



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ingeniería -Programa de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con mención
en Ingeniería Química

**INTEGRACIÓN DE ETAPA AERÓBICA A REACTORES
ANÓXICOS/ANAERÓBICOS Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO
COMBINADO ANÓXICO/ANAERÓBICO/ AERÓBICO PARA EL TRATAMIENTO
DE RILES PESQUEROS**

**(INTEGRATION OF AN AEROBIC STEP TO ANOXIC-ANAEROBIC REACTORS
AND CHARACTERIZATION OF THE COMBINED
ANOXIC/ANAEROBIC/AEROBIC PROCESS FOR THE TREATMENT OF FISHING
EFFLUENTS)**

ELISA AMANDA GIUSTINIANOVICH CAMPOS
CONCEPCIÓN-CHILE
2011

Profesor Guía: Sra. Marlene Roeckel von B.
Sra. Estrella Aspé L.

Dpto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería
Universidad de Concepción

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	4
2.1 Hipótesis	11
2.2 Objetivo general	11
3. Materiales y Métodos	13
3.1. Unidad experimental	13
3.2. Inoculación de zona aeróbica:	14
3.2.1. Adherencia	15
3.2.2. Adaptación	16
3.3. Condiciones de operación	19
3.4. Análisis de perfiles axiales de compuestos nitrogenados y carbonáceos	20
3.5. Determinación de la influencia del oxígeno disuelto en el flujo recirculado	21
3.6. Tratamiento de datos	23
3.7. Análisis poblacional de reactores filtro	25
3.7.1. Muestreo	25
3.7.2. Caracterización de la microbiota	25
a) Extracción	25
b) Amplificación del gen ADNr 16S	25
c) Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE)	26
d) Análisis del patrón de bandeo	27
e) Análisis estadístico	27
4. Resultados y Discusión	28
4.1. Inoculación de zona aeróbica	28
4.2. Análisis de perfiles axiales de compuestos nitrogenados y carbonáceos	32
4.3. Determinación de la influencia del oxígeno disuelto en el flujo recirculado	38
4.4. Análisis poblacional de reactores filtro	42
4.4.1. Comunidades de Eubacterias	43
4.4.2. Comunidades de Archaeas	63
5. Conclusiones	72

6. Bibliografía	74
7. Anexos	81
A. Supuesto de Estado Estacionario	81



Índice de Figuras

Figura 1-1 Esquema del proceso combinado propuesto	6
Figura 3-1 Reactor filtro tubular donde se indican los puntos de muestreo.	14
Figura 3-2 Balance de nitrógeno total en un reactor anóxico/anaeróbico/aeróbico.	17
Figura 3-3 Curva calibración de TOC para soluciones de hidrolizado de pescado utilizado como sustrato en reactores filtro.	20
Figuras 4-1A y 4-1B A) Sólidos suspendidos volátiles y B) Recuento celular a la descarga de los reactores R-0 y R-2 durante el periodo de inoculación de la zona aeróbica.	28
Figura 4-2 Concentración de compuestos nitrogenados y carbonáceos a la descarga durante la operación de reactores filtro R-0, R-2 y R-10, sin reciclo, reciclo 2 y reciclo 10, respectivamente, alimentados con RIL pesquero.	29
Figura 4-3 Concentración de compuestos nitrogenados y carbonáceos a la descarga durante la operación de reactores filtro R-0, R-2 y R-10, sin reciclo, reciclo 2 y reciclo 10 respectivamente, alimentados con hidrolizado de pescado.	31
Figura 4-4 Perfil axial de los reactores R-0, R-2 y R-10 correspondiente a sin reciclo, reciclo 2 y reciclo 10 respectivamente, alimentados con RIL pesquero.	34
Figura 4-5 Perfil axial de los reactores R-0, R-2 y R-10 correspondiente a sin reciclo, reciclo 2 y reciclo 10 respectivamente, alimentados con hidrolizado de pescado.	35
Figura 4-6 Gel de agarosa (1.5% p/v) teñido con RedGel (0,02% v/v) mostrando producto de extracción de DNA total. Carriles 1 a 4: Muestras estratificadas del reactor R-10. Carriles 5 a 8: Muestras estratificadas del reactor R-0. Carriles 9 a 12: muestras estratificadas del reactor R-2. MP: marcador de peso molecular.	42

Figura 4-7	42
Gel de agarosa (1.5% p/v) teñido con RedGel (0,02% v/v) mostrando productos de PCR full del gen 16S rDNA amplificado con los primers eub 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y eub 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Carriles idem a Figura 4-6.	
Figura 4-8	43
Gel de agarosa (1.5% p/v) teñido con RedGel (0,02% v/v) mostrando productos de PCR full archaeas del gen 16S rDNA amplificado con los primers Arch 21f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGA-3') y Arch 958R. Carriles idem a Figura 4-6.	
Figura 4-9	43
Gel de agarosa (1.5% p/v) teñido con RedGel (0,02% v/v) mostrando productos de nested PCR de (izq) región V3 de 16S rDNA amplificada con los primers P3 534r y (der) primers Arch 958r y 344f (GC- clamp). Carriles idem a Figura 4-6.	
Figura 4-10	44
DGGE de productos de nested PCR amplificados con los primers P3 (GC- clamp) y 534r. Carriles 1 a 4: Muestras estratificadas del reactor R-10. Carriles 5 a 8: Muestras estratificadas del reactor R-0. Carriles 9 a 12: muestras estratificadas del reactor R-2, carril Nit: muestra tomada del reactor de inóculo nitrificante. A la izq se muestra la imagen original con asteriscos rojos que indican las bandas que fueron cortadas, reamplificadas, purificadas y secuenciadas. A la derecha se muestra la misma imagen asignando una letra a cada patrón de bandeo.	
Figura 4-11	51
Composición porcentual de cada muestra estratificada de biomasa del reactor R-0, Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.	
Figura 4-12	52
Composición porcentual de cada muestra estratificada de biomasa del reactor R-2, Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.	
Figura 4-13	53
Composición porcentual de cada muestra estratificada de biomasa del reactor R-10, Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.	
Figura 4-14	54
Composición porcentual de la abundancia total de microorganismos presentes en cada reactor. Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.	

Figura 4-15	56
Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE 1, 2, 3 y 4 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-10.	
Figura 4-16	56
Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE 5, 6, 7 y 8 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-0.	
Figura 4-17	57
Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE 9, 10, 11 y 12 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-2.	
Figura 4-18	59
Abundancias relativas para cada toma muestra en cada reactor, de los grupos bacterianos agrupados en: Heterótrofos (c: <i>Lysobacter sp.</i>); Heterótrofos-reductores de S° (h+l: Thermotogales + Thermotogaceae); Oxidantes de S° (i: <i>Thioalkalivibrio sp.</i>); Desnitrificantes autótrofos-oxidantes de S° (m: <i>Sulfurimonas denitrificans</i>); Bacterias no cultivables (bacterias no cultivables “f”, “j” y “e”); Metanotróficas (g: <i>Methylomonas rubra</i>); y Nitrificantes (d+k+n: <i>Nitrosomonas sp.</i> + gamma proteobacterium + bacteria no cultivable “n”).	
Figura 4-19	61
Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE 1, 5 y 9 (M1, M5 y M9 en la figura) correspondientes a las muestras del primer toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.	
Figura 4-20	61
Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE 2, 6 y 10 (M2, M6 y M10 en la figura) correspondientes a las muestras del segundo toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.	
Figura 4-21	62
Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE 3, 7 y 11 (M3, M7 y M11 en la figura) correspondientes a las muestras del tercer toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.	
Figura 4-22	62
Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE 4, 8 y 12 (M4, M8 y M12 en la figura) correspondientes a las muestras del cuarto toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.	

Figura 4-23	63
DGGE de productos de PCR amplificados con los primers Arch 958r y 344f (GC-clamp). Carriles 1 a 4: Muestras estratificadas del reactor R-10. Carriles 5 a 8: Muestras estratificadas del reactor R-0. Carriles 9 a 12: muestras estratificadas del reactor R-2. De todas las bandas indicadas en la figura, sólo las mas intensas (A, B, E, F y G) fueron cortadas, reamplificadas, purificadas y secuenciadas.	
Figura 4-24	65
Composición porcentual de la abundancia total de archaeas presentes en cada reactor. Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.	
Figura 4-25	66
Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 1, 2, 3 y 4 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-10.	
Figura 4-26	67
Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 5, 6, 7 y 8 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-0.	
Figura 4-27	67
Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 9, 10, 11 y 12 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-2.	
Figura 4-28	68
Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 1, 5 y 9 (M1, M5 y M9 en la figura) correspondientes a las muestras del primer toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.	
Figura 4-29	69
Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 2, 6 y 10 (M2, M6 y M10 en la figura) correspondientes a las muestras del segundo toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.	
Figura 4-30	69
Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 3, 7 y 11 (M3, M7 y M11 en la figura) correspondientes a las muestras del tercer toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.	
Figura 4-31	70
Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 4, 8 y 12 (M4, M8 y M12 en la figura) correspondientes a las muestras del cuarto toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.	

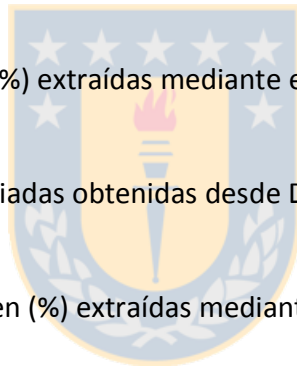
Figura 4-32

Abundancias relativas (%) de archaeas metanogénicas (*M. marisnigri* + *M. petrolearius* + *M. mahii*) para cada toma muestra en cada reactor, R-0, R-2 y R-10. TM: toma muestra.



Índice de Tablas

Tabla 3-1	20
Caracterización de los sustratos utilizados en los reactores filtro.	
Tabla 3-2	26
Condiciones de las PCR para cada set de partidores utilizado.	
Tabla 4-1	39
Evaluación del efecto de OD en zona anóxica	
Tabla 4-2	41
Comparación de los porcentajes de inhibición de la desnitrificación obtenidos experimentalmente y por modelos matemáticos.	
Tabla 4-3	45
Identificación de bandas secuenciadas obtenidas desde DGGE.	
Tabla 4-4	46
Intensidades de banda relativas (%) extraídas mediante el programa ImageJ.	
Tabla 4-5	64
Identificación de bandas secuenciadas obtenidas desde DGGE de Archaeas.	
Tabla 4-6	64
Intensidades de banda relativas en (%) extraídas mediante el programa ImageJ.	



1. RESUMEN

Para la remoción de los contaminantes presentes en vertidos de la industria del salmón, se requiere una combinación de procesos anóxicos, anaeróbicos y aeróbicos, siendo la opción óptima, la combinación de los tres procesos en el orden señalado. De esta forma, se ahorra en materiales, en elementos de control, se aumenta la estabilidad del sistema (debido a la mayor diversidad de microorganismos presentes) y se ahorra materia orgánica para la desnitrificación previa a la digestión anaeróbica.

