

# EVALUACIÓN DE REMOCIÓN AUTOTRÓFICA DE NITRÓGENO EN UN BIOREACTOR DE MEMBRANAS COMO POST-TRATAMIENTO EN LA LÍNEA LÍQUIDA PRINCIPAL

**Bruno Bicudo Pérez**

UNESCO-IHE (Países Bajos): Trabajo de tesis de maestría en Ingeniería Sanitaria, curso 2013-2015.

Avda Rivera 2476/001 - Montevideo - CP 11300- Uruguay. Tel +598 9281 6080  
e-mail: [brusbicudo@hotmail.com](mailto:brusbicudo@hotmail.com)



## RESUMEN

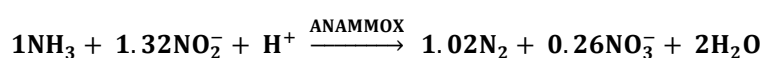
El objetivo del estudio fue la remoción de nitrógeno de aguas residuales (municipales o industriales con bajo tenor de amonio), mediante tratamientos de punta tendientes a reducir el consumo de oxígeno y/o energía. Se utilizó el proceso ANAMMOX para la remoción autotrófica de nitrógeno, que emplea un grupo de bacterias anaeróbicas de muy lento crecimiento descubiertas recientemente, capaces de producir  $N_2$  gaseoso utilizando amonio y nitrito como sustratos. La producción de nitrito se desarrollaría en la misma unidad mediante nitrificadores, por lo cual no sería necesario recircular el agua entre reactores aeróbicos y anóxicos. En contraste con la desnitrificación convencional, este proceso no requiere la oxidación completa del amonio a nitrato, ya que solo la mitad del amonio debe ser oxidado a nitrito. La unidad utilizada fue un bioreactor de membranas (MBR) por no permitir el escape de biomasa, y se lo alimentó con efluente sintético sin materia orgánica y con bajo amonio ( $60\text{mg/L-N}$ ). Dado que las nitrificadoras son aeróbicas, se trató con diferentes patrones de aireación para posibilitar la coexistencia de ambas especies. A su vez, se inhibió con éxito a otros grupos de organismos (oxidantes de nitrito) mediante cambios en el pH y bajas concentraciones de oxígeno (inferiores a 2% de saturación). Una vez enriquecida la población del reactor con oxidantes de amonio, la nitrificación parcial se vuelve robusta. Al agregar ANAMMOX, los resultados no son los esperados; las oxidantes de amonio cambian su metabolismo en respuesta al estrés de oxígeno y producen especies reducidas de nitrógeno ( $NO$ ,  $N_2O$ ) que inhiben y/o intoxican al grupo anaeróbico. El escape de especies gaseosas nitrogenadas (algunas de ellas con valor comercial) alcanzó 70% de la carga influente de nitrógeno.

**Palabras Clave:** ANAMMOX, desnitrificación, MBR

## Introducción

Muchos países en vías de desarrollo, en especial aquellos con climas cálidos, han favorecido los tratamientos biológicos anaeróbicos, como las lagunas o los reactores UASB para tratar aguas municipales e industriales. No obstante, sin combinarlos con un tratamiento aeróbico, su eficiencia para remover nutrientes es baja (7-20%) aunque considerable en términos de DQO (50-85%). La carga de sólidos en estos efluentes puede ser significativa (30-50mg/L para el UASB), requiriendo sedimentadores. El reúso de estas aguas para procesos industriales (por su turbiedad y presencia de micro-organismos) rara vez es posible. Se buscó un proceso, que siguiendo a un tratamiento anaeróbico, pudiese eliminar el nitrógeno, los sólidos y los microorganismos del agua residual en una única etapa, y al mismo tiempo reducir el consumo de energía.

Para esto, se utilizó un bioreactor de membranas (MBR), en el cual se desarrollaría simultáneamente la oxidación incompleta de amonio a nitrito (nitritación) mediante organismos oxidantes de amonio (OOA) y la oxidación anaeróbica de amonio (ANAMMOX- Ecuación 1).



