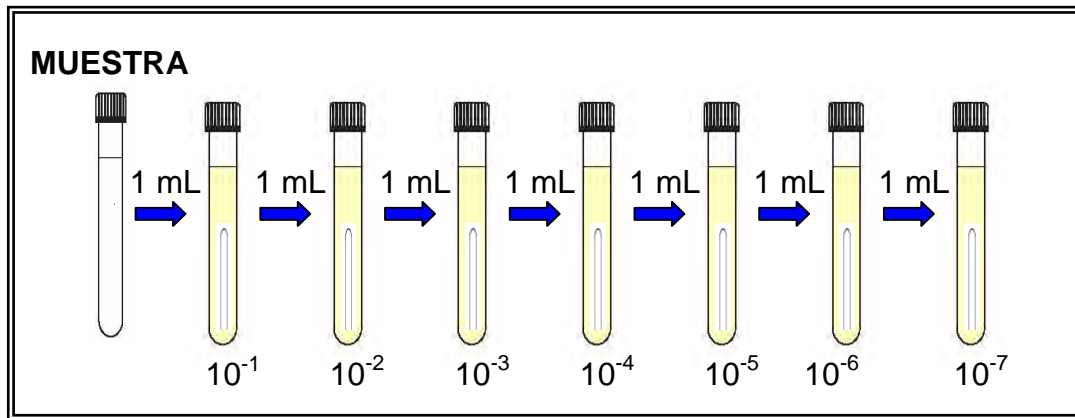


**Figura 6.3** Relación entre la actividad desnitrificante y el consumo de metano en un proceso de desnitrificación biológica (lotes semanales)

Como se observa en la Figura 6.3, no existe correlación entre la masa de metano consumido y la actividad desnitrificante ( $r^2 = 0.56$ ). Aunque existe consumo de metano, la actividad desnitrificante tiende a disminuir con respecto al tiempo.

En la Figura 6.2 se puede apreciar que la actividad desnitrificante se correlaciona mejor con la reducción de los SSV ( $r^2 = 0.88$ ). Es decir, cuando disminuye la actividad desnitrificante también disminuyen los SSV. La mayor actividad (fase I) se dio cuando existió materia orgánica de fácil asimilación.

### 6.3 Pruebas microbiológicas



**Figura 6.4** Tubos con campana de Durham para número más probable (NMP)

Para verificar si el sustrato estaba disponible para las bacterias desnitrificantes se hicieron pruebas microbiológicas (NMP) variando la fuente de carbono: glucosa, etanol y metano empleando campanas de Durham para detectar la producción de gas (N<sub>2</sub>) en el medio.

En series de tres tubos serológicos con campana de Durham o también llamados de fermentación, se colocaron 9 mL medio desnitrificante y se inocularon con 1 mL de lodo desnitrificante hasta una dilución de 10<sup>-7</sup>. La glucosa y el etanol fueron agregados en el medio desnitrificante y el metano inyectado por los septos de las tapas de los tubos por medio de jeringas, todos a una relación C/N = 1:1.5.

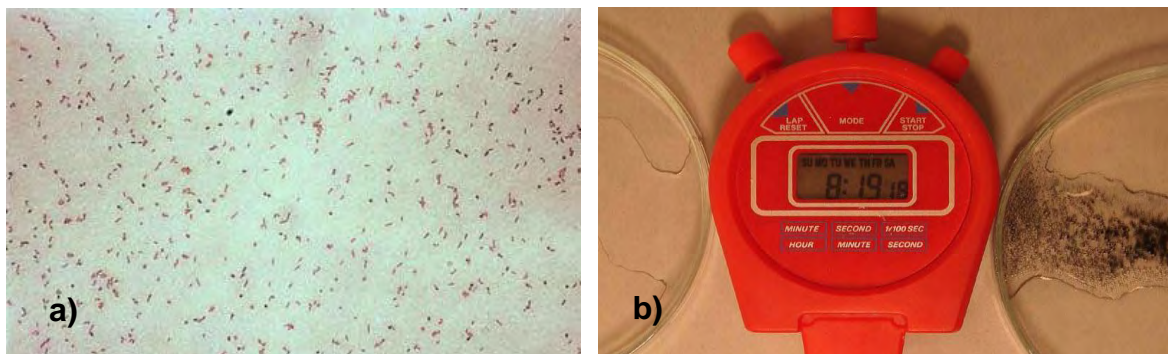
Los resultados de las pruebas de Número Más Probable resultaron positivos a todas las diluciones para los tubos a los que se suministró glucosa y etanol (lectura de tablas para tres tubos de 2.4x10<sup>9</sup> NMP bacterias para ambos) como fuente de carbono y negativas para todos los tubos a los que se les inyectó metano (lectura de tablas para tres tubos de cero NMP) como fuente de carbono. Para el testigo (sin fuente de carbono), de forma similar con lo obtenido al adicionar metano como fuente de carbono no se observó crecimiento en los tubos.

Con los resultados microbiológicos obtenidos puede considerarse que el metano estaba poco disponible en el medio líquido para ser usado como fuente de carbono por las bacterias desnitrificantes presentes o que no se contaba con microorganismos capaces de efectuar la reacción a esas condiciones. Para aclarar esta situación se deben implementar mecanismos que favorezcan la solubilidad del metano en el medio líquido para aumentar su contacto con los microorganismos. Para mejorar la transferencia de masa se puede hacer pasar al

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

metano por la parte inferior del reactor (flujo ascendente) o se puede colocar un difusor que favorecería la transferencia del gas a la fase líquida. Otra opción sería el uso de membranas sumergidas, ya que se ha reportado que aumentan la transferencia de masa dentro del sistema (Modin *et al.*, 2008b).

La bibliografía reporta que las bacterias desnitrificantes son positivas a la prueba de Catalasa y la tinción de Gram. Al realizar estas sencillas pruebas al inóculo el resultado fue positivo para ambas lo que indica la presencia de bacterias desnitrificantes y otros tipos de bacterias aún cuando estas no fueron identificadas.



**Figura 6.5** a) Tinción de Gram y b) Prueba de la catalasa

La mayoría de los trabajos realizados hasta el momento concluyen que el metano puede ser usado como fuente de carbono para la desnitrificación biológica aún cuando las condiciones de operación no han sido plenamente establecidas. Las investigaciones recientes indican que debe haber oxígeno presente (al menos 1 mg/L) para favorecer el proceso de desnitrificación en presencia de metano.

Algunos de los trabajos publicados coinciden con los resultados obtenidos en esta experimentación. Davies (1973), Rhee y Fuhs (1978), Quezada *et al.*, (1993) y Modin *et al.* (2008a y 2008b) concluyen que sí es posible desnitrificar con metano aún cuando las tasas de remoción son bajas.

Werner y Kayser (1991), Thalasso *et al.* (1997), Houbron *et al.* (1999), Rajapakse y Cutt (1999), Costa *et al.* (2000), Eisentraeger *et al.* (2001), Khin y Annachhatre (2004), Waki *et al.* (2005), Cuba y Foresti (2006), Modin *et al.* (2008a, 2008b y 2008c) y Rodríguez y Foresti (2008) obtuvieron tasas de remoción de bajas a moderadas al estudiar la influencia del oxígeno el cual parece jugar un papel importante en el proceso de desnitrificación biológica debido a que el metano puede ser oxidado a otros compuestos como el metanol, formaldehído o formiato, compuestos de más fácil asimilación para los microorganismos desnitrificantes cuando hay presencia de bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el medio.