Así, el objetivo principal de este proyecto consistió en poner en marcha tres reactores filtro anóxico/anaeróbico/aeróbico bajo distintas razones de recirculación (2, 10 y sin reciclo), para el tratamiento de un RIL pesquero salino de alta carga orgánica proteica, y caracterizar los procesos de desnitrificación, digestión anaeróbica y nitrificación que ocurren bajo esta disposición novedosa en reactores compactos.

Los reactores anóxicos/anaeróbicos disponibles en el laboratorio desde su habilitación el 2005, fueron efectivamente inoculados con biomasa nitrificante adaptada al RIL en estudio en la última zona provista de aireación. Posterior a la fijación y estabilización de esta biomasa en los reactores, comenzaron a operarse en el modo anóxico/anaeróbico/aeróbico. Alcanzado el estado estacionario, se evaluaron las eficiencias de remoción de materia orgánica y nitrogenada, el efecto del oxígeno disuelto en el flujo recirculado sobre la zona anóxica/anaeróbica, y se realizó una completa caracterización físico-química y microbiológica mediante técnicas moleculares a los reactores, con la finalidad de evaluar la influencia del reciclo sobre la composición y disposición de los compuestos y comunidades microbianas a lo largo de los reactores.

Con una carga orgánica y nitrogenada de $1.0 \text{ kg COD/m}^3\text{d}$ y $0,15 \text{ kg NTK/m}^3\text{d}$, respectivamente y a un tiempo de residencia de 2d, los tres reactores mostraron un 100% de eficiencia en la remoción de nitritos y nitratos en la zona anóxica-desnitrificante, y una remoción de TOC superior al 98%. Se observó una mayor eficiencia de remoción de nitrógeno total en el reactor de reciclo 10 (94,3%) que en el de reciclo 2 (46,6%), mientras que la remoción de materia orgánica no se vio afectada por la razón de reciclo. Se observó un leve efecto del OD en el flujo recirculado sobre la zona anóxica, presentándose una disminución del 20% en la eficiencia de remoción de N-NO_x medida al primer quinto del reactor de reciclo 2 con 0,94 mgOD/L, sin

embargo las eficiencias globales de remoción de N.NOx fueron en todos los casos de 100%. Entre dos modelos matemáticos, se determinó el más apropiado para predecir el efecto del OD recirculado sobre la desnitrificación, el cual mostró desviaciones de 19,6% para R-2 y nula para R-10.

La utilización de un sustrato alternativo preparado con hidrolizado de pescado de proporción TOC/NTK 2,8 veces menor al RIL pesquero (2,8 veces más proteico) mostró una fuerte caída en el desempeño de la zona aeróbica de los reactores, disminuyendo a un 30% la remoción de nitrógeno en el reactor de reciclo 2, siendo incluso nula en el reactor de reciclo 10; mientras que la remoción de TOC no se vió afectada.

El análisis poblacional de eubacterias y archaeas realizado a los reactores mediante la técnica de DGGE (electroforesis en gel con gradiente denaturante) mostró una diversidad de bandas que representan la variedad de bacterias y archaeas presentes en los reactores. Se observó una correlación entre los procesos químicos medidos y los grupos bacterianos identificados, siendo de particular interés el hallazgo de bacterias desnitrificantes-autótrofas que explican la desaparición de nitrógeno observada en la zona aeróbica de 39,5 y 54% en los reactores R-0 y R-2 respectivamente. De este modo, esta diferencia observada entre el amonio oxidado y NO_x producidos, es atribuible a desnitrificación autótrofa, cuyas bacterias responsables corresponden a un tercio y un medio de la abundancia de bacterias nitrificantes halladas en los reactores R-0 y R-10.

El hallazgo de grupos bacterianos responsables de procesos químicos no estudiados en esta tesis, como la oxidación del azufre y del metano, se plantean como un interesante tema de estudio, dado que involucran el posible abatimiento de H₂S, gas altamente tóxico, y CH₄, gas de efecto invernadero.

Análisis de MDS y Cluster revelaron estratificación de microorganismos en los reactores R-0 y R-2, mientras que el R-10 mostró una distribución más homogénea, con una reducción promedio de estratificación de 11% para bacterias y de 40% para archaeas en relación a los otros dos reactores; demostrando que una alta razón de recirculación sí afecta la estratificación de los microorganismos presentes en un reactor filtro, disminuyendo considerablemente al trabajar con reciclos altos.

Los resultados a la fecha muestran que la disposición propuesta con una distribución novedosa de reactores compactos, permiten tratar altas concentraciones de materia orgánica y nitrogenada de forma eficiente con ahorro total de materia orgánica destinada a la desnitrificación, gracias a la convivencia de comunidades complejas de microorganismos que coexisten y se distribuyen de acuerdo a la disponibilidad de los diversos sustratos liberados durante la degradación proteica y cuya identificación permite tener una visión más acabada del proceso, además de generar nuevas interrogantes respecto a procesos metabólicos aún no estudiados asociados a las diversas bacterias identificadas que colonizan este tipo de reactores, y que mediante la búsqueda de nuevas respuestas permitan optimizar aún mas el tratamiento de RILes pesqueros.



2. INTRODUCCIÓN

Actualmente, en Chile existe un serio problema ambiental causado por la descarga de residuos líquidos provenientes de las industrias de alimentos, los cuales ingresan al ambiente acuático una alta carga de materia orgánica y de compuestos nitrogenados. Dentro de este rubro industrial destaca el explosivo crecimiento que ha experimentado la acuicultura en Chile, actividad que genera volúmenes de exportación cercanos a 400.000 toneladas anuales con valores que superan los 1.500 millones de dólares (Subsecretaría de Pesca, 2006). Dentro de la acuicultura destaca principalmente la salmonicultura, que ha convertido a nuestro país en el segundo productor salmoneero del mundo, produciendo más de 300.000 toneladas de salmónidos anuales (Buschmann y Fortt; 2005). Durante los últimos tres años, esta industria ha tenido que lidiar con una de las peores crisis sanitarias del sector debido a la introducción del virus ISA a los cultivos (www.mardechile.cl, 2009), el cual es el principal causante de la caída de las ventas de salmón al exterior en un 59% (cl.invertia.com, 2009). Actualmente se discute en torno a las modificaciones a la Ley de Pesca y Acuicultura que permitirán reactivar la industria, en base a la creación de un estatuto sanitario, uno laboral y otro medioambiental, que reordenen por completo las condiciones que hoy existen (www.datossur.cl, 2009).

En general, las industrias de procesamiento de salmones pueden verter al ambiente residuos líquidos de alta carga orgánica y nitrogenada debido al aumento de valor agregado que se aplica al producto en estas industrias, siendo el filete fresco de salmón el principal producto (River et al., 1998). Algunos de los efectos provocados por el aumento de la carga orgánica y nutrientes en los sedimentos son: aumento de la demanda biológica de oxígeno y disminución de la concentración de éste (los sedimentos aumentan su condición anóxica y reductora), eutrofización de las aguas, alteraciones en los ciclos normales de nutrientes y producción de metanogénesis, entre otros. Para evitar estos daños, la norma ambiental estipula (Decreto Supremo N°90/2000) límites de emisión para diversos contaminantes. Respecto a la carga nitrogenada, estos límites son de 50 mg/L de nitrógeno total Kjeldahl (NTK) dentro de la zona de protección litoral y en cuerpos de agua fluviales, y 10 mg/L de nitrógeno total (NT) para cuerpos de agua lacustres.

Para el cumplimiento de la norma, las industrias realizan tratamientos de remoción biológica mediante procesos anaerobios, anóxicos y aerobios, para lograr así la disminución de estos compuestos en los RILes tratados. Sin embargo, para lograr una optimización del tratamiento, lo ideal es lograr la integración de los tres procesos. De esta manera, se facilita la operación del sistema (ya que ocurre todo en un solo reactor), se ahorra en materiales y elementos de control de los procesos y se aumenta la estabilidad del sistema ante eventuales fluctuaciones de carga debido a la mayor diversidad de comunidades bacterianas presentes en el sistema (Zhang et al., 2007; Chui et al., 2001; Roeckel et al., 2009).

Hasta la fecha, varios autores han probado la eficacia del proceso combinado anaeróbico/anóxico/aeróbico, logrando altas tasas de eliminación de materia orgánica y compuestos nitrogenados (Del Pozo y Diez, 2005; Chui *et al.*, 2001, Ros y Vrtovsek, 1998). Ros y Vrtovsek (1998), fueron los primeros en proponer este proceso integrado, realizando un análisis teórico de diseño y operación basados en resultados experimentales obtenidos en reactores individuales. Unos años más tarde, Chui et al. (2001), trabajando con un RIL sintético de alta carga nitrogenada, demostraron que un reactor filtro combinado para procesos integrados es ligeramente más eficiente que un sistema de unidades separadas, y que el volumen de las distintas zonas puede ser ajustado para el tratamiento de aguas residuales con diferentes concentraciones de DQO y nitrógeno. Del Pozo y Diez (2005) alcanzaron eficiencias de remoción de materia orgánica de 93% para una carga promedio de 0,77 kg DQO/m³d, y una eficiencia de 67% para una carga nitrogenada de 0,084 kgN/ m³d presentes en RILes de matadero avícola; sin embargo, debido a problemas de diseño de su reactor gran parte de la materia orgánica fue removida aeróbicamente y el nitrógeno abatido principalmente por asimilación debido a una fuerte inhibición de la zona anaeróbica/anóxica, producto del oxígeno disuelto recirculado.

Una nueva alternativa de llevar a cabo estos procesos es combinar también las 3 etapas pero en el orden anóxico/anaerobio/aerobio. Esta disposición permite lograr un ahorro en materia orgánica destinada a la desnitrificación. A pesar de que no se dispone de datos con vertidos reales en reactores compactos, este ahorro de materia orgánica puede estimarse a partir de la razón C/N usada en reactores desnitrificantes. Así, de acuerdo a Reyes et al. (2004) esta reacción requiere una razón C/N de 1.45, con lo cual se obtienen remociones de nitrato (N-NO₃) y de ácido acético (C-CH₃COO⁻) de 99 y 94% respectivamente, para un reactor agitado continuo. Este resultado es consistente con la razón C/N óptima de 1.45 obtenida por Dahab

and Lee (1988) quienes trabajaron con un reactor filtro desnitrificante y ácido acético como fuente de carbono. De acuerdo a esto, el carbono orgánico ahorrado por efecto de posicionar la etapa anóxica previa a la anaeróbica sería de 1.45 veces la concentración del nitrato como nitrógeno contenido en la corriente recirculada. Finalmente, realizar la nitrificación como última etapa permite recircular parte de la corriente de salida hacia la etapa anóxica, donde pueden aprovecharse los productos de la nitrificación.