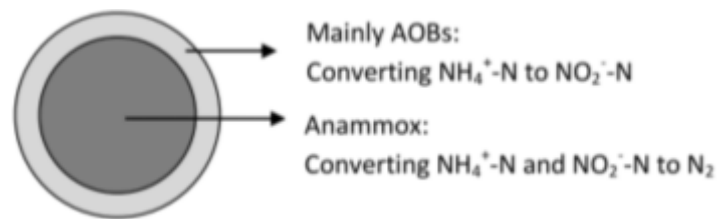
**Ecuación 1- Reacción ANAMMOX (Third et al. 2001).**

Los organismos ANAMMOX (ANAerobic AMMonium Oxidation) pertenecen al orden de los Planctomycetes, y presentan la particularidad de que bajo condiciones anaeróbicas, oxidan amonio directamente a gas nitrógeno usando nitrito como aceptor de electrones (Ecuación 1). Su tasa de crecimiento es marcadamente baja, con tiempos de duplicación que oscilan entre 5 y 17 días (Van der Star et al. 2007, Egli et al. 2001). El proceso ofrece un reducido consumo de energía y una alta remoción de nitrógeno, con una muy baja producción de lodo, convirtiéndolo en una alternativa tentadora a la nitrificación/desnitrificación convencional. Según la Ecuación 1, la demanda de oxígeno para la remoción de 1 gramo de amonio mediante el proceso ANAMMOX implica la nitritación de solo 0.55g de amonio (los restantes 0.45g serán tomados directamente), requiriendo 1.87g de oxígeno. No obstante, si se considera la recuperación de oxígeno por la producción de nitrato (0.34g de oxígeno equivalente), el proceso global consume 1.53g de oxígeno por gramo de nitrógeno eliminado, reduciendo el consumo de oxígeno en 12%.

Para que el proceso se lleve a cabo, el nitrito debe estar presente en el agua a tratar, junto con el amonio. No obstante, rara vez se tienen concentraciones significativas de nitrito en aguas residuales, por lo que para remover nitrógeno mediante ANAMMOX, el nitrito se debe agregar o producir en cantidades considerables (Cho, et al., 2011). Esto se ha conseguido principalmente mediante la oxidación de amonio usando organismos oxidantes de amonio (OOA) en reactores de configuraciones variadas.

Se debe tener en cuenta que las bacterias ANAMMOX son consideradas anaeróbicas estrictas, ya que concentraciones de O.D tan bajas como 0.05mg/L fueron reportadas como inhibitorias (Strous, et al., 1999; Jetten, et al., 2006). No obstante, Cho, et al., (2011) sugiere que incluso con concentraciones de O.D tan bajas como 0.05mg/L, poblaciones de OOA como las Nitrosomonas, son aún capaces de oxidar parcialmente el amonio a nitrito, produciendo el medio ambiente adecuado para ambos grupos. Este argumento ya había sido contemplado por Kuai y Verstraete, (1998) quienes enfatizan la importancia de controlar el O.D. en el interior del reactor, no solo para impedir la inhibición de los ANAMMOX, sino para evitar la oxidación de más de 50% del amonio a nitrito. Una particularidad de estos organismos es su tendencia natural a formar gránulos o biopelículas, que son también colonizados por OOA en su capa externa. De esa forma, estos últimos consumen el oxígeno (protegiendo a las ANAMMOX) al tiempo que les suministran el nitrito normalmente ausente en el agua residual. De esta forma, los reactores operados con gránulos, pueden trabajar con

concentraciones de OD de hasta 15% sin reportar inhibición. El cultivo de ANAMMOX en condiciones de células libres es raramente practicado, lo que se evidencia en la escasa bibliografía disponible al respecto.



**Figura 1 \_ Configuración típica de un granulo ANAMMOX (Cui 2012)**

Es importante destacar que desde su implementación a escala industrial, el ANAMMOX ha sido usado exclusivamente como tratamiento lateral, en aguas de rechazo de digestores, típicamente cálidas y con concentraciones de amonio de 2000mg/L o más (Yenigün and Demirel, 2013). Si bien existen procesos que logran con éxito esta reacción (SHARON+ANAMMOX, CANON), ninguno lo hace en una única etapa de forma continua, ni con baja concentración de amonio. Dado que las OOA son aeróbicos, y las ANAMMOX anaeróbicas, trabajar en condiciones micro aeróbicas se vio como la clave para la coexistencia de ambos grupos.