Para establecer las bases que ayuden a resolver la controversia del mecanismo de acción del metano debe aclimatarse el lodo que va a servir como inóculo con

---

***Desnitrificación con metano como fuente de carbono y energía***

este sustrato. El medio sintético también debe estar libre de cualquier fuente de carbono externa. Davies (1973), Quezada *et al.* (1993), Thalasso *et al.* (1997), Houbron *et al.* (1999), Eisentraeger *et al.* (2001), Islas *et al.* (2004) Khin y Annachhatre (2004) y Waki *et al.* (2005) pretrataron el inóculo durante periodos de tres días a seis meses con metano.

En todos los trabajos se reporta deficiencia o reservas en cuanto al fenómeno de transferencia de masa (disponibilidad de metano) lo cual llevaría a un déficit de sustrato en el medio.

Los trabajos reportados por Rhee y Fuhs (1978), Werner y Kayser (1991), Thalasso *et al.* (1997), Houbron *et al.* (1999), Rajapakse y Cutt (1999), Costa *et al.* (2000), Eisentraeger *et al.* (2001), Gavazza dos Santos *et al.* (2004), Khin y Annachhatre (2004), Waki *et al.* (2005), Cuba y Foresti (2006) y Modin *et al.* (2008a, 2008b y 2008c) indican que es necesario la presencia de pequeñas cantidades de oxígeno (entre 1 y 2 mg/L) para oxidar el metano a metanol o formaldehído y hacerlo más accesible a los microorganismos responsables de transformar los nitratos en nitrógeno molecular. Hay una hipótesis propuesta que establece que las bacterias metanotróficas oxidan el metano a metanol u otro metabolito de más fácil asimilación para las bacterias desnitrificantes. Con este experimento, no ha quedado resuelta esta hipótesis, al no haber identificado el producto intermediario de la oxidación del metano. Además, los trabajos reportados difieren en sus resultados dejando una línea de investigación por demás interesante debido a que el metano por ser el principal subproducto de la digestión anaerobia es una opción atractiva para contar con un sustrato barato.

El dispositivo experimental usado en esta investigación debió ser controlado de manera más estricta. El inóculo desnitrificante debió caracterizarse microbiológicamente para establecer si los grupos desnitrificantes y metanotróficos estaban presentes en el mismo. El metano introducido al sistema sólo fue cuantificado por la presión interna del reactor y por la composición de la fase gaseosa del sistema, pero no en la fase líquida del mismo. Esta última determinación permitiría evaluar si la transferencia de masa gas-líquido se estaba llevando a cabo adecuadamente. Si bien, el metano fue adicionado de manera a que estuviera disponible en la concentración requerida esto no fue determinado de manera global para cerrar el balance del sistema.

El mecanismo implementado para solubilizar el metano en el medio pudo no ser el más adecuado ya que aparentemente una agitación mecánica no es suficiente para alcanzar este objetivo.

Se deben realizar modificaciones al dispositivo experimental para mejorar el fenómeno de transferencia de masa en el sistema debido a que los coeficientes de transferencia de masa son afectados principalmente por los parámetros de diseño y los parámetros operacionales tal como la eficiencia del mezclador y el diseño del reactor, entre otros. Por esta razón, este coeficiente debe tener el mismo orden de

magnitud para todos los gases (Chacana *et al.*, 2008). En esta experimentación los coeficientes de transferencia difirieron en 1 orden de magnitud: CH<sub>4</sub> (KLa = 2 d<sup>-1</sup>) y O<sub>2</sub> (KLa = 45.84 d<sup>-1</sup>).



## 7 CONCLUSIONES

- Se logró transformar un lodo activado a lodo desnitrificante, que alcanzó una tasa de remoción de nitratos de 21.39 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en presencia de glucosa como sustrato (relación C/N = 1.5). Este lodo, que fue utilizado como inóculo en el proceso de desnitrificación, presentó buena calidad con 2.90 g/L de sólidos suspendidos volátiles, un índice volumétrico de 283 mL/g y una velocidad de sedimentación de 5.0 m/h.
- La actividad desnitrificante obtenida en el proceso de desnitrificación utilizando metano como fuente de carbono, fue de 2.3 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*d (6.7 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h), la cual se considera baja contra lo esperado. La concentración de sólidos suspendidos volátiles en el reactor cayó de 2.9 a 0.81 g/L, en 152 días que se mantuvo en operación.
- Lo anterior indica que el metano no puede ser usado como fuente de carbono para la desnitrificación bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta investigación, por lo tanto no es un sustrato viable para la desnitrificación biológica en aguas residuales.
- Entre las probables causas de la baja actividad desnitrificante se pueden citar, el uso de glucosa para la transformación del lodo activado a desnitrificante, además de una pobre transferencia de masa en el reactor utilizado.

## 8 RECOMENDACIONES

Se recomienda proseguir con esta línea de investigación, tomando como base las siguientes recomendaciones:

1. Asegurar la eliminación de fuentes endógenas de carbono presentes en el inóculo desnitrificante antes de comenzar la adaptación del lodo con el metano que se usará como fuente de carbono durante el proceso de desnitrificación y evitar el uso de fuentes de carbono fácilmente asimilables como la glucosa al inducir la transformación de lodo aerobio a desnitrificante.
2. Realizar experimentación con bacterias metanótrofas bajo condiciones controladas para identificar el o los posibles intermediarios producidos (metanol, formaldehído, formiato) por las bacterias desnitrificantes en presencia de  $\text{CH}_4$  ( $\text{KLa} = 2 \text{ d}^{-1}$ ) y  $\text{O}_2$  ( $\text{KLa} = 45.84 \text{ d}^{-1}$ ). Se sugiere variar la concentración de  $\text{O}_2$  de 1 a 6.4 mg/L disuelto en el medio, como se reporta en la literatura (Rhee y Fuhs (1978), Werner y Kayser (1991), Thalasso *et al.* (1997), Houbron *et al.*, (1999), Rajapakse y Scutt (1999), Eisentraeger *et al.* (2001), Waki *et al.* (2005), Cuba y Foresti (2006), Modin *et al.* (2008a, b y c) y Rodríguez y Foresti (2008).
3. Verificar la transferencia de masa del reactor para asegurar la completa distribución del metano en la fase líquida. Esta puede mejorarse si se promueve un flujo ascendente del gas, alimentando el metano en la parte inferior del reactor a través de un difusor que evite gradientes de metano, que serían equivalentes a zonas muertas. Otra opción es el uso de membranas sumergidas, ya que se ha reportado que aumentan la transferencia de masa dentro del sistema.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Akunna J. C.; Bizeau C. and Moletta R. (1993). Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: Glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Water Research*. 27 (8): 1303-1312
- APHA-AWWA-WPCF (1989). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 16<sup>th</sup> edition. American Public Health Association. Washington D.C. E.U.A.
- Barnes D. and Bliss P. J. (1983). *Biological control of nitrogen in wastewater treatment*. De. E. & F.N. Spon. New York. Páginas: 146-148
- Bryson D. D. and Boeckman O. C. (1989). Well water methemoglobinemia and water with less than 22.6 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/N/L. *Proceeding American Chemical Society Division Environmental Chemistry*. Dallas Texas. USA.
- Comly H. H. (1945). Cyanosis in infants caused by nitrate in well water. *Journal American Medical Association*. 129 Páginas 112-116
- Costa C.; Dijkema C.; Friedrich M.; García-Encina P.; Fernández-Polanco F. and Stams J. M. (2000). Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 754-762
- Cuba R. M. F. y Foresti E. (2006). Utilização do metano como doador de elétrons para remoção de nitrogênio via nitrificação e denitrificação em reator aerobio/anoxico operado em batelada seqüencial. *Anais do I Seminário do Projeto Temático: Desenvolvimento de sistemas combinados de tratamento de águas residuárias visando a remoção de poluentes e a recuperação de energia e de productos dos ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre*. Universidad de São Paulo, Brasil. 11 a 13 de diciembre 2006. Páginas:184-191
- Chacana J., Tapia P., Zepeda O and Sánchez O. (2008). *Modelling of the anaerobic digestion of solid waste using ADM1*. XXXI Congreso Interamericano AIDIS. Santiago de Chile, Chile. Páginas 1-8
- Davies T. R. (1973). Isolation of bacteria capable of utilizing methane as a hydrogen donor in the process of denitrification. *Water Research* 7:575-579
- Diario Oficial de la Federación, (1997). *Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996*, Que establece los límites máximos permisibles de

contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. 01 de junio de 2007. Páginas: 5-6

Dorsh M. M.; Scragg R. K.; McMichael A, J.; Bagghrst P. A. and Dyar K.F. (1984). Congenital malformations and maternal drinking water supply in rural South Australia: a case-control study. *American Journal Epidemiology*. 119: 473-486

Eisentraeger A.; Klag P.; Vansbotter B.; Heymann E. and Dott W. (2001). Denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor *Water Research* 35 (9): 2261-2267

Foresti E.; Zaiat M. and Vallero M. (2006). Anaerobic processes as the core technology for sustainable domestic wastewater treatment: Consolidated applications, new trends, perspectives and challenges. *Review in Environmental Science and Bio/Technology*. Vol 5 (1): 3-19

Fogg P. G. T. and Gerard W. (1991). *Solubility of Gases in liquids*. John Wiley & Sons. Great Britain. Páginas: 88-90

Garuti G.; Dohanyos M. and Tilche A. (1991). Anaerobic-aerobic combined process for the treatment of sewage with nutrient removal: The ANANOX process. *Water Technology and Environmental Engineering*. Páginas: 371-380

Gavazza dos Santos S.; Amâncio Varesche M, B.; Zaiat M. and Foresti E. (2004). Comparison of methanol, ethanol and methane as electron donors for denitrification *Environmental Engineering Science* 21 (3): 313-320

Grabinska-Loniewska A.; Slomazynski T. and Kanska Z. (1985). Denitrification studies with glycerol as a carbon source. *Water Research*. 19(12): 1471-1477

Halling-Sørensen B. and Jörgensen S. (1993). Process chemistry and biochemistry of denitrification. The removal of nitrogen compounds from wastewater. Editorial Elsevier, Netherlands. Páginas: 119-152

Harrison J. A. (2003). El Ciclo del Nitrógeno: De Microbios y de Hombres. Visionlearning. Vol. EAS-2 (4s)  
[http://www.visionlearning.com/library/module\\_viewer.php?mid=98&l=s](http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=98&l=s)

Henze M. and Harremoës P. (1977). Biological denitrification of sewage a literature review. *Water Technology*. 8: 509-555

Henze M. (1991). Capabilities of biological nitrogen removal from wastewater. *Water Science and Technology*. 23:669-679

- Hiscock K.; Loid J. W. and Lerner D. N. (1991). Review of natural and artificial denitrification of ground water. *Water Research* 25:1099-1111
- Horan N. J. (1991). Biological Wastewater Treatment System. Ed. John Wiley & Son. New York. USA Páginas: 187-233
- Houbron E.; Torrijos M. and Capdeville B. (1999). An alternative use of biogas applied at the water denitrification. *Water Science and Technology* 40(8): 115-122
- Islas-Lima S.; Thalasso F. and Gómez-Hernández J. (2004). Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Research* 38: 13-16
- Jiménez C. B. (1986). Influencia del Oxígeno disuelto y del Carbono orgánico sobre la Desnitrificación Biológica de las Aguas Residuales Urbanas. *Memorias del V Congreso Nacional SMISAAC*. Puebla, México. Páginas: 119-130
- Khin T. and Annachhatre A. P. (2004). Nitrogen removal in a fluidized bioreactor by using mixed culture under oxygen-limited conditions. *Water Science and Technology*. 50(6):313-320
- Knowles R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews*. 46(1): 46-69
- Margalef R. (1989). Ecología. Omega. Barcelona, España. Páginas: 759 y 760
- Mason I. (1977). Methane as carbon source in biological denitrification, *Journal WPCF*. 49: 855-857
- Madigan M. T.; Martiko J. M. and Parker J. (1998). *Ecología microbiana. Ciclos biogeoquímicos: Nitrógeno y azufre*. En: Brock, Biología de los microorganismos. Ed. Prentice Hall, Inc. Capítulo 14:571-574
- Matêju V.; Cizinská S.; Krejci J. and Janoch T. (1992). Biological water denitrification - A review. *Enzyme Microbiology. Technology* 14:170-183
- Metcalf and Eddy. (2003). *Wastewater engineering treatment and reuse*. 4<sup>th</sup> edition. International. New York, USA. Páginas: 253-259 y 1238
- Mitchell R. (1974). *Introduction to Environmental Microbiology*. Prentice Hall. USA. Página: 335
- Modin O.; Fukushi K.; Nakajima F. and Yamamoto K. (2008a). A membrane biofilm reactor achieves aerobic methane oxidation coupled to denitrification (AME-D) with high efficiency. *Water Science and Technology*. 58 (1): 83-87

- Modin O.; Fukushi K.; Nakajima F. and Yamamoto K. (2008b). Performance of membrane biofilm reactor for denitrification with methane. *Bioresource Technology*. Vol. 99: 8054-8060
- Modin O.; Fukushi K.; Nakajima F. and Yamamoto K. (2008c). Simultaneous removal of nitrate and pesticides from groundwater using a methane-fed membrane biofilm. *Water Science and Technology*. 58 (6). 1273-1279
- Moran M. E. R. (1988). Tesis: *Metahemoglobinemias de pediatría*. Revisión bibliográfica. Fac. de Medicina, UNAM, Mexico, D.F. Páginas: 1-8. 13-16
- Monreal M. E. (1980). Tesis: *Metahemoglobinemia adquirida*. Fac. de Medicina, UNAM, Mexico, D.F. Páginas: 6-12
- Morgan-Sagastume J. M.; Jiménez B. and Noyola A. (1994). Anaerobic-Anoxic-Aerobic Process with Recycling and Separated Biomass for Organic Carbon and Nitrogen Removal from Wastewater. *Environmental Technology*. Vol 15: 233-243
- Perry R. H.; Chilton H. C. (1982). *Manual del Ingeniero Químico*. 5ª edición. Mc Graw Hill. México D.F. Páginas: 3-7
- Painter H. A. (1970). A review of inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Research*. Vol. 4: 393-450
- Quezada C. M.; Moreno R. G. y Noyola R A (1993). Desnitrificación: Prueba en lote con Metano como fuente de carbono y energía. *IX Congreso Nacional. I Congreso Región 1 de AIDIS de Norteamérica y del Caribe*. México, D.F. Páginas: 152-157
- Rajapakse J. and Scutt J. (1999). Denitrification with natural gas and various new grown media. *Water Research* 33 (18): 3723-3734
- Rhee G. and Fuhs G. W. (1978). Waste water denitrification with one-carbon compounds as energy source. *Journal WPCF*. Páginas: 2111-2119
- Rodríguez J. A. and Foresti E. (2008). A novel aerobic-anoxic biological filter for nitrogen removal from UASB reactor effluent using biogas compounds as electron donors for denitrification. *IX Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia*. Isla de Pascua, Chile. Páginas: 213-222
- Sedlak R. (1991). Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater. Ed. Lewis Publisher. NY, USA. Páginas: 4, 5, 7 y 34