Otra ventaja de esta disposición es la formación natural del límite desnitrificante-anaeróbico, el cual, dependiendo de la carga de compuestos nitrogenados en la alimentación, regularía que nitritos y nitratos sean consumidos totalmente antes de pasar a la siguiente etapa; esto debido a la inhibición natural de la metanogénesis producida por nitritos y nitratos (Akunna *et al.*, 1994).

En la figura 1 se representa esquemáticamente el proceso propuesto y se explica cada etapa de éste:

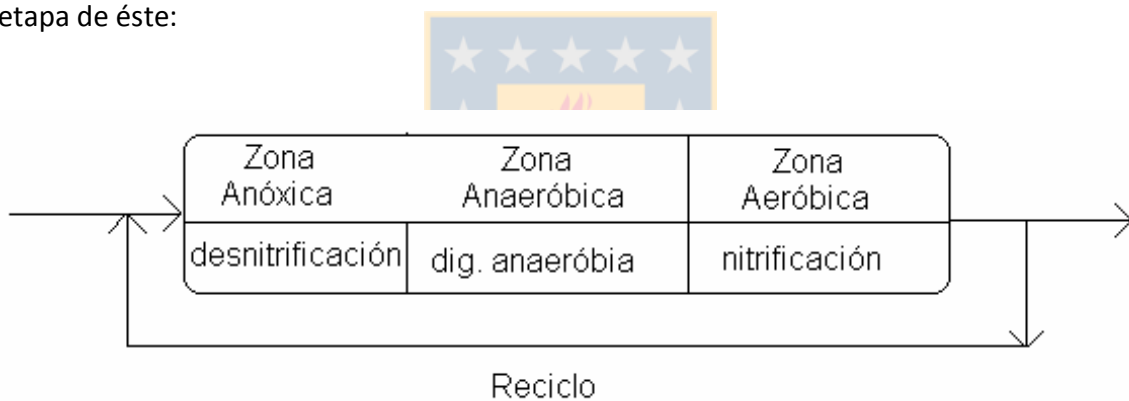
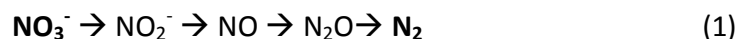


Figura 1: Esquema del proceso combinado propuesto.

Zona anóxica: Esta es la zona de alimentación del reactor, la cual consiste en un vertido salino de alta carga orgánica proteica junto a la recirculación de nitritos y nitratos, productos de la nitrificación en la última etapa. En esta etapa ocurre la reacción de desnitrificación que reduce nitritos y nitratos, utilizando el carbono orgánico proveniente de la degradación proteica:

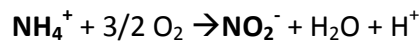


Zona anaeróbica: En esta etapa (y desde el ingreso al reactor), ocurre la digestión anaeróbica y posterior metanogénesis de la materia orgánica remanente.

Proteínas \rightarrow Ácidos grasos volátiles (expresados como $C_2H_4O_2$) + NH_3



Zona aeróbica: En esta última etapa, el amonio producido por la hidrólisis de proteínas durante la etapa anóxica y anaerobia, es transformado a nitritos y nitratos por la acción de bacterias nitrificantes, productos que posteriormente son recirculados a la zona anóxica para su reducción.



Para el desarrollo de este trabajo se contó con tres reactores filtro tubulares de flujo ascendente, los cuales en un comienzo llevaban a cabo los procesos integrados anóxico/anaerobios sin recirculación, en los cuales se lleva a cabo la remoción simultánea de nitrato y materia orgánica desde un sustrato industrial puro, correspondiente a un RIL pesquero. Para poner en marcha la última etapa aeróbica-nitrificante, fue necesario instalar un sistema de aireación en la última etapa (según se describe en Quijada 2009), de acuerdo al modelo propuesto anteriormente. Dada la ausencia de bacterias nitrificantes viables dentro de estos reactores, posteriormente se realizó la adaptación de un inóculo nitrificante a las condiciones del sustrato en estudio, es decir, al efluente de los reactores filtro (según se describe en Giustinianovich 2009), para luego inocular la zona aeróbica.

Del sistema combinado propuesto existen tres aspectos fundamentales que se deben tener en consideración para el presente trabajo:

- **Competencia de bacterias nitrificantes y heterótrofas:**

La entrada de materia orgánica remanente a la zona aeróbica es capaz de inhibir la nitrificación debido al crecimiento de bacterias heterotróficas, las cuales asimilan amonio, oxígeno y tienen altas tasas de crecimiento, duplicando su población en cerca de 8 horas. Comparativamente, las bacterias nitrificantes requieren de 24 horas para doblar la población. Si las heterotróficas aeróbicas no son controladas, pueden llevar a la obstrucción del sistema, disminuyendo las tasas de flujo y retardando el transporte de oxígeno en la biopelícula. Es así

como varios autores afirman que la razón COT/N es fundamental en el diseño de procesos de remoción de nitrógeno (Michaud *et al.*, 2006, Ling y Chen, 2005, Carrera *et al.*, 2004, Ryhiner *et al.*, 1994, Pak y Chang, 2000, Delgado *et al.*, 2001) ya que se ha observado una disminución exponencial en la nitrificación al aumentar la razón DQO/N que permite el desarrollo de microorganismos heterótrofos. Ling y Chen (2005) observaron 60-70% de reducción en la velocidad de nitrificación al aumentar la razón DQO/N de 0 a 3. Así mismo, Delgado *et al* (2004) observaron una disminución en la nitrificación de 40 a 82% al aumentar la razón COT/N de 1 a 4 debido a limitaciones cinéticas.

Por otra parte, la tasa de nitrificación depende de la concentración de oxígeno disuelto (OD) (Ros y Vrtovsek, 1998). Del Pozo y Diez (2005) informaron que en un reactor filtro integrado anaeróbico-aeróbico, la nitrificación se ve limitada por concentraciones de OD menores a 3 mg/L. Este factor limitante tiene directa relación con la presencia de bacterias heterotróficas, ya que éstas, además de competir por el oxígeno, limitan la transferencia de éste dentro de la biopelícula, limitando así el crecimiento de las bacterias nitrificantes (Gönenç y Harremoës, 1990). De esta forma, Gönenç y Harremoës (1990), demostraron que la razón DBO5/OD en el medio debe ser menor a 5 para permitir la nitrificación.

Considerando los antecedentes anteriormente mencionados, se vió en forma positiva que los reactores filtro anóxicos/anaerobios disponibles en el laboratorio tuvieran una razón másica COT/N-NH₄⁺ inferior a 0.15, disponible desde el segundo quinto del reactor, lo cual es favorable para la nitrificación.

- **Inhibición de la desnitrificación por presencia de O₂:**

Estudios realizados en reactores filtro de procesos integrados anóxico/aeróbico han informado una disminución de la eficiencia en la etapa anóxica por la presencia de oxígeno en el reciclo (Del Pozo y Diez, 2005, Ramos *et al.*, 2007; Gálvez *et al.*, 2003). Sin embargo, un incremento en la tasa del reflujo también podría mejorar la eficiencia de desnitrificación al incrementar la cantidad de NO_x⁻ según informan Ramos *et al.* (2007). A su vez, Del Pozo y Diez (2005) informan que la desnitrificación en reactores filtro anaeróbico/aeróbico con recirculación, se ve limitada cuando la concentración de oxígeno disuelto (OD) excede los 0.5 mg/L en el reciclo.

Los reactores filtro disponibles en el laboratorio presentaron una concentración de OD cercana a los 3 mg/L en la zona aeróbica, proporcionada por el sistema de aireación (Quijada

2009). Sin embargo, considerando la plasticidad del sistema debido a la gran diversidad microbiana presente en este tipo de reactores, se espera que una pequeña concentración de OD remanente en el reciclo, debiera ser consumido rápidamente por bacterias heterotróficas en los primeros centímetros del lecho, dando paso a la desnitrificación una vez agotado el oxígeno recirculado.

- **Inhibición de la metanogénesis por presencia de NO_x^- :**

Si ocurre inhibición de la desnitrificación por presencia de oxígeno en el flujo recirculado, esto implicará una disminución de la eficiencia de remoción de nitratos y nitritos, los cuales son inhibidores de la metanogénesis (Del Pozo y Diez, 2005; Akunna *et al.*, 1994).

Por lo explicado anteriormente, se espera que en los reactores filtro disponibles en el laboratorio el oxígeno remanente en la corriente recirculada se consuma rápidamente, dando paso a una efectiva remoción de nitrato tal como se observa actualmente, con una eficiencia del 100% en el primer quinto del reactor. Así, para determinar el efecto del OD recirculado sobre la zona anóxica, se propone operar tres reactores filtro en paralelo bajo las mismas condiciones, uno de ellos sin recirculación, y los otros dos con razones de reciclo de 2 y 10, a los cuales se les medirá el OD contenido en el reciclo en estado estacionario.

No se puede tener un conocimiento acabado de un bioproceso si se desconoce uno de los aspectos más importantes: los microorganismos involucrados en éste. La clave para tener un eficiente tratamiento biológico de RILes recae en conocer los microorganismos involucrados y cómo ellos responden a distintas condiciones de operación. Durante décadas, los reactores biológicos han sido considerados como “cajas negras”; sin embargo, a partir de la década de 1990, nuevas técnicas moleculares han permitido dilucidar la estructura de comunidades microbiológicas en muchos casos. Las técnicas más ampliamente utilizadas son: clonamiento del gen 16S ADN_r, electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Sanz y Köchling, 2006). Estas técnicas han sido aplicadas en el tratamiento de aguas residuales principalmente para el estudio de flóculos (lodos activados) y biopelículas, mostrando ser eficaces herramientas para monitorear la dinámica de comunidades microbianas y estudiar la composición de estas agrupaciones (Xia *et al.*, 2007).

Es así como, por nombrar algunos ejemplos, Fernández et al. (2008) estudiaron (mediante las técnicas FISH, DGGE y clonamiento) la formación, estructura y diversidad de las comunidades microbianas durante el desarrollo de biopelículas en un reactor UASB (upflow anaerobic sludge bed) para el tratamiento de aguas residuales, observando tres estados: una fase inicial de adhesión azarosa de células a la superficie (0-36 h), una fase de consolidación caracterizada por la aparición de microcolonias (26 h a 2 semanas) y una última fase de maduración (de 2 semanas a 2 meses). Xia et al. (2007) analizaron la estructura de las comunidades de un reactor SCBR (suspended carrier biofilm reactor) nitrificante/desnitrificante determinando abundancia total por DGGE y cuantificando bacterias nitrificantes por FISH, obteniendo que la diversidad bacteriana y la cantidad de nitrificantes era inversamente proporcional a la razón C/N. Diaz et al. (2003) estudiaron cualitativa y cuantitativamente la diversidad de microorganismos presentes en los gránulos de un lodo anaeróbico mediante FISH y microscopía electrónica, notando diferencias en la composición para distintos sustratos utilizados y una marcada disposición de los distintos grupos bacterianos en el centro y en el exterior de los gránulos.