Estos argumentos, junto con la poca información disponible respecto al crecimiento del ANAMMOX como células libres, son lo que motiva el presente estudio.

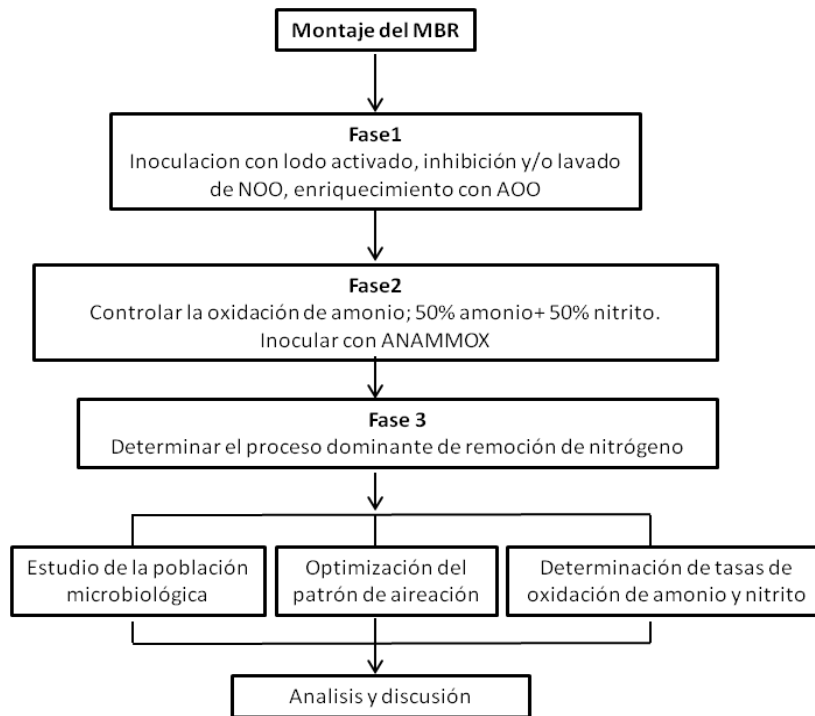
## Metodología

El experimento se lleva a cabo durante 120 días en un reactor de laboratorio, de 10L de volumen dotado de una membrana de ultrafiltración de fibra hueca. El inóculo utilizado fue lodo activado fresco, recolectado en la planta de tratamiento de aguas residuales de Harnaspolder, próxima a la ciudad de Delft (Holanda). La concentración de sólidos del inóculo era de 2.35g/L, con una fracción volátil de 76%.



**Figura 2 \_ Configuración experimental**

Se dosifica una solución líquida de efluente sintético, libre de orgánicos y con una concentración de amonio de 60mg/L-N. Se cuenta con sensores de OD, sistema de control de pH, termómetro y bombas de extracción de licor mezcla, conectados a un biocontrolador programable. La temperatura de trabajo será ambiente y el tiempo de retención celular se fijó en 15 días. Los niveles de oxígeno y de pH son ajustados durante las distintas fases del experimento. Diariamente se miden en el interior del reactor las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ . Esporádicamente se miden SST y SSV, y se recolectan muestras del gas emitido, que se analizan en un cromatógrafo de gases. Se realizaron frecuentes ensayos FISH (Hibridación Fluorescente In-Situ) para determinar la evolución de la población microbiana.



**Figura 3 - Metodología utilizada**

## Resultados

Durante la Fase 1, se consigue controlar el oxígeno para obtener una producción sostenida de nitrito, libre de amonio y de nitrato, demostrando que las poblaciones de organismos oxidantes de nitrito (OON) fueron inhibidas. Esto se verifica con una prueba FISH el día 71, donde la población se compone casi totalmente de OOA, momento en el cual la concentración de oxígeno es inferior al 2%.