- Sollo F. W.; Müller H. F. and Larson T. E. (1976). Denitrification of wastewater effluents with methane. *Journal WPCF* 48(7):1840-1842
- Thalasso A. F.; Vallecillo P.; García-Encina and Fdz-Polanco (1997). The use methane as a sole carbon source for water denitrification. *Water Research*. 31:55-60
- Timmermans P. and Van Haute A. (1983). Denitrification with methanol. *Water Research*. Vol 17(10):1249-1255
- Villaverde S. (2004). Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Review in Environmental Science and Bio/Technology*. 3 (2): 171-183
- Waki M.; Suzuki K.; Osada T. and Tanaka Y. (2005). Methane-dependent denitrification by a semi-partitioned reactor supplied separately with methane and oxygen. *Bioresource Technology* 96: 921-927
- Watty B. M. (1982). *Química Analítica*. Editorial Alhambra Universidad. Páginas: 72-76, 603
- Werner M. and Kayser R. (1991). Denitrification with biogas as external carbon source. *Water Science and Technology* 23(4-6):701-708
- Winkler M. A. (1986). Tratamiento biológico de aguas de desecho. Ed. Limusa. México, D.F. Páginas: 256-266 y 280-283
- Wisotzky R. and Bardke D. (1992). Denitrification of drinking water with methane as electron donor. *gwf-Wasser/Abwasser* 133(10): 550-556
- WPCF (1983). *Nutrient Control Manual of Practice FD-7 Facilities Design*. 2<sup>a</sup> edition. USA. Páginas. 6,7, 15-18, 25-29

# ANEXO 1

## A.1.1 Medio para bacterias desnitrificantes

El medio desnitrificante se prepara de acuerdo a la siguiente tabla adicionando además, una solución de elementos traza de acuerdo con Painter (1970) que contenga los elementos requeridos para el crecimiento de la biomasa desnitrificante (0.002 mg/L de Mo, Cu, Co, Mn y Zn).

Tabla A.1.1 Medio para bacterias desnitrificantes propuesto por Timmermans and Haute (1983).

Reactivo	Concentración (mg/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	35
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2

## A.1.2 Solubilidad de metano

- Ley de Henry

$$P_g = H X_g$$

Ecuación 1

$P_g$  = Presión parcial del gas, es este caso  $\text{CH}_4$  (atmósfera)

$H$  = Constante de Henry (atmósfera/(mol gas/mol solución))

$X_g$  = Fracción molar del gas, es este caso  $\text{CH}_4$  (moles de gas/mol de solución)

$H$ , depende de la temperatura y de la naturaleza del líquido.

Tabla A.1.2 Constante de Henry para  $\text{CH}_4$  a 20°C

T °C	Constante de Henry para $\text{CH}_4$
20	$3.76 \times 10^4$ atmósfera/(mol gas/mol solución)



Modificando las unidades de la constante de la ley de Henry, se obtiene directamente la concentración (mg/L) del metano en agua (C).

$$C = PCH_4 \alpha \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{Donde: } \alpha = \left(\frac{1}{H}\right) f \quad \text{Ecuación 3}$$

f = es un factor de conversión  $\left(\frac{\text{mol}}{L} H_2O * \frac{\text{mg}}{\text{mol}} CH_4\right)$

Entonces:

Para saber las moles de H<sub>2</sub>O en un litro:

$$\eta_{H_2O} = \frac{\frac{1000g}{L} H_2O}{\frac{18g}{\text{mol} * L H_2O}} = \frac{55.6 \text{ moles}}{L} \text{ de } H_2O$$

Donde: PM<sub>H<sub>2</sub>O</sub> = 18g/mol

PM<sub>CH<sub>4</sub></sub> = 16g/mol

$$f = \left(16000 \frac{\text{mg}}{\text{mol}} \text{ de } CH_4\right) \left(55.6 \frac{\text{moles}}{L} \text{ de } H_2O\right)$$

$$f = \frac{8.8 \times 10^5 \text{ mg } CH_4 * \text{mol } H_2O}{\text{mol } CH_4 * L}$$

Sustituyendo los valores de f y H en la ecuación 3:

$$\alpha = 23.32 \text{ mg/L} * \text{atm a } 20^\circ\text{C}$$

Sustituyendo  $\alpha$  en la ecuación 1:

$$Pg = \left(\frac{1}{\alpha}\right) f * (Xg)$$

Donde  $f(Xg) = C$  = Concentración

$$Pg = \left(\frac{1}{\alpha}\right) * C$$

Tabla A.1.3 Concentración de CH<sub>4</sub> disuelto a 20°C en función de la presión

<b>Presión Atmósferas</b>	<b>Presión psi</b>	<b>mg/L CH<sub>4</sub> disuelto</b>
0.05	0.735	1.179
0.10	1.470	2.359
0.15	2.205	3.539
0.20	2.940	4.719
0.25	3.675	5.899
0.30	4.410	7.079
0.35	5.145	8.259
0.40	5.880	9.439
0.45	6.615	10.619
0.50	7.350	11.799
0.55	8.085	12.979
0.60	8.820	14.158
0.65	9.550	15.339
0.70	10.290	16.519
0.75	11.025	17.698
0.80	11.760	18.878
0.85	12.495	20.058
0.90	13.230	21.238
0.95	13.965	22.418
1.00	15.400	23.598

## ANEXO 2



### XXXI CONGRESO INTERAMERICANO AIDIS

Santiago – CHILE  
Centro de Eventos Casa Piedra  
12 – 15 Octubre de 2008



## METANO COMO FUENTE DE CARBONO Y ENERGÍA PARA LA DESNITRIFICACIÓN BIOLÓGICA DE AGUAS RESIDUALES

### *METHANE AS CARBON SOURCE AND ENERGY FOR BIOLOGICAL WASTE WATER DENITRIFICATION*

#### **Margarita Elizabeth Cisneros Ortiz\***

Ingeniera en Alimentos por la Universidad Autónoma Metropolitana. M en C Universidad Nacional Autónoma de México. Técnica Académica en el área de Bioprocesos e Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ingeniería.

#### **Adalberto Noyola Robles**

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ingeniería.