Para el estudio de las comunidades totales presentes en una muestra, la técnica más indicada es DGGE, ya que refleja directamente la biodiversidad genética de la muestra. Esta técnica, acoplada con secuenciación de ADN y análisis filogenético, puede darnos una buena visión general de la composición de una comunidad microbiana determinada (Sanz y Köchling, 2006).

La electroforesis en gel con gradiente denaturante es una técnica de huella o rastreo molecular, que consiste en la separación de segmentos de DNA doble hebra dependiendo de su punto de denaturación (separación de las hebras complementarias), lo cual a su vez está determinado por su contenido de guanina-citocina en su secuencia. Para ello, las muestras biológicas deben ser previamente tratadas para extraer y purificar el DNA de las células y amplificar una secuencia determinada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y partidores específicos (Muyzer y Smalla, 1998).

Por esta razón, en este estudio, dado que se buscó analizar comunidades complejas de microorganismos, las muestras biológicas fueron tratadas con la técnica de DGGE. Con este análisis, se busca determinar:

- Presencia o ausencia de estratificación de comunidades microbianas dentro de los reactores
- Grupos más abundantes y su disposición espacial
- Cambios en la disposición espacial producto de las distintas razones de recirculación
- Correlación entre microorganismos y reacciones químicas

Para ello, se propone tomar muestras de biomasa desde los tres reactores en estado estacionario, en forma estratificada. Posteriormente, utilizando partidores para el gen ADNr 16S de Eubacterias y Archaeas, se propone separar estos fragmentos mediante DGGE, para luego extraer y purificar las bandas más intensas (correspondientes a las bacterias más abundantes y representadas en la muestra) y enviarlas a un laboratorio especializado para su secuenciación y posterior identificación por comparación de similitud en bases de datos disponibles en internet. De esta forma, y mediante un análisis estadístico de multivariantes de los datos obtenidos, se podrá determinar el grado de estratificación de los reactores, y los efectos de la recirculación sobre la disposición de las comunidades presentes.

De acuerdo a lo anteriormente planteado, en este trabajo se postuló la siguiente hipótesis y objetivo general:

Hipótesis: Es posible realizar los procesos de desnitrificación, digestión anaeróbica y nitrificación en serie en un reactor filtro de procesos integrados anóxico/anaeróbico/aeróbico, para el tratamiento de vertidos salinos de alta carga orgánica proteica. En el reactor será posible obtener una diversidad de comunidades bacterianas y arqueas metanogénicas que permitan llevar a cabo procesos anaeróbicos y aeróbicos de forma simultánea y, además, sin necesidad de agregar una fuente de carbono orgánico externa para llevar a cabo la reacción de desnitrificación. Así mismo, se espera encontrar una disposición estratificada de las comunidades presentes, concordante con los procesos que ocurren en cada zona del reactor.

Objetivo General: Remover la materia carbonácea y nitrogenada desde vertidos salinos de alta carga orgánica proteica utilizando un reactor filtro anóxico/anaeróbico/aeróbico y caracterizar química y biológicamente los procesos de desnitrificación, digestión anaeróbica y nitrificación que ocurren en este.

De esta forma, este trabajo se enfocó en los siguientes objetivos específicos: (i) Poner en marcha el sistema completo, estableciendo una comunidad nitrificante adaptada a la zona aeróbica de los reactores filtro; (ii) determinar el comportamiento de los reactores mediante el análisis de perfiles axiales de compuestos y el cálculo de eficiencias de remoción de materia orgánica y nitrogenada, en estado estacionario; (iii) evaluar el efecto del oxígeno disuelto en el flujo recirculado sobre la zona anóxica/anaeróbica; (iv) caracterizar la composición y distribución espacial de las comunidades microbianas dentro de los reactores y (v) determinar la influencia de una corriente recirculada sobre la composición y distribución de las comunidades microbianas.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describen los materiales y la metodología llevada a cabo para la inoculación de la zona aeróbica de los reactores tubulares, los análisis físico-químicos y los moleculares para el estudio de las comunidades microbianas presentes en los reactores.

3.1. Unidad experimental

El estudio se llevó a cabo en tres reactores filtro tubulares de flujo ascendente de procesos integrados en los cuales se lleva a cabo la remoción simultánea de materia orgánica y nitrogenada desde un sustrato industrial correspondiente a un RIL pesquero. Desde su habilitación por Muñoz (2005) a la fecha se probaron dos modos de operación: anóxico/anaeróbico y posteriormente una zona aeróbica fue incluida en los dos últimos quintos mediante la instalación de difusores conectados a bombas de acuario, de acuerdo a lo descrito por Quijada (2009), operando así bajo el modo anóxico/anaeróbico/aeróbico. El sistema de aireación fue instalado a 100 cm desde el fondo del los reactores, distancia obtenida mediante el análisis de perfiles axiales de oxígeno disuelto de un reactor abiótico, donde la transferencia de oxígeno disuelto bajo el punto de aireación fue hasta 30 cm de éste.

Los reactores filtro contaron con un empaque de PVC rugoso, con área específica de $438 \text{ m}^2/\text{m}^3$ de reactor. Estuvieron provistos de 4 boquillas para la toma de muestras líquidas, 4 tomas de muestras para el estudio de la biomasa y una toma de muestra de gases (ver Figura 3-1). El volumen útil aproximado de los reactores es de 5 L, con una altura total de 1,65m y diámetro interno de 0,071m. Los tres reactores fueron mantenidos en una cámara a 30°C para favorecer la nitrificación en la última etapa (Henze et al., 1997).

Durante el modo de operación anóxico/anaeróbico/aeróbico, dos de los tres reactores fueron provistos de un sistema de recirculación con razones de reciclaje 2 y 10. El tercero se mantuvo sin reciclaje a modo de control. Tanto el alimento como la corriente recirculada fueron suministrados por el fondo a través de bombas peristálticas.

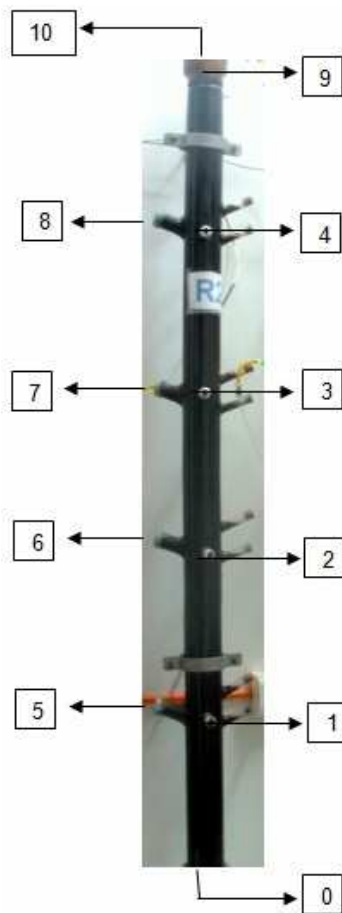


Figura 3-1: Reactor filtro tubular donde se indican los puntos de muestreo. 0: alimentación; 1,2,3,4: boquillas para líquido; 5,6,7,8: boquillas para sólido; 9: descarga; 10: purga de gases. La zona aeróbica comienza en el punto 7, donde se encuentran localizados los difusores.

Dada la ausencia de nitrificación en la zona aeróbica observable por la no degradación del nitrógeno amoniacal producido en las etapas anteriores, se hizo necesaria la inoculación de esta zona con bacterias nitrificantes para completar el proceso propuesto.

3.2. Inoculación de zona aeróbica

Para la inoculación de la zona aeróbica de los reactores se utilizó lodo nitrificante mixto previamente adaptado, proveniente de un reactor tipo SBR (secuencial batch reactor) nitrificante (Antileo et al., 2006). Este inóculo fue facilitado por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de la Frontera. La adaptación del inóculo se llevó a cabo en un reactor continuo aeróbico de biomasa suspendida a 30°C con un TRH de 5 d según lo descrito en Giustinianovich (2009). Se utilizó un alimento mixto compuesto por sustrato sintético y efluente de los reactores anóxico/anaeróbicos en cantidades crecientes. La adaptación concluyó con una microflora nitrificante adaptada al efluente de reactores tubulares anóxicos/anaeróbicos

diluido al 50% en sustrato sintético, de una concentración de nitrógeno amoniacal total (TAN) superior a los 200 mgN/L y una salinidad aproximada de 24 gNaCl/L. La eficiencia de remoción de TAN al final del proceso de adaptación (50 días) en el reactor continuo fue de 100%.

La primera consideración durante el procedimiento de inoculación fue reducir la concentración de TOC alimentado a los reactores filtro a la mitad (750 mg C/L) para alcanzar una concentración de TAN cercana a los 200 mgN/L dentro de los reactores, concentración a la cual está adaptado el inóculo. La inoculación de los reactores constó de dos etapas, adherencia y adaptación, como se describe a continuación:

3.2.1. Adherencia

Durante esta etapa, los reactores fueron inoculados con 1L de inóculo proveniente del reactor continuo nitrificante adaptado. Este fue inyectado directamente en la zona aeróbica con una jeringa de 50 mL. Se instalaron recipientes para decantación de lodos a la salida de los reactores, los cuales fueron recuperados diariamente y reinyectados nuevamente a la zona aeróbica (punto 3 de figura 2). Este procedimiento se llevó a cabo durante 20 días al igual que en el trabajo de Villaverde et al., (1999), quienes durante la puesta en marcha de dos reactores filtro nitrificantes probaron recirculación completa con alimentación batch en uno de ellos y flujo continuo en el segundo durante los primeros 20 días, obteniendo resultados similares en cuanto a la degradación de amonio y la fijación de biomasa luego de dos meses de operación continua. Para evaluar la fijación de la biomasa en los soportes, se midieron sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el efluente dos veces por semana, esperando observar una disminución de estos hasta alcanzar un valor estable. También, se realizó recuento celular viable en cámara Neubauer dos veces por semana. Dichas técnicas se describen a continuación:

- *Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)*: Éstos representan el contenido orgánico total presente en una muestra. Se determinan usando el método estándar de la APHA (APHA, 1992), en el que una muestra homogeneizada de volumen conocido se seca por 2 horas hasta pesada constante a 105 °C. Posteriormente, se somete la muestra a 600 °C en una mufla por 20 minutos. En esta etapa se volatilizan todos los SSV, dejando una ceniza que corresponde al contenido inorgánico de la muestra. Así, la pérdida de peso tras la calcinación a 600 °C representa los sólidos volátiles.
- *Recuento celular en cámara Neubauer*: La cámara de Neubauer consta de dos placas de vidrio, entre las cuales se puede alojar un volumen conocido de líquido. Una de las placas posee una

grilla de dimensiones conocidas visible al microscopio óptico. Para contar las células de un cultivo líquido, se agrega una gota de la muestra entre estas dos placas de la cámara y se observa en el microscopio óptico la cantidad de células presentes en un campo determinado de la grilla. Con base en la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la grilla, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la solución del cultivo inicial.