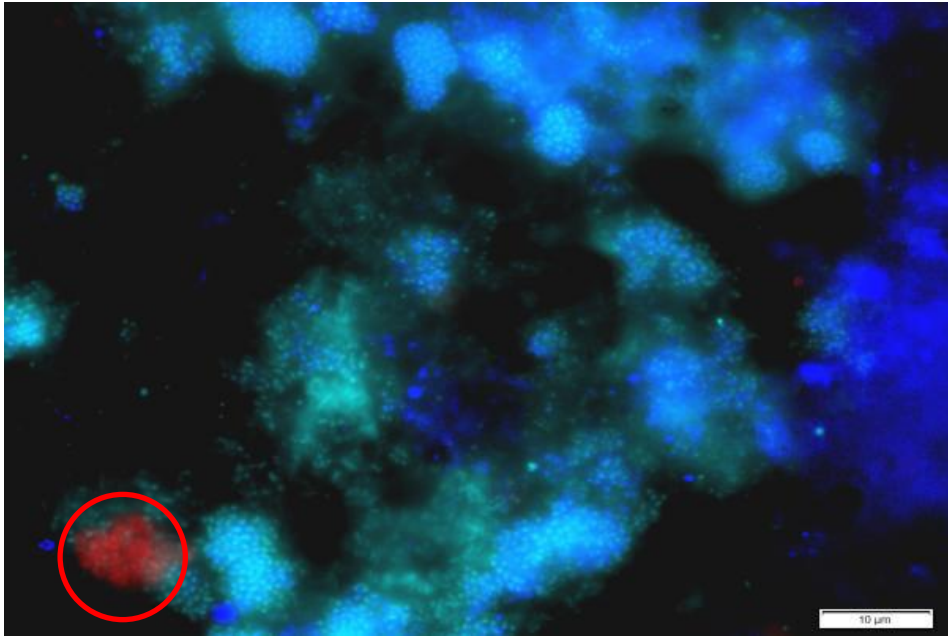


Figura 4 – Análisis FISH día 71. (OOA en azul, OON en círculo rojo)

Se agrega entonces el inoculo de ANAMMOX, compuesto de *Brocadia Fulgida*, comenzando así la Fase 2. Durante esta fase, al no verse una disminución en el N-total, se restringe aún más el OD, sin éxito, llegando a inhibir incluso a los OOA, tras lo cual se cambia el patrón de oxigenación, a una oxigenación cíclica (Fase 3). De esta forma, se intenta favorecer en los intervalos aireados a los OOA para la producción de nitrito, y a los ANAMMOX durante los períodos anaeróbicos, para la eliminación del nitrito último junto con el amonio. Lo observado fue una fuerte caída en el N-total, aún cuando la población de ANAMMOX se mostró inactiva.