Dirección del autor principal (\*): Circuito Escolar sin número Edificio 5, Cubículo 413. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CP 04510, México, D.F. MEXICO. Coordinación de Bioprocesos e Ingeniería Ambiental, **Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México**. Tel (++) (525) 56 23 36 00 extensión 8700, Fax (++) (525) 56 16 27 98. E-mail: y [noyola@pumas.iingen.unam.mx](mailto:noyola@pumas.iingen.unam.mx)

## RESUMEN

En México los procesos de tratamiento de agua residual poco se enfocan en la eliminación de nutrientes (nitrógeno y fósforo). Sin embargo, la legislación mexicana vigente, NOM-001-SEMARNAT-1996 establece como límite máximo permisible un valor de 40 mg/L de nitrógeno total para descargas de aguas a cuerpos receptores (Diario Oficial de la Federación, 1997). Ante esta problemática es necesario desarrollar procesos biológicos de tratamiento de aguas para la eliminación de estos nutrientes. En los últimos 30 años, se ha publicado un número limitado de trabajos donde se considere usar el metano como fuente de carbono y energía en la desnitrificación biológica. Los trabajos reportados difieren en sus resultados dejando una línea de investigación por demás interesante aún por investigar debido a que el metano por ser el principal subproducto de la digestión anaerobia; es una opción atractiva de sustrato barato y del que se pueden obtener tasas razonables de remoción de nitrato. En este estudio se aborda el uso de metano como fuente de carbono y energía para la desnitrificación biológica bajo condiciones anóxicas. Durante 152 días se operó un reactor con capacidad de 2.5L que contenía agua sintética (medio desnitrificante) y una concentración de 35 mg/L de  $N-NO_3^-$ . Metano puro (99.0%) se

introdujo al sistema hasta alcanzar una presión parcial de 4.41lb/pulgada<sup>2</sup>. Si bien la actividad desnitrificante obtenida es baja, 14.6g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*d (0.61g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*h) se concluye que es factible utilizar metano como fuente de carbono y energía para la desnitrificación de aguas residuales.

## **ABSTRACT**

*In Mexico, waste water treatment does not focus in the elimination of nutrients (nitrogen and phosphorous). Nevertheless, Mexican legislation, NOM-001-SEMARNAT-1996 establishes maximum permissible limits of 40 total nitrogen mg/l for water discharged into receiving bodies (Diario Oficial de la Federación, 1997). In order to overcome this requirement, it is necessary to develop biological processes for nutrient removal. In the last 30 years, a limited number of works has been published where it is considered to use the methane as carbon source and energy in the biological denitrification. The reported works defer in their results leaving a filed for developing research studies on this subject, methane being the main by-product of anaerobic digestion. Biogas is an attractive option of cheap substrate capable of achieving reasonable rates of nitrate removal. In this study, methane was used as energy and carbon source for biological denitrification under anoxic conditions. During 152 days, a reactor with capacity of 2.5L was fed with synthetic (denitrifying) water and a concentration of 35 mg/l of N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Pure methane (99.0%) was introduced to the system until reaching a partial pressure of 4.41lb/in<sup>2</sup>. Although the obtained denitrifying activity is low, 14.6g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*d (0.61g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*h) it may be concluded that it is feasible to use methane as carbon source and energy for wastewater denitrification.*

**Palabras Clave: Anóxico, desnitrificación, metano, nitratos, tratamiento de aguas residuales.**

## **INTRODUCCION**

Las actividades industriales, comerciales, agrícolas y domésticas son fuentes generadoras de aguas residuales, las cuales presentan características físicas, químicas y biológicas tan diversas como las materias primas y los productos involucrados en tales actividades. El impacto negativo que pueden causar sobre el medio ambiente estas descargas incontroladas tiene implicaciones no solo ecológicas, sino también económicas y sociales cada vez más graves. Debido a esto, el control de las descargas, la remoción y la disposición adecuada de las aguas residuales, ha tomado un papel relevante dentro del campo del control ambiental. Esto hace necesario recolectar los residuales para darles un tratamiento efectivo antes de devolverlas al ambiente. Además en muchos casos las aguas residuales tratadas pueden ser reusadas en la agricultura y la industria.

El nitrógeno es uno de los principales contaminantes comúnmente encontrados en aguas residuales, con impactos potencialmente importantes en cuerpos de agua (ríos, lagos, lagunas etc.). Este elemento presenta diferentes formas contaminantes al ser humano como el amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), amoníaco (NH<sub>3</sub>) nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

Los procesos biológicos ofrecen alternativas potenciales a los relativamente costosos y en algunas veces ineficientes procesos de tratamiento fisicoquímicos para la eliminación de especies nitrogenadas. Estos procesos han sido usados por años en el tratamiento de aguas, son altamente selectivos para remover nitrato y la eficiencia del proceso es muy alta. Tienen el inconveniente de requerir una fuente de carbono orgánico (sustrato) para que se lleve a cabo.

En 1994 Morgan-Sagastume *et al.* desarrollaron el Sistema Anaerobio- Anóxico-Aerobia (Sistema triple A) para la remoción de nitrógeno. La diferencia del triple A con otros sistemas radica en que la mayoría poseen un sistema de remoción de nitrógeno en lodos activados con zona anóxica, esto genera el uso de sedimentadores y de recirculación de lodos lo cual eleva el costo del sistema de tratamiento.

En el proceso triple A, el agua residual entra al reactor anaerobio en donde se elimina el 60-80% del contenido de materia orgánica y se transforma el nitrógeno orgánico en amoniacal. El agua evacuada se mezcla con la corriente de recirculación proveniente del tercer reactor (nitrificador), la

cual contiene nitrógeno oxidado en forma de nitratos principalmente. En el segundo reactor, los nitratos son transformados en nitrógeno molecular que es inocuo al medio ambiente y se consume el contenido de materia orgánica biodegradable evacuada por el reactor anaerobio. El nitrógeno amoniacal que pasa sin cambios a través de este reactor se oxida a nitratos en el tercer reactor y al ser recirculados al reactor desnitrificador se convierten en nitrógeno molecular y así se entrega un agua tratada con un mínimo de compuestos nitrogenados. Este arreglo puede ser complementado con un segundo reactor desnitrificador (cuarto de la serie), con el fin de incrementar la eficiencia de remoción del nitrógeno sobre un 95%.

Quezada *et al.*, (1993) implementaron una sencilla metodología en lote que permitió observar la actividad desnitrificante de los microorganismos presentes en un lodo usando metano como única fuente de carbono y energía. Probaron 4 diferentes temperaturas (13, 20, 27 y 30°C) y 16 concentraciones de nitrato (16, 20, 30, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 140, 150, 200, 250, 300, 400 y 500 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L). Los resultados mostraron que es factible utilizar metano como donador de electrones en el proceso de desnitrificación aun cuando las tasas fueron bajas (0.16 a 0.52 mg de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L\*h) comparadas con las que se reportan usando metanol.

En este contexto, y considerando los trabajos publicados sobre el tema (Davies, (1973), Mason, (1977), Sollo *et al.*, (1976), Rhee y Fuhs (1978), Werner y Kayser (1990), Wisotzky y Bardtke (1992), Quezada *et al.*, (1993), Thalasso *et al.*, (1997), Houbron *et al.*, (1999), Rajapakse y Scutt (1999), Costa *et al.*, (2000), Eisentraeger *et al.*, (2001), Islas-Lima *et al.*, (2004), Gavazza dos Santos *et al.*, (2004), Khin y Annachatre (2004), Waki *et al.*, (2005), Cuba y Foresti (2006) y Modin *et al.*, (2008)), pero sobre todo por la discrepancia existente en la necesidad o no de adicionar pequeñas cantidades de oxígeno durante el desarrollo del proceso, se considera importante definir claramente si el metano puede ser usado como la única fuente de carbono para llevar a cabo la desnitrificación biológica ya sea en ausencia o presencia de oxígeno. Las implicaciones son importantes, ya que en ciertos procesos de tratamiento, como el descrito anteriormente (Sistema triple A), el metano es un subproducto que puede ser aprovechado en la desnitrificación, sin costos adicionales de operación por motivo de un reactivo como metanol.