3.2.2. Adaptación

Posterior a los 20 días de fijación, se instalaron sistemas de recirculación en dos de los reactores desde la descarga hacia la alimentación. Estos contaron con razones de recirculación de 2 y 10 respectivamente, cuya elección se explica más abajo. De esta forma, en conjunto con el tercer reactor sin reciclo, se pudo evaluar el efecto del oxígeno disuelto en el flujo recirculado sobre la zona anóxica. Para los reciclos, se utilizó una bomba peristáltica (modelo 752, Masterflex, USA) para impulsar un flujo desde la descarga hacia la entrada de la alimentación con las razones de recirculación correspondientes.

Se contempló un tiempo mínimo de 2 meses luego de la inoculación de acuerdo al protocolo seguido por Villaverde et al. (1999), para lograr estabilizar la biomasa dentro de los reactores y alcanzar un estado estacionario, cuyo criterio de evaluación fue una variación de N-NO_x, N-NH₄⁺ y TOC a la descarga menor al 10% en el tiempo (ver Anexo A).

Respecto a las razones de recirculación (R), una de ellas se determinó de acuerdo a la eficiencia de remoción de nitrógeno que se desea obtener. Se definió la eficiencia de transformación de nitrógeno a nitrógeno elemental con respecto al nitrógeno total alimentado, bajo el supuesto de un 100% de eficiencia en cada una de las etapas del reactor, dejando así a la razón de reciclo como el único factor del cual depende la cantidad de nitrógeno removido.

Para obtener la relación entre la eficiencia de remoción de nitrógeno y la RR se realizó un balance global de nitrógeno total (nitrógeno como amonio más nitrito y nitrato) en el reactor como muestra la Fig. 3-2:

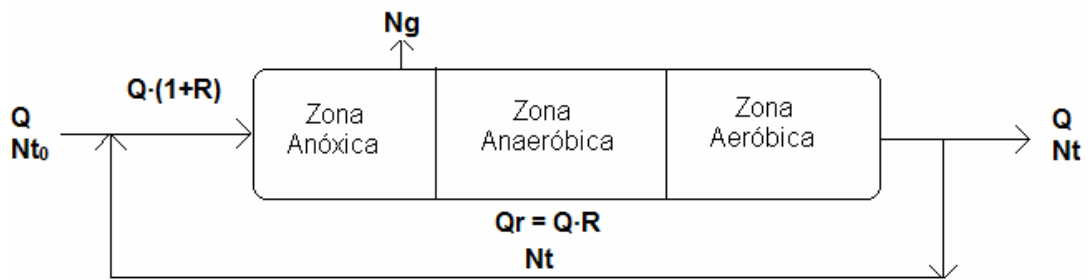


Figura 3-2: Balance de nitrógeno total en un reactor anóxico/anaeróbico/aeróbico.

Un 100% de eficiencia en cada etapa significa que todo el nitrógeno total Kjeldahl contenido en las proteínas alimentadas es degradado a amonio en la zona anóxica-desnitrificante, el cual a su vez es transformado a NO_x por nitrificación en forma completa, y que la fracción de NO_x recirculado es reducido totalmente a N_2 en la etapa desnitrificante. Bajo este supuesto, se tiene el siguiente balance global de nitrógeno:

$$N(\text{salida}) = N(\text{entrada}) - N(\text{gas}) \quad (3.1)$$

Dado el supuesto de 100% de eficiencia de la etapa desnitrificante:

$$N(\text{gas}) = N(\text{recirculado}) \quad (3.2)$$

Así, de la ecuación (1) y el supuesto (2):

$$N_t \cdot Q = N_{t0} \cdot Q - N_t \cdot Q_r$$

$$N_t = (N_{t0} \cdot Q - N_t \cdot (Q \cdot R)) / Q$$

$$N_t = N_{t0} - N_t \cdot R$$

$$N_t + N_t \cdot R = N_{t0}$$

$$N_t = N_{t0} / (1+R) \quad (3.3)$$

En que:

Q = caudal de alimentación= caudal de salida

$Q_r = Q \cdot R$ = caudal recirculado

$Q \cdot (1+R)$ = caudal de alimentación + caudal recirculado = caudal de entrada el reactor

R = Razón de recirculación

N_{t0} = concentración de nitrógeno total en la alimentación

N_t = concentración de nitrógeno total a la salida del reactor = concentración en la recirculación

Luego, la eficiencia de remoción de nitrógeno estará dada por:

$$\text{Eficiencia} = (N_{(\text{entrada})} - N_{(\text{salida})}) / N_{(\text{entrada})} \quad (3.4)$$

$$\text{Eficiencia} = (N_{t_0} - N_t) / N_{t_0} \quad (3.5)$$

Reemplazando (3) en (5):

$$\begin{aligned} \text{Eficiencia} &= (N_{t_0} - N_{t_0} / (1+R)) / N_{t_0} = N_{t_0} \cdot (1 - 1/(1+R)) / N_{t_0} \\ \text{Eficiencia} &= R / (1+R) \end{aligned} \quad (3.6)$$

Así, podemos definir la razón de reciclo de acuerdo a la eficiencia de remoción que deseamos obtener, si las eficiencias en cada etapa son máximas.

De acuerdo a la norma ambiental D.S. 90/2000, el límite de NTK es de 50 mg/L dentro de la zona de protección litoral y cuerpos de agua fluviales. Si fijamos esa concentración de salida para nuestros reactores, y una emisión experimental de amonio de 400-500 mg N/L producto de la digestión anaeróbica, se obtiene:

$$N_{t_0} = 400 \text{ a } 500 \text{ mgN/L}$$

$$N_t = 50 \text{ mgN/L}$$

Así, la eficiencia de acuerdo a la ecuación (5) será:

$$\text{Eficiencia} = (400(500) - 50) / 400(500) = 0,875(0,9)$$

Aplicando la ecuación (6):

$$0,875(0,9) = R / (1+R)$$

$$R = 7(9)$$

De esta forma, se requiere una razón de recirculación entre 7 y 9, dependiendo de la descarga de amonio. Dadas las fluctuaciones del RIL, consideramos el valor más alto, y para asegurar el cumplimiento de la norma, se fijó $R=10$. Con esta razón y de acuerdo a las ecuaciones (6) y (5) debería obtenerse una eficiencia de remoción de 0,909 y una concentración de amonio de salida de 45,5 mgN/L.

Respecto al otro reactor con recirculación, se escogió un valor bajo, de $R=2$, con la intención de no perder el flujo tipo pistón que caracteriza a estos reactores filtro, considerando las ventajas que proporciona este tipo de flujo (permite la creación de macro y microambientes dentro del sistema, lo cual favorece la degradación de compuestos nitrogenados NO_x^- en la primera zona del reactor, degradación de materia orgánica vía digestión anaeróbica en la zona intermedia y oxidación de amonio y consumo de O_2 en la zona final del reactor).

3.3. Condiciones de operación

Los reactores filtro fueron operados en paralelo bajo la modalidad anóxico/anaeróbico/aeróbico por 2 años aproximadamente. Durante este periodo los tres reactores funcionaron bajo diferentes razones de recirculación de 2, 10 y el tercero sin reciclo. Se probaron dos sustratos durante este periodo; el primero correspondió a un RIL de sangre de pescado obtenido de la industria pesquera de la zona, similar al del procesamiento de *Salmo salar* (salmón del Atlántico). Este sustrato se preparó midiendo la concentración de TOC al RIL concentrado cada vez que se preparó alimento (3 veces por semana) y diluyendo éste a una concentración de carbono orgánico total (COT) de cerca de 750 mg/L, donde el 100% del TOC fué aportado por el RIL. El segundo sustrato correspondió a hidrolizado de pescado, obtenido de la empresa pesquera LANDES S.A., al cual se le realizó una curva de calibración de COT (figura 3-3) para determinar la cantidad en gramos necesaria para alcanzar la concentración de materia orgánica deseada. Esta cantidad correspondiente a 4,27 g/L fue pesada en una balanza analítica cada vez que se preparó sustrato fresco (3 veces por semana).

Además, a ambos sustratos se les agregó cloruro de sodio (24 g/L disuelto en agua potable) para darle la característica de alta salinidad, propia de este tipo de RILes y nitrato de potasio (KNO_3) para estimular la desnitrificación en la primera etapa previo a la incorporación de los reciclos. Una vez incorporados los reciclos el KNO_3 fue reemplazado por el proveniente en la corriente recirculada. El nitrato fue mantenido en el reactor sin recirculación para no perder la condición desnitrificante en la primera zona.

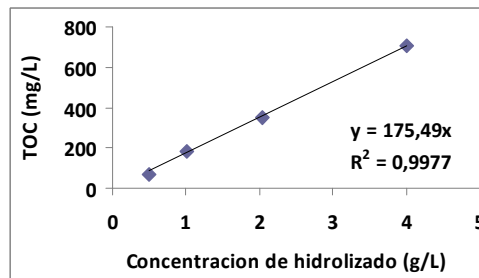


Figura 3-3: Curva calibración de TOC para soluciones de hidrolizado de pescado utilizado como sustrato en reactores filtro.

En la tabla 3-1 se muestra la caracterización de los sustratos utilizados, siendo de particular interés la diferencia en la razón TOC/Nitrógeno total Kjeldahl (NTK) entre ambos sustratos.

Tabla 3-1: Caracterización de los sustratos utilizados en los reactores filtro.

Variable	RIL-sangre	RIL-hidrolizado
N-NH ₄ ⁺	47	22
N-NO ₂ ⁻	1	3
N-NO ₃ ⁻	0	0
TOC (mg/L)	6134	750
NTK (mg/L)	2399	844,9
razón TOC/NTK	2,6	0,9

3.4. Análisis de perfiles axiales de compuestos nitrogenados y carbonáceos

Durante el periodo de operación de los reactores se tomaron muestras de alimentación y descarga en forma periódica y logrado el estado estacionario, se tomaron además muestras estratificadas a lo largo de los reactores a través de las 4 tomas de muestras disponibles en cada uno de ellos. Todas las muestras fueron filtradas a través de filtros de 0.45 µm. A las muestras filtradas se les determinó los siguientes parámetros: COT, nitrógeno amoniacal total (TAN), NO₂, NO₃⁻, además de la medición del pH y alcalinidad. Los métodos de análisis para cada compuesto se presentan a continuación.