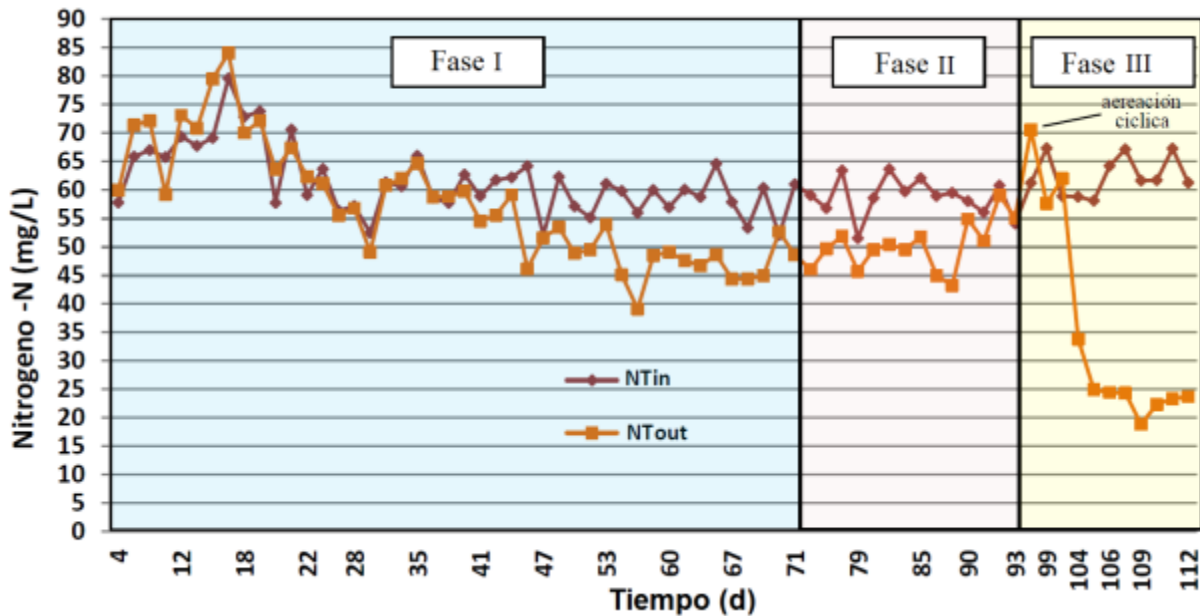


Figura 5 – Serie completa de Nitrógeno total en el influente y efluente para las tres fases

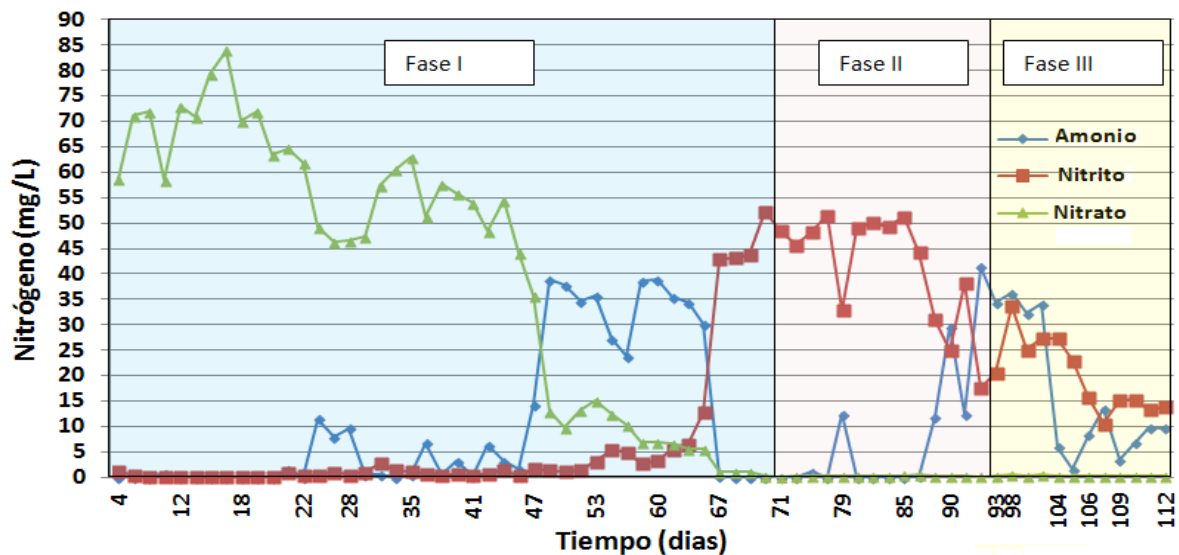


Figura 6 - Serie completa de datos de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  para las tres fases

Lo llamativo de la tercera fase es que a pesar de la fuerte caída en el N total, los estudios FISH no muestran ninguna actividad ANAMMOX, y tampoco hay una producción de nitrato detectable, como hubiese sido esperable según la Ecuación 1. Durante esta última fase, varios análisis en cromatógrafo de gases demostraron la liberación de altas concentraciones de especies reducidas de Nitrógeno, indicando que el estrés de oxígeno llevó a los OOA a un cambio en su metabolismo, produciéndose la llamada "**desnitrificación por nitrificadores**". Durante este proceso, los OOA por sí mismos llevan a cabo la oxidación de amonio a hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) y luego a nitrito, para reducirlo a especies como  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y finalmente nitrógeno gaseoso.