Termodinámicamente la oxidación del metano con el nitrato como aceptor de electrones es favorable como lo muestra la reacción de la Reacción (1):



El objetivo de este trabajo es determinar si el metano puede ser usado como única fuente de carbono y energía en un proceso de desnitrificación biológica.

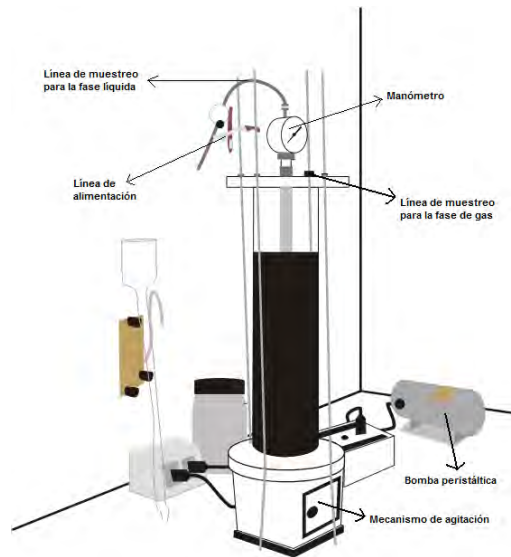
## METODOLOGIA

Para caracterizar el inóculo desnitrificante se hicieron las siguientes pruebas: Sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), sólidos suspendidos fijos (SSF), índice volumétrico de lodos (IVL) y velocidad de sedimentación (VS) conforme a los métodos descritos en APHA-AWWA-WPCF, (1989). Además se realizaron cinéticas de desnitrificación para comprobar la efectividad de estos lodos para remover nitratos.

### Descripción del dispositivo experimental

El dispositivo experimental consistió en un reactor cilíndrico de vidrio de 40cm de altura y 9cm de diámetro cerrado herméticamente con capacidad nominal de 2.5L. La tapa tenía insertado un manómetro de 2 pulgadas de carátula con entrada inferior de ¼ de pulgada, rango de 0 a 1 atmósfera (0 a 14.5 lb/pulgada<sup>2</sup>) marca METRON MR además de una entrada para alimentación y una toma de muestra como se puede observar en la figura 1. En la parte central de la tapa había un dispositivo para tomar la muestra de la fase gaseosa. Para homogenizar el sistema se usó una parrilla agitadora Cole - Parmer y dentro del reactor se colocó una barra agitadora de teflón modelo polygon de 2 x 3/8 de pulgada marca spinbar.

El reactor fue operado por un periodo de 152 días. Durante los primeros 82 días de operación, la toma de muestra y la alimentación se realizó diariamente. Después de este periodo, y debido a la baja velocidad de remoción de nitrato observada en el sistema, posterior al día 83 de operación, se optó por realizar el seguimiento de la fase líquida cada semana y cada tercer día de la fase gas pero siguiendo la presión interna del sistema de manera diaria con la finalidad de tener disponible el metano en la fase líquida para que los microorganismos pudieran usarlo como sustrato.



**Figura 1: Reactor desnitrificante.**

Se colocó 1 litro de lodo anóxico (2.88 g/L de SSV) y 1 litro de medio desnitrificante propuesto por Timmermans y Van Haute (1983) con el objeto de ocupar 2 litros del volumen del reactor. El reactor fue alimentado con 35 mg/L  $\text{N-NO}_3^-$  y después de cada toma de muestra se introdujo al reactor medio desnitrificante para ajustar la concentración de nitratos y mantener constante el volumen de trabajo en el sistema. Se cambió la atmósfera interna del reactor por metano durante 5 minutos (500 mL de volumen del reactor) de la siguiente forma: con una aguja de jeringa adaptada a una manguera que se conectó a un tanque de metano, se introdujo una corriente de gas a una presión de  $0.3 \text{ kg/cm}^2$  ( $4.41 \text{ lb/pulgada}^2$ ) la cual era evacuado con una segunda aguja de jeringa colocada en la parte superior del reactor. Terminado el tiempo para el cambio de atmósfera se retiró la aguja de jeringa y se incrementó la presión interna con metano hasta  $8 \text{ lb/pulgada}^2$  ( $0.56 \text{ kg/cm}^2$ ) medida con un transductor de presión Cole Palmer con rango de 0 – 15  $\text{lb/pulgada}^2$ .

Seguimiento de la fase líquida. Para la realización de las pruebas fisicoquímicas (Tabla 1), se tomaron 10 mL de muestra de la fase líquida con la ayuda de una jeringa adaptada a la línea de muestreo del reactor (Figura 1). Seguimiento de la fase gaseosa. Durante el primer mes se tomaron muestras diarias de la fase gas y posteriormente una vez por semana, antes de tomar la muestra líquida, para cuantificar la concentración de metano presente en el reactor. Se inyectaron 0.4 mL del gas en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (Fisher gas partitioner modelo 1200) de doble columna (Porapak Q y malla molecular SA), la temperatura de la columna se mantuvo a  $50^\circ\text{C}$  la corriente del puente a 150mA y el atenuador en 4. Se empleó helio como gas acarreador a un flujo de 25 mL/min. Posterior a la toma de muestra y a la alimentación del reactor se reinyectaba metano para recuperar la presión inicial del reactor. Con los datos obtenidos se calculó la concentración de metano disuelto dentro del reactor la cual se mantuvo alrededor de 206 mg/L.

La actividad de los microorganismos se calculó dividiendo la tasa máxima de desnitrificación ( $\text{mg N-NO}_3^-$  removidos por unidad de tiempo) entre la cantidad de SSV en el reactor la cual se expresa como  $\text{mg N-NO}_3^- / \text{g SSV} \cdot \text{d}$ .

**TABLA 1: Parámetros analizados durante el monitoreo del digestor anóxico**

<i>Parámetro</i>	<i>Método</i>	<i>Frecuencia</i>
Nitratos	Espectrométrico ultravioleta selectivo y RQ-Flex	Cada semana
Nitritos	RQ-Flex	Cada semana
Nitrógeno amoniacal	APHA,AWWA,WPCF (1989)	Cada semana
Nitrógeno total	APHA,AWWA,WPCF (1989)	Cada semana
SST, SSV, SSF	Gravimétrico	Cada semana
Metano en fase gas	Cromatógrafo	Cada tercer día
Presión en el reactor	Manómetro y transductor	Diario
Alcalinidad	APHA,AWWA,WPCF (1989)	Cada semana
pH	Potenciométrico	Cada semana

### **Pruebas Microbiológicas**

Con la finalidad de dar seguimiento a los microorganismos presentes en el inóculo desnitrificante se llevaron a cabo pruebas microbiológicas usando diferentes fuentes de carbono (glucosa, etanol y metano) al inicio en la parte intermedia y al final de la fase experimental.