- *Nitrato y nitrito*: Se midieron sus concentraciones de acuerdo a Sánchez et al. (2005), utilizando un equipo de inyección de flujo (FIALab, 2500/2700 1.0607, USA), con detector USB400-VIS-NIR. El nitrito es medido como producto coloreado de la reacción con sulfanilamida diazotizada con N-(1-naftil)-etilenodiamina dihidrocloruro a 540 nm. Luego, mediante la reducción de nitrato a nitrito por su paso a través de una columna de cadmio, el nitrato es medido como nitrito (junto al nitrito original) en la misma muestra. El contenido de nitrato es obtenido por la diferencia entre ambas mediciones.

- *Nitrógeno amoniacal*: El análisis se realizó de acuerdo a Sánchez et al. (2005), en el equipo FIALab descrito anteriormente, acoplado a un controlador de temperatura modelo estándar (PolyScience, USA). Este equipo mide la absorbancia del NAT a 590 nm.

- *Carbono orgánico total*: El COT determinó de acuerdo a Aspé et al. (2001). Se obtiene de la diferencia entre el carbono total (medido como CO₂ generado de la combustión de la muestra a 680 °C) y el carbono inorgánico (medido como CO₂ obtenido al acidificar la muestra). Se utilizó un equipo Shimadzu COT-5000^a japonés, que cuantifica el CO₂ mediante un analizador infrarrojo.

- *pH*: se utilizaró para su medición un pHmetro (Schott, CG 825, Alemania) con un electrodo (Cole-Parmer, USA)

3.5. Determinación de la influencia del oxígeno disuelto en el flujo recirculado

Para evaluar si existe algún efecto del oxígeno sobre la zona anóxica, específicamente sobre el proceso de desnitrificación, se siguieron dos procedimientos: (i) Se evaluó mediante un modelo de inhibición obtenido de la literatura cuál es la respuesta esperada de nuestro sistema, y (ii) se evaluó empíricamente si existe algún efecto por comparación de las eficiencias de remoción de nitrato en los tres reactores (sin recirculación, con R=2 y R=10).

El modelo de inhibición que se utilizó fue el propuesto por Oh y Silverstein (1998), quienes estudiaron el efecto del oxígeno disuelto (OD) mediante experimentos discontinuos secuenciales sobre un reactor desnitrificante en el rango de 0,09 a 5,6 mg OD/L, donde

realizaron 74 perfiles experimentales de velocidad de desnitrificación (r_D) bajo nueve concentraciones de OD, evaluando cuatro modelos de inhibición. El modelo que mejor se ajustó a sus datos experimentales, con un valor de $R^2=0,7517$ y que logra predecir los dos fenómenos observados, inhibición bajo condiciones de OD muy bajo y desnitrificación persistente a concentraciones altas de OD, fue el siguiente:

$$r_D = r_{Dm\acute{a}x} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{OD}{K}} \right) \quad (3.7)$$

En que:

r_D = velocidad de desnitrificación observada (g N-NO₃/g SSV·d)

$r_{Dm\acute{a}x}$ = velocidad de desnitrificación en condiciones anóxicas (g N-NO₃/g SSV·d)

K = constante de inhibición (mg OD/L) = $0,38 \pm 0,03$ mg/L (Oh y Silverstein 1998)

Si bien este modelo fue validado bajo condiciones de biomasa suspendida en un reactor agitado, los autores afirman que la persistencia de desnitrificación para concentraciones mayores de la tolerancia normal encontrada en la literatura se debe a la presencia de flóculos que ofrecen limitaciones difusionales del oxígeno dentro del flóculo, lo cual hace posible (incluso a altas concentraciones de OD) la presencia de microzonas anóxicas que permiten que ocurra la reacción a velocidades más bajas. Por lo tanto, este modelo puede resultar apropiado para nuestro caso, dado que se trabaja con biomasa adherida en biopelículas, que también ofrecen limitación a la transferencia de oxígeno, pudiendo ocasionar el mismo fenómeno.

Para probar el modelo, se utilizaron los parámetros cinéticos encontrados por los mismos autores, y se diseñó un punto de medición de OD en los reactores tubulares que permitió detectar el oxígeno en el reciclo en un circuito cerrado. Se utilizó un medidor de oxígeno disuelto (YSI, Model 58, USA) para realizar las mediciones de OD en estado estacionario.

Por otra parte, las eficiencias obtenidas experimentalmente, se compararon con el modelo de Moya et al. (2011) realizado a los reactores filtro en paralelo a este estudio, para así poder evaluar cual de los dos modelos se ajusta mejor a los datos obtenidos.

Para determinar el efecto real del oxígeno sobre la zona anóxica, se compararon las eficiencias de remoción de nitrato en esta zona en los tres reactores. Esta eficiencia fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$E_{N-NOx} (\%) = \frac{(N-NOx)_A - (N-NOx)_E}{(N-NOx)_A} \cdot 100\% \quad (3.8)$$

$E_{N-NOx}(\%)$: Eficiencia de remoción de óxidos de nitrógeno

$(N-NOx)_A$ (mg/L) : Concentración de óxidos de nitrógeno en el alimento

$(N-NOx)_E$ (mg/L) : Concentración de óxidos de nitrógeno en el efluente (término de zona anóxica)

Dado que no es posible conocer donde se ubica exactamente el término de la zona anóxica, las eficiencias de remoción se evaluaron al término del primer y segundo quinto de los reactores, donde están ubicados los dos primeros puntos de muestreo.

3.6. Tratamiento de datos

Se determinaron las eficiencias y las velocidades de remoción, de acuerdo a las definiciones que se presentan a continuación, considerando en todos los casos el desempeño de los reactores a nivel global (entrada y salida) utilizando los datos obtenidos experimentalmente.

Eficiencias de remoción

Las eficiencias de remoción para los compuestos nitrogenados y para la materia orgánica se expresaron respectivamente como:

$$E_{N-NOx} (\%) = \frac{(N-NOx)_A - (N-NOx)_E}{(N-NOx)_A} \cdot 100\% \quad (3.9)$$

$$E_{NT} (\%) = \frac{(NT)_A - (NT)_E}{(NT)_A} \cdot 100\% \quad (3.10)$$

$$E_{COD} (\%) = \frac{COD_A - COD_E}{COD_A} \cdot 100\% \quad (3.11)$$

Donde:

$E_{N-NOx}(\%)$: Eficiencia de remoción de óxidos de nitrógeno

$(N-NOx)_A$ (mg/L) : Concentración de óxidos de nitrógeno en el alimento

$(N-NOx)_{EL}$ (mg/L) : Concentración de óxidos de nitrógeno en el efluente líquido

$E_{NT}(\%)$: Eficiencia de remoción de Nitrógeno total

$(NT)_A$ (mg/L) : Concentración de nitrógeno total (NTK + N-NOx) en el alimento

$(NT)_E$ (mg/L) : Concentración de nitrógeno total (NTK + N-NOx) en el efluente líquido

$E_{COD}(\%)$: Eficiencia de remoción de materia orgánica expresada como COD.

$(COD)_A$ (mg/L) : COD en el alimento

$(COD)_{EL}$ (mg/L) : COD en el efluente líquido

Velocidades de remoción

Las velocidades de remoción por volumen de reactor, para los óxidos de nitrógeno y para la materia orgánica se expresaron respectivamente como:

$$VCN_R \left(\frac{mg \text{ N - NOx}}{L_{reactor} \cdot d} \right) = VCN_A - VCN_E \quad (3.12)$$

$$VCO_R \left(\frac{mg \text{ COD}}{L_{reactor} \cdot d} \right) = VCO_A - VCO_E \quad (3.13)$$

Donde:

$$VCN_A \left(\frac{mg (N - NOx)_A}{L_{reactor} \cdot d} \right) = \frac{(N - NOx)_A}{TRH} \quad (3.14)$$

$$VCN_E \left(\frac{mg (N - NOx)_E}{L_{reactor} \cdot d} \right) = \frac{(N - NOx)_E}{TRH} \quad (3.15)$$

$$VCO_A \left(\frac{mg \text{ COD}_A}{L_{reactor} \cdot d} \right) = \frac{COD_A}{TRH} \quad (3.16)$$

$$VCO_E \left(\frac{mg \text{ COD}_E}{L_{reactor} \cdot d} \right) = \frac{COD_E}{TRH} \quad (3.17)$$

Con:

VCN_A : Velocidad específica de carga de (N-NOx) en el alimento

VCN_E : Velocidad específica de carga de (N-NOx) en el efluente

VCN_R : Velocidad específica de remoción de carga de (N-NOx)

VCO_A : Velocidad específica de carga de COD en el alimento

VCO_E : Velocidad específica de carga de COD en el efluente

VCO_R : Velocidad específica de remoción de carga de COD

TRH : Tiempo de residencia hidráulico

3.7. Análisis poblacional de reactores filtro

Para evaluar la composición y distribución de las comunidades microbianas dentro de los reactores, se tomaron muestras de biomasa en los cuatro puntos de muestreo de los reactores alcanzado el estado estacionario. El objetivo fue caracterizar la microbiota a lo largo de los reactores, detectando así los grupos bacterianos presentes en mayor abundancia y su distribución dentro de los reactores, así como también el efecto de la presencia de un reciclo sobre las comunidades. Las comparaciones de comunidades que se realizaron fueron bajo las siguientes condiciones: reactor sin reciclo contra R=2 contra R=10.

A continuación se describe la metodología que se utilizó para realizar los análisis moleculares.

3.7.1. Muestreo

Previo al vaciado de los reactores, se tomaron tres soportes desde los 4 puntos de muestreo, los cuales fueron puestos en viales estériles. El lodo fue desprendido y homogeneizado mediante una espátula estéril, tomando 4 mL de muestra que fue dividida en 4 tubos Eppendorf libres de RNAasas y DNAasas. Éstos fueron congelados a -20°C hasta su posterior análisis.