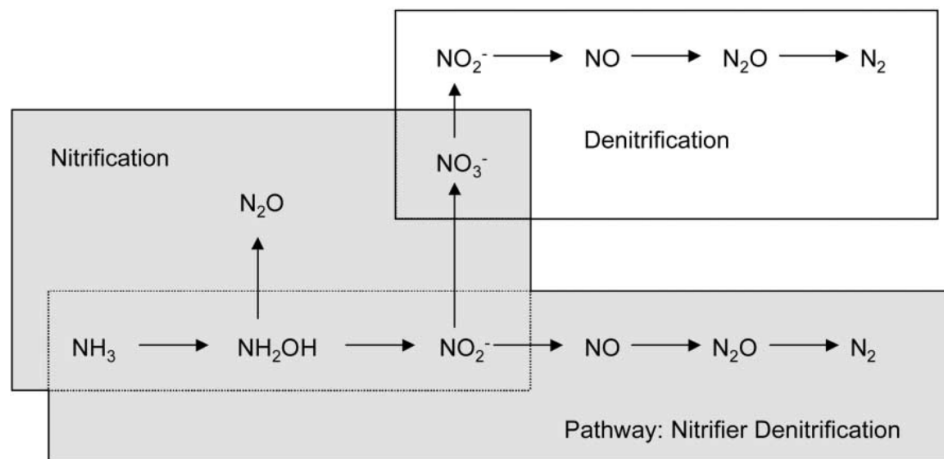
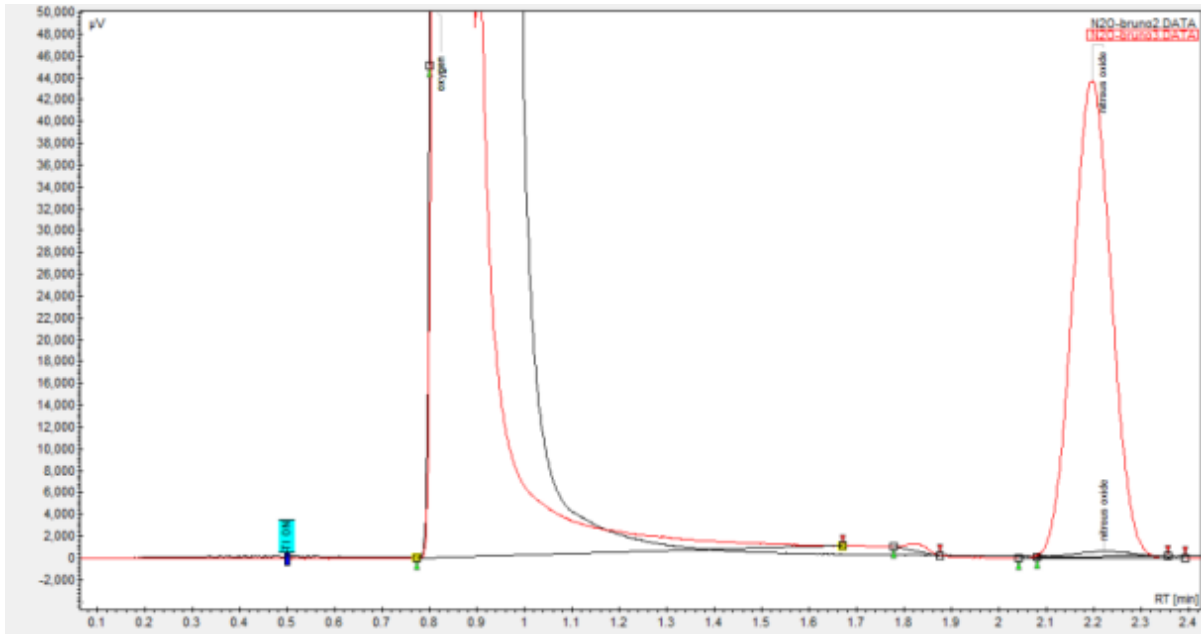


Figura 7 – Desnitrificación por nitrificadores (Wrage, et al., 2001)

Este proceso fue señalado como responsable de la intoxicación de los ANAMMOX y posiblemente de los OON dado que libera monóxido de nitrógeno, un gas con conocidas propiedades tóxicas.