### **Número más Probable (NMP). Prueba presuntiva, Tinción de Gram y Prueba de la Catalasa.**

NMP. En series de tres tubos serológicos con campana de Duham se colocaron 9 mL medio desnitrificante y se inocularon con 1 mL (2.88 g/L SSV) de lodo desnitrificante. La glucosa y el etanol fueron agregados en el medio desnitrificante y el metano inyectado por los septos de las tapas de los tubos por medio de jeringas todos a una relación C/N = 1:1.5.

Tinción diferencial de Gram. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita en APHA-AWWA-WPCF, (1989).

Prueba de Catalasa. Se colocó una gota de inóculo en un vidrio de reloj y se puso en contacto con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## **RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN**

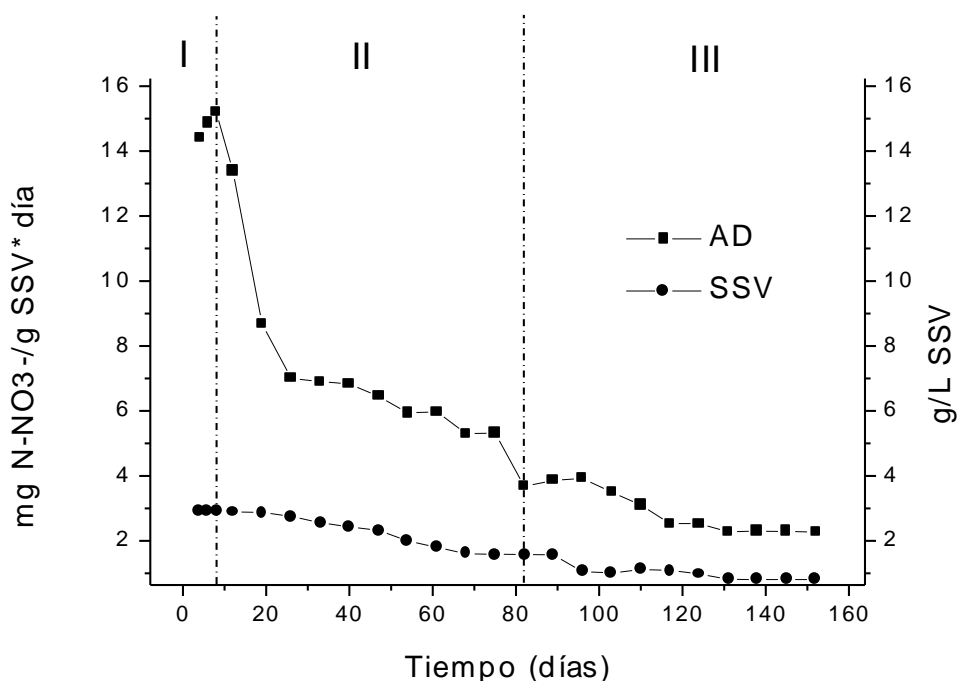
Los resultados de la caracterización del inóculo obtenido para esta experimentación (índice volumétrico de lodos (IVL), velocidad de sedimentación (VS) y sólidos suspendidos en sus tres formas) se muestran en la tabla 2. Estos valores indican que se trata de un lodo floculento con buena capacidad de sedimentación.

**TABLA 2: Valores del IVL y VS del inóculo desnitrificante**

Parámetros	Lodo anóxico
Sólidos suspendidos totales (SST).	3.9 g/L (100%)*
Sólidos suspendidos volátiles (SSV).	2.9 g/L (74.1%)*
Sólidos suspendidos fijos (SSF).	1.0 g/L (25.9%)*
Índice volumétrico de lodos (IVL).	283 mL/g*
Velocidad de sedimentación (VS).	5.0 m/h*

\*Los valores son el promedio de tres replicas.

El dispositivo experimental fue operado por 152 días; en la figura 2 se observa que al inicio del experimento (primera semana Fase I) hubo una relativamente alta Actividad Desnitrificante (AD), la cual se atribuye a la presencia del carbono exógeno (glucosa) con que fue adaptado previamente el lodo. Una vez que el sustrato remanente fue consumido por los microorganismos, en el día 15 se adicionó metano, observándose una reducción de la AD. A partir de ese día, la AD obtenida puede atribuirse al consumo de carbono endógeno (lisis celular) lo que se refleja en la disminución de SST y SSV (3.9 g/L a 1 g/L y 2.9 g/L a 0.81 g/L respectivamente). A pesar de que termodinámicamente la desnitrificación con metano es posible ( $\Delta G = -849.3$  KJ/reacción), esta no se desarrolló adecuadamente pues la actividad desnitrificante obtenida fue de 14.6g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*d (0.61g N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/g SSV\*h).



**Figura 2.** Actividad desnitrificante y comportamiento de los sólidos suspendidos volátiles con respecto al tiempo.

Estos resultados concuerdan con algunos de los trabajos realizados en el tema donde sugieren que es necesario previo a la adición de metano como fuente de carbono y energía asegurar el consumo de todo el carbono exógeno presente (Davies (1973), Werner & Kayser (1991), Houbroun *et.al.*, (1999), Rajapakse & Scutt (1999), Eisentraeger *et.al.*, (2001), Gavazza dos Santos *et.al.*, (2004), Khin & Annachatre (2004) y Waki *et.al.*, (2005).



Para verificar si el sustrato estaba disponible para las bacterias desnitrificantes se hicieron pruebas microbiológicas (NMP) variando la fuente de carbono: glucosa, etanol y metano empleando campanas de Duham para detectar la producción de gas ( $N_2$ ) en el medio.

Los resultados de las pruebas de número más probable resultaron positivos a todas las diluciones para los tubos a los que se suministró glucosa y etanol como fuente de carbono y negativas para todos los tubos a los que se les inyectó metano como fuente de carbono.

Con los resultados microbiológicos obtenidos puede asegurarse que el metano estaba poco disponible en el medio líquido para ser usado como fuente de carbono por las bacterias desnitrificantes presentes o que no se podía dar la reacción a esas condiciones. Para mejorar este problema se deben implementar mecanismos que favorezcan la solubilidad del metano en el medio líquido para aumentar su contacto con los microorganismos.

La bibliografía reporta que las bacterias desnitrificantes son positivas a la prueba de Catalasa y a la tinción de Gram. Al realizar estas sencillas pruebas al inóculo el resultado fue positivo para ambas.

Los trabajos realizados hasta el momento concluyen que el metano puede ser usado como fuente de carbono para la desnitrificación biológica pero las condiciones de operación no han sido establecidas.

Algunos de los trabajos publicados concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo. Davies (1973), Rhe & Fuhs (1978) y Quezada *et. al.*, (1993), concluyen que si es posible desnitrificar con metano aún cuando las tasas de remoción son bajas.

Las concentraciones de  $N-NO_3^-$  usadas en los trabajos reportados van de 20 a 50 mg/L de  $N-NO_3^-$  lo que da pauta para implementar este tipo de sistemas de tratamiento en aguas con bajo contenido de nitratos. Así mismo la temperatura que manejan entre 25° y 30 °C lo cual esta reportado como ideal por Quezada *et. al.*, (1993) ya que a 30°C obtuvo la máxima actividad desnitrificante.