3.7.2. Caracterización de la microbiota por DGGE

Para la realización de este análisis, es necesario realizar en forma previa la extracción de ADN de las muestras y la amplificación del gen ADNr 16S. Los métodos se describen a continuación:

- a) *Extracción:* La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras obtenidas de la forma descrita anteriormente, utilizando el kit Power Soil DNA (MO BIO Laboratories, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- b) *Amplificación del gen ADNr 16S:* Se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR anidadas dirigidas al gen 16S ADNr de los dominios Eubacteria y Archaea. Para Eubacteria se utilizaron los partidores universales EUB I (9-27f) (5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3') y EUB II (1542r) (5'-AGG GAG TGA TCC ANC CRC A-3') y posteriormente para la PCR anidada los partidores P3-GC (341f) (5'- GC-clamp- TAC

GGG AGG CAG CAG -3') (GC-clamp: 40 pb GC) y P2 (534r) (5'-ATT ACC GCG GCT GG-3') dirigidos a la región V3 del gen 16S ADNr. Para Archaeas se utilizaron los partidores Arch 21f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') y Arch 958R (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3') y posteriormente para la PCR anidada los partidores 344f-GC (5'-GC clamp-ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA-3') (GC-clamp: 40 pb GC) y Arch 958r. Cada reacción contó con: 1µL de ADN templado, buffer PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), dNTPs (200 µM), partidores (0,2 mM de cada uno) y DNA polimerasa Paq5000 Stratagene (1,25 U), ajustando el volumen total a 50 µl usando agua con grado de biología molecular; a excepción de la reacción con los partidores 21f/958r, que contó con con 1µL de ADN templado, partidores 21f (0,4 mM) y 958r (0,4mM), EconoTaq PLUS GREEN 2X Master Mix y el volumen total fue ajustado a 25 µl. Se utilizó un termociclador (Thermo Electrón Corporation Px2 Thermal Cycler, USA) y las condiciones de cada reacción de PCR se indican en la tabla 3-2. Los productos de PCR fueron revelados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% p/v, teñido con Gelred BIOTIUM (5 µL para 100 mL), para su posterior visualización en un transiluminador de UV.

Tabla 3-2: Condiciones de las PCR para cada set de primers utilizado.

primers	initial elongation	(denaturation-alignment-elongation) x N° of cycles	final elongation	cita
9-27f / 1542r	94°C, 5min	(94°C, 45s - 55°C, 45s - 72°C, 1min) x 30 cycles	72°C, 10min	a
341f / 534r	94°C, 5min	(94°C, 30s - 65°C, 45s* - 72°C, 1.5min) x 35 cycles + (94°C, 30s - 55°C, 45s - 72°C, 1.5min) x 10 cycles	72°C, 10min	b
21f / 958r	95°C, 1min	(95°C, 1min - 50°C, 1min - 72°C, 2min) x 25 cycles	72°C, 10min	c
344f / 958r	94°C, 3 min	(95°C, 1min - 72.5°C, 1min* - 72°C, 2min) x 35 cycles + (94°C, 30s - 57°C, 45s - 72°C, 1.5min) x 10 cycles	72°C, 10min	d

* = menos 0.5°C cada ciclo. (a): Kwon et al., (2005), (b): Yasumoto et al., (2006) modificado, (c): Tian et al., (2009), (d): éste estudio

c) *Electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE):* Los productos de PCR, amplificados con partidores P2-P3, fueron separados mediante DGGE, siguiendo el protocolo de Campos et al. (2010). Los geles se prepararon con concentración denaturante entre 20%-60%, usando 13 ml de cada solución stock para la formación

del gradiente. Para la separación de los amplicones se cargó 13 μ l de los productos de PCR amplificados con partidores P2-P3 en los geles de poliacrilamida mezclados con 3 μ l de buffer de carga utilizando una microjeringa Hamilton. La corrida electroforética se realizó en una cámara electroforética DGGE-1001 (C.B.S. Scientific, USA) sumergiendo los geles en buffer TAE 1x (40 mM Tris-acetato y 1 mM EDTA, pH 8.3 a 25° C) a 85 V por 12 horas a 60°C. La separación de los fragmentos de ADN se visualizó tiñendo con una solución 2x de SYBR Gold (Invitrogen) por 60 minutos en oscuridad, para su posterior visualización de la separación de las bandas en un transiluminador U.V. y obtener un registro fotográfico de los patrones de banda.

d) *Análisis del patrón de bandeo*: El patrón de bandeo fue analizado mediante el programa ImageJ (programa de procesamientos de imagen digital programado en Java, desarrollado en el National Institutes of Health, USA, disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Las bandas de DGGE más significativas fueron cortadas y reamplificadas. Los productos de PCR reamplificados fueron purificados utilizando el kit UltraClean 15 DNA Purification, Gel & PCR product (MO BIO Laboratories, Inc.) y enviados al laboratorio de secuenciación de la Universidad de Chile para su secuenciación. Las secuencias generadas fueron comparadas con las secuencias depositadas en el GenBank (NCBI) mediante el programa BLASTn.

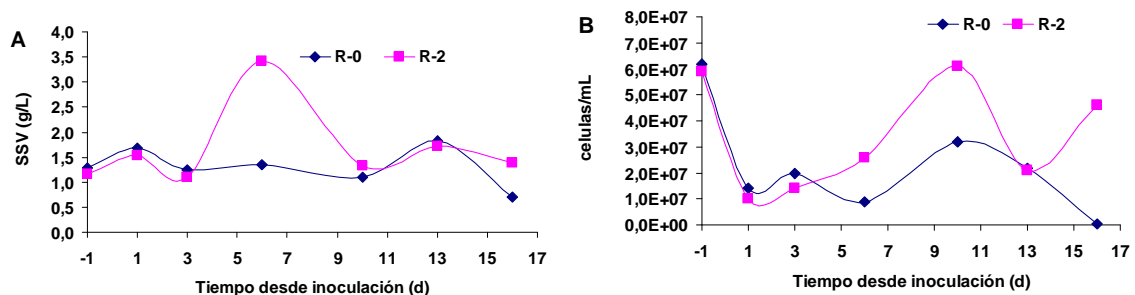
e) *Análisis estadístico*: Se utilizó el programa PRIMER 6 (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research versión 6) para realizar análisis de MDS (escalamiento multidimensional) y análisis de Cluster a los datos obtenidos para evaluar como éstos se interrelacionan. El primer análisis de MDS compara todas las posibilidades de cada par de datos para luego elaborar mapas perceptuales de similitud, y el análisis de cluster busca organizar los datos en grupos de acuerdo a que tan homogéneos o heterogéneos son los datos entre si. El análisis MDS se utilizó par evaluar estratificación de los reactores mediante la comparación de los datos obtenidos de las muestras estratificadas de cada reactor. El análisis de Cluster se utilizó para comparar los reactores entre sí, comparando los datos obtenidos de las muestras tomadas desde cada nivel en cada reactor.

4. Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en este estudio de acuerdo a los objetivos planteados en la página 12.

4.1. Inoculación de zona aeróbica

El protocolo de inoculación indicado en el capítulo anterior fue llevado a cabo con éxito durante las 3 primeras semanas, partiendo con los reactores R-0 y R-2. Durante este periodo se realizaron mediciones de SSV y recuento celular a la descarga; sin embargo, no se observó ninguna tendencia de disminución esperada en estos parámetros, como se observa en las Figuras 4-1A y B, debido posiblemente a la alta carga de sólidos suspendidos presentes en el RIL pesquero (agua-sangre) alimentado, lo cual dificultó la cuantificación de bacterias mediante estas técnicas. Ante esto, se decidió no realizar estas mediciones para el reactor R-10 que fue inoculado 3 semanas después de los anteriores. La efectividad de la inoculación y fijación entonces, fue evaluada mediante análisis químicos de detección de N-NOx para determinar la presencia de nitrificación en los reactores y con ello, una efectiva fijación y adaptación de la biomasa nitrificante a la zona aeróbica de los reactores filtro. Los reciclos fueron instalados en los reactores R-2 y R-10 y pasados cerca de 2 meses de operación de los reactores, el estado estacionario fue alcanzado, observándose una estabilidad en las concentraciones de los compuestos a la descarga como se observa en la figura 4-2, cuyo análisis se puede revisar en el Anexo A.



Figuras 4-1A y 4-1B: A) Sólidos suspendidos volátiles y B) Recuento celular a la descarga de los reactores R-0 y R-2 durante el periodo de inoculación de la zona aeróbica.

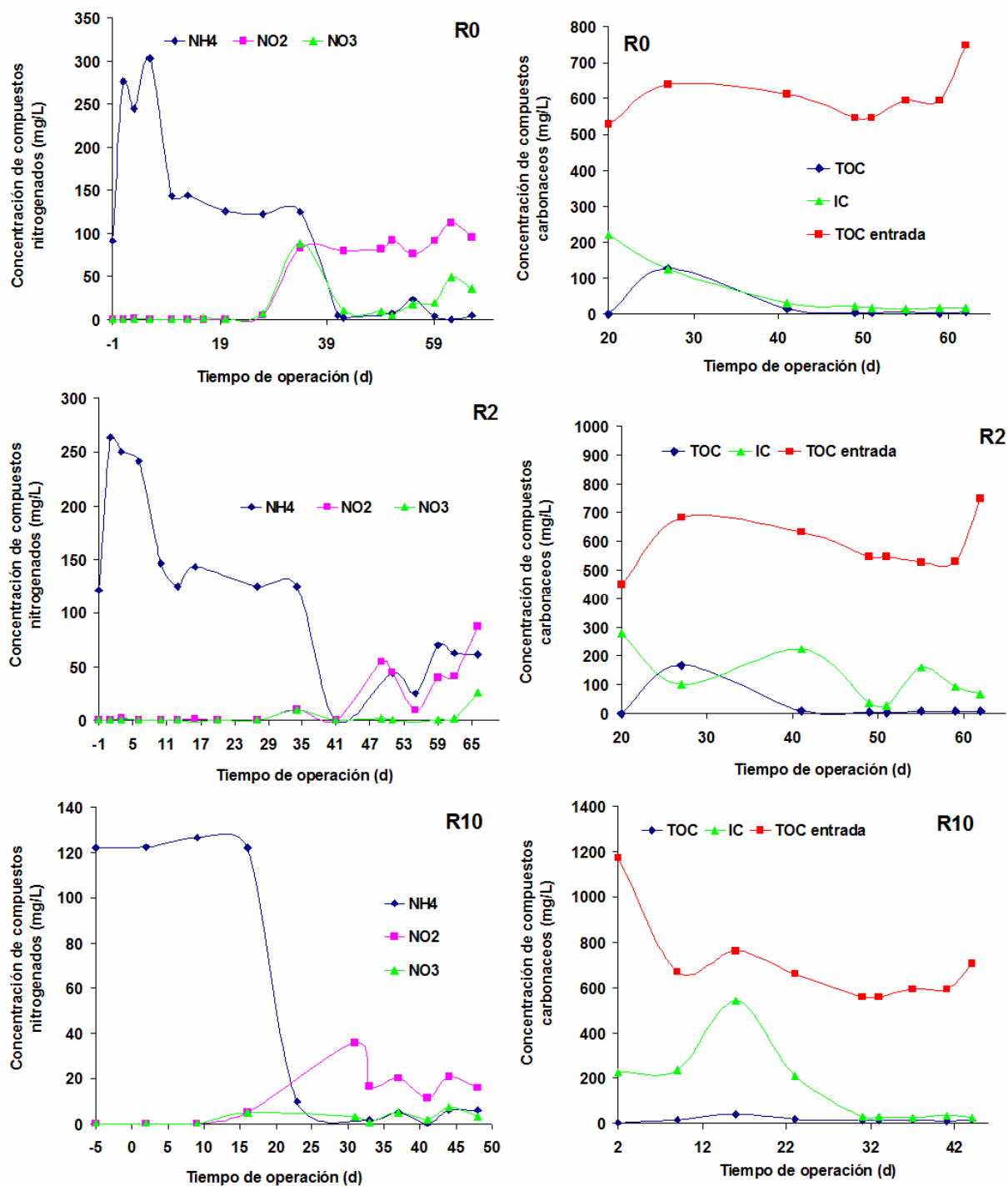


Figura 4-2: Concentración a la descarga de compuestos nitrogenados y carbonáceos y de TOC de entrada durante la operación de reactores filtro R-0, R-2 y R-10, sin reciclo, reciclo 2 y reciclo 10, respectivamente, alimentados con RIL pesquero.