**Figura 8 – Cromatografía de gases, emisión recolectada día 109 (rojo), aire atmosférico (negro)  
El pico izquierdo representa el oxígeno, el derecho el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O).**

El óxido nitroso (gas hilarante - N<sub>2</sub>O) es un gas que normalmente existe en la atmósfera en concentraciones de 300ppb. En la industria tiene múltiples aplicaciones; propelente en la fabricación de alimentos, fuente alternativa de oxígeno para la fabricación de semiconductores, potenciador de motores de combustión y de cohetes espaciales, y anestésico en la medicina y la odontología (<http://www.airliquide.com>). Es también un potente gas invernadero (potencial de efecto invernadero de 320) con una vida media de 120 años (Tallec, et al., 2006; Kampschreur, et al., 2008). Por su parte, el monóxido de nitrógeno (NO) es un gas normalmente formado durante la combustión en aire, pero que se oxida rápidamente a un compuesto más estable (NO<sub>2</sub>) en presencia de oxígeno. Es altamente tóxico para una gran variedad de organismos, llegando incluso a reportar efectos mutagénicos en diversas bacterias (Zumft, 1997; Kampschreur, et al., 2008).

## Conclusiones

- Usando un tiempo de retención celular de 15 días, pH 8, temperatura ambiente, un influente con bajo amonio (60mg/L-N) y bajas concentraciones de oxígeno (inferiores a 5%), se obtuvo la nitrificación parcial, momento en el cual se constata mediante análisis químicos y microbiológicos que la población se constituye casi exclusivamente por OOA.
- Las técnicas usadas para enriquecer el reactor con OOA sobre las OON incluyen alto pH y bajo tenor de oxígeno.
- Se observó la desnitrificación por nitrificadores cuando el oxígeno cae por debajo de 0.19mg/L. Este proceso fue señalado como posible responsable de la inhibición de los organismos ANAMMOX, mediante la producción de monóxido de nitrógeno.
- La aireación cíclica, lejos de reducir la desnitrificación por nitrificadores la incrementó significativamente, alcanzando remociones de N de hasta 70% de la fase líquida.

## Referencias

Cho S, Fujii N, Lee T, Okabe S (2011) Development of a simultaneous partial nitrification and anaerobic ammonia oxidation process in a single reactor. *Bioresource Technology* 102: 652-659 DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.031>

Cui,F.(2012). Cold CANON:Anammox at low temperatures (Doctoral dissertation, Delft University of Technology).

Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, Siegrist H, van der Meer JR, Zehnder AJ (2001) Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch Microbiol* 175: 198-207

Jetten MSM, Strous M, van de Pas-Schoonen KT, Schalk J, van Dongen UGJM, van de Graaf AA, Logemann S, Muyzer G, van Loosdrecht MCM, Kuenen JG (1998) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* 22: 421-437 DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445\(98\)00023-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445(98)00023-0)

Kampschreur MJ, van der Star WRL, Wielders HA, Mulder JW, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM (2008) Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during full-scale reject water treatment. *Water Research* 42: 812-826 DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.08.022>

Kuai L, Verstraete W (1998) Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. *Appl Environ Microbiol* 64: 4500-4506

N Wrage, G.L Velthof, M.L van Beusichem, O Oenema, Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 33, Issues 12–13, October 2001, Pages 1723-1732, ISSN 0038-0717, [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00096-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00096-7).

Strous M, Van Gerven E, Zheng P, Kuenen JG, Jetten MSM (1997) Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations. *Water Research* 31: 1955-1962 DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00055-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00055-9)

Tallec G, Garnier J, Billen G, Gousailles M (2006) Nitrous oxide emissions from secondary activated sludge in nitrifying conditions of urban wastewater treatment plants: Effect of oxygenation level. *Water Research* 40: 2972-2980 DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.037>

Third KA, Sliekers AO, Kuenen JG, Jetten MSM (2001) The CANON System (Completely Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite) under Ammonium Limitation: Interaction and Competition between Three Groups of Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 588-596 DOI <http://dx.doi.org/10.1078/0723-2020-00077>

Van der Star WRL, Abma WR, Blommers D, Mulder J-W, Tokutomi T, Strous M, Picioreanu C, van Loosdrecht MCM (2007) Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox reactor in Rotterdam.

Yenigün O, Demirel B (2013) Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry* 48: 901-911 DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.012>

Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews* 61: 533-616