Werner & Kayser (1991), Thalasso *et. al.*, (1997), Houbron *et. al.*, (1999), Rajapakse & Cutt (1999), Costa *et. al.*, (2000), Eisentraeger *et. al.*, (2001), Islas *et. al.*, (2004), Gavazza dos Santos *et. al.*, (2004), Khin & Annachhatre (2004), Waki *et. al.*, (2005) y Cuba & Foresti (2006) obtuvieron tasas de remoción de bajas a moderadas pero estudiaron la influencia del oxígeno el cual parece jugar un papel importante en el proceso de desnitrificación. En efecto, podría ser necesaria una etapa de oxidación previa del metano por medio de bacterias metanotróficas a metanol u otro metabolito de más fácil asimilación para las bacterias desnitrificantes).

Para establecer las bases que ayuden a resolver la controversia del mecanismo de acción del metano debe aclimatarse el lodo que va a servir como inóculo esto con la finalidad de eliminar cualquier traza de carbono remanente que influya en la actividad desnitrificante del sistema. El medio sintético también debe estar libre de cualquier fuente de carbono externa. Davies (1973), Quezada *et. al.*, (1993), Thalasso *et. al.*, (1997), Houbron *et. al.*, (1999), Eisentraeger *et. al.*, (2001), Islas *et. al.*, (2004) Khin & Annachhatre (2004) y Waki *et. al.*, (2005) pretrataron el inóculo durante periodos de tres días a seis meses con metano.

En todos los trabajos se reporta deficiencia en el fenómeno de transferencia de masa (disponibilidad de metano) lo cual conlleva a un déficit de sustrato en el medio.

Las condiciones de operación del sistema así como los parámetros evaluados juegan un papel sumamente importante ya que estos permitirán establecer el mecanismo de acción del metano así como el rol de la concentración y presencia de oxígeno en el medio. En los trabajos presentados estas condiciones varían ampliamente.

El dispositivo experimental usado en esta investigación debió ser controlado de manera más estricta. El inóculo obtenido debió caracterizarse de manera microbiológica para establecer si los grupos desnitrificantes y metanotróficos estaban presentes en el mismo. El metano introducido al sistema solo fue cuantificado por la presión interna del reactor y en la fase gaseosa del sistema pero no en la fase líquida del mismo. Lo mismo debió implementarse para el oxígeno. Si bien ambos compuestos fueron adicionados de manera a que estuvieran disponibles en las concentraciones requeridas, esto no fue determinado de manera global para cerrar el balance del sistema.

## CONCLUSIONES

El objetivo planteado en esta investigación se cumplió parcialmente ya que no se logró establecer premisas sólidas que ayuden a resolver la controversia si el metano puede o no ser usado como donador de electrones en el proceso de desnitrificación biológica, independientemente de que haya o no oxígeno suficiente para oxidarlo y hacerlo más accesible a los microorganismos responsables de transformar los nitratos en nitrógeno molecular. Los trabajos reportados difieren en sus resultados dejando una línea de investigación por demás interesante aún por investigar debido a que el metano por ser el principal subproducto de la digestión anaerobia; es una opción por demás atractiva para contar con un sustrato barato y del que se obtengan altas tasas de remoción de nitrato.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- APHA-AWWA-WPCF. (1989). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 16<sup>th</sup> edition. American Public Health Association. Washington D.C. E.U.A.
- Costa C.; Dijkema C.; Friedrich M.; García-Encina P; Fernández-Polanco F and Stams J.M. (2000) Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 754-762
- Cuba R M F y Foresti E (2006) Utilização do metano como doador de elétrons para remoção de nitrogênio via nitrificação e denitrificação em reator aerobio/anoxico operado em batelada sequencial. *Anais do I Seminário do Projeto Temático: Desenvolvimento de sistemas combinados de tratamento de águas residuárias visando a remoção de poluentes e a recuperação de energia e de productos dos ciclos de carbono, nitrogênio e enxofre*. Universidad de São Paulo, Brasil. 11 a 13 de diciembre 2006 . Págs:184-191
- Davies, T.R. (1973). Isolation of bacteria capable of utilizing methane as a hydrogen donor in the process of denitrification. *Water Research* 7:575-579
- Diario Oficial de la Federación, (1997), *Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996*, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. 01 de junio de 2007. Págs: 5-6
- Eisentraeger A; Klag P; Vansbotter B; Heymann E and Dott W. (2001) Denitrification of groundwater with methane as sole hydrogen donor *Water Research* 35 (9): 2261-2267
- Gavazza dos Santos S, Amâncio Varesche M B, Zaiat M and Foresti E (2004) Comparison of methanol, ethanol and methane as electron donors for denitrification *Environmental Engineering Science* 21 (3): 313-320
- Houbron E; Torrijos M and Capdeville B (1999) An alternative use of biogas applied at the water denitrification. *Water Science and Technology* 40(8): 115-122
- Islas-Lima S; Thalasso F and Gómez-Hernández J (2004) Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Research* 38: 13-16
- Khin T. and Annachhatre A.P. (2004) Nitrogen removal in a fluidized bioreactor by using mixed culture under oxygen-limited conditions. *Water Science and Technology*. 50(6):313-320
- Mason, I. (1977). Methane as carbon source in biological denitrification, *Journal WPCF*. 49: 855-857
- Modin O, Fukushi K, Nakajima F y Yamamoto K (2008). Performance of membrane biofilm reactor for denitrification with methane. *Bioresource Technology*. Vol. 99. Pág: 8054-8060
- Morgan-Sagastume, JM; Jiménez, B. and Noyola A. 1994. Anaerobic-Anoxic-Aerobic Process with Recycling and Separated Biomass for Organic Carbon and Nitrogen Removal from Wastewater. *Environmental Technology*. Vol 15: 233-243
- Quezada, C.M, Moreno, R.G., y Noyola, R,A, (1993). Desnitrificación: Prueba en lote con Metano como fuente de carbono y energía. *IX Congreso Nacional. I Congreso Internacional de AIDIS de Norteamérica y del Caribe*. México, D.F. Págs; 152-157

- Rajapakse J and Scutt J (1999) Denitrification with natural gas and various new grown media. *Water Research* 33 (18): 3723-3734
- Rhee, G. and Wolfgang, F.G. (1978). Waste water denitrification with one-carbon compounds as energy source. *Journal WPCF*. Pag's: 2111-2119
- Sollo, F. W., Müller, H.F. and Larson, T.E. (1976). Denitrification of wastewater effluents with methane. *Journal WPCF* 48(7):1840-1842
- Thalasso, A. F, Vallecillo, P. García-Encina and Fdz-Polanco. (1997). The use methane as a sole carbon source for water denitrification. *Water Research*. 31:55-60
- Timmermans, P. and Van Haute, A. (1983) Denitrification with methanol. *Water Research*. Vol 17(10):1249-1255
- Waki, M; Suzuki, K; Osada T and Tanaka, Y. (2005) Methane-dependent denitrification by a semi-partitioned reactor supplied separately with methane and oxygen. *Bioresource Technology* 96: 921-927
- Werner, M. and Kayser, R. (1991). Denitrification with biogas as external carbon source. *Water Science and Technology* 23(4-6):701-708
- Wisotzky, R. and Bardke, D. (1992). Denitrification of drinking water with methane as electron donor. *gwf-Wasser/Abwasser* 133(10): 550-556