En estado estacionario (EE) fueron tomadas muestras líquidas a lo largo de los reactores para realizar los análisis de perfiles axiales y también las muestras de biomasa para el estudio de comunidades. Lamentablemente estas últimas muestras no alcanzaron a ser procesadas ya que debido al terremoto de Febrero 2010 se degradaron al quedar expuestas a temperatura ambiente. Es por esto que fue necesario volver a poner en marcha los reactores bajo las mismas condiciones para poder obtener nuevamente las muestras microbiológicas y completar el estudio. Para ello se procedió de acuerdo a la misma metodología utilizada anteriormente. Sin embargo debido a la imposibilidad de conseguir RIL pesquero los primeros meses debido a la destrucción de las pesqueras en Talcahuano, fue necesario cambiar el RIL por hidrolizado de pescado, cuyas diferencias con el alimento anterior se pueden apreciar en la Tabla 3-1.

La diferencia entre ambos sustratos fue notoria al analizar el desempeño de los reactores, que tardaron más de 5 meses en estabilizarse, teniendo varios inconvenientes durante la puesta en marcha, como el taponamiento de mangueras producto de la mayor cantidad de sólidos del alimento, y una mayor dificultad en lograr nitrificación en la última etapa dada la menor razón TOC/NTK del hidrolizado en relación al RIL anterior, lo cual se traduce en una mayor liberación de nitrógeno amoniacal dentro de los reactores alimentados con hidrolizado (328 mgNAT/L contra 153 mgNAT/L en las zonas de mayor concentración del reactor sin reciclo) producto de la degradación proteica, que si bien es el sustrato de las bacterias nitrificantes, es también uno de los principales inhibidores de esta reacción (Anthonisen, 1976). Sin embargo, de acuerdo al pH, temperatura y NAT a cada altura de los reactores, las concentraciones de amoníaco (NH_3) nunca superan los 5 mgN/L, y de acuerdo a Antileo et al. (2002) la inhibición ocurre sobre valores de 8,2 y 13,0 mgN-NH₃/L para microfloras pre y post-aclimatadas respectivamente. En la Figura 4-3 puede observarse el comportamiento de los compuestos a la descarga durante la operación de los reactores alimentados con hidrolizado de pescado, observándose la dificultad de estabilizar el TOC de entrada en el alimento así como también los compuestos a la descarga durante los primeros 2 meses dado a continuas fallas de los equipos producto de daños causados por el terremoto en el equipamiento y sistema eléctrico del laboratorio. Una vez superados esos problemas, y a los 5 meses de operación aproximadamente, fue posible alcanzar una estacionalidad en los datos, cuyo análisis se describe en el Anexo A. En EE, fueron tomadas las muestras líquidas estratificadas a lo largo de los reactores para realizar los análisis de perfiles axiales y también las muestras de biomasa para el estudio de comunidades.

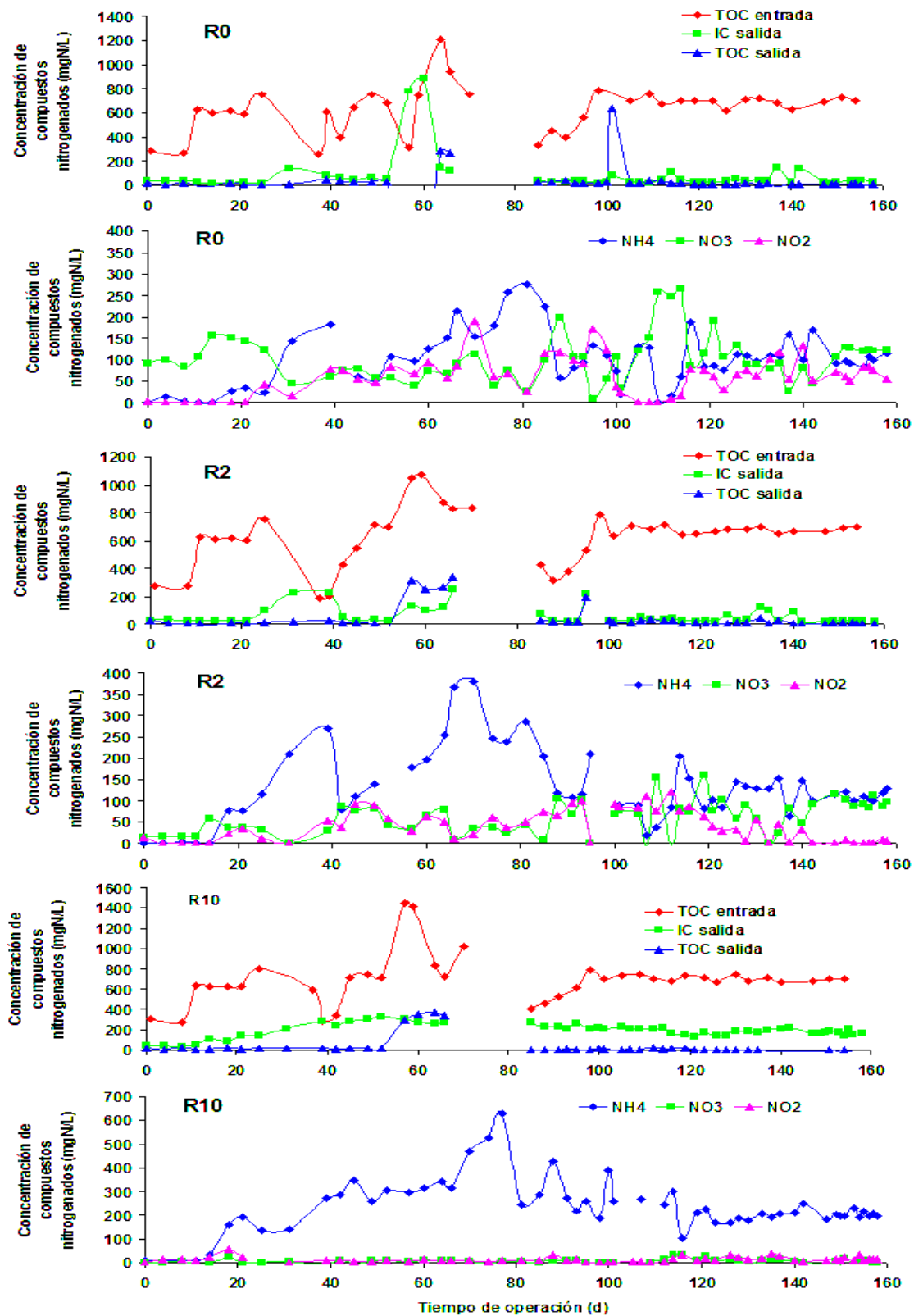


Figura 4-3: Concentración a la descarga de compuestos nitrogenados y carbonáceos, además del TOC de entrada, durante la operación de reactores filtro R-0, R-2 y R-10, sin reciclo, reciclo 2 y reciclo 10 respectivamente, alimentados con hidrolizado de pescado.

4.2. Análisis de perfiles axiales de compuestos nitrogenados y carbonáceos

La Figura 4-4 muestra el comportamiento axial de los reactores alimentados con RIL pesquero (agua-sangre) en estado estacionario. Se observa en los tres reactores un rápido consumo del nitrato en el primer quinto del reactor, lo que demuestra la efectividad de la zona anóxica. La liberación de amonio producto de la degradación proteica es contrarestanda en la zona aeróbica donde éste es degradado por comunidades nitrificantes con la consecuente producción de nitritos y nitratos. Se observa además que prevalece la acumulación de nitrito por sobre nitrato. Esto pudiera estar provocado por una deficiencia de alcalinidad (se observa una fuerte caída de carbono inorgánico en los reactores), y/o limitación de oxígeno, ya que los niveles de oxígeno disuelto van de los 2 a los 3.5 mg/L (Quijada, 2006), lo cual de acuerdo al estudio realizado por Joo et al. (2000), es suficientemente limitante como para favorecer la nitrificación parcial.

En los reactores con reciclo R-2 y R-10, se observa el efecto de dilución sobre los compuestos producto de la corriente recirculada a distintas razones. Esta dilución y efecto de mezclado es mayor en el reactor con mayor razón de reciclo, asemejándose más a un reactor continuo perfectamente agitado dado que el caudal aumenta 11 veces el valor alimentado, que en conjunto con el flujo recirculado producen un gran efecto de mezclado dentro del reactor. Este efecto de mezclado se observó tanto para compuestos nitrogenados como para carbonáceos, sobretodo en el reactor R-10, donde prácticamente se pierde el perfil característico de consumo de TOC y consecuente producción de carbono inorgánico (IC) en el primer quinto del reactor observado en los reactores R-2 y R-0. Además, se observa una caída de IC, ya que las bacterias nitrificantes de la zona aeróbica son de metabolismo autótrofo, por lo cual requieren carbono inorgánico para metabolizar el amonio. Esta caída de concentración, ya sea de TOC en el primer quinto o de IC en la zona aeróbica, no se observa de manera evidente en los reactores con recirculación producto del efecto de mezclado antes mencionado. Se deben tener en cuenta las concentraciones alimentadas al ver los gráficos, consistentes en un TOC cercano a 600mg/L. En efecto, para el reactor R-10 la alimentación fresca es de 593 mg TOC/L y la salida del proceso es de 10 mg TOC/L, lo que implica una eficiencia de remoción de materia orgánica de 98%.

Los resultados de los análisis químicos mostraron que las eficiencias de remoción de nitrito y nitrato en la zona anóxica fueron del 100% y superiores al 98% de TOC en los tres reactores. No se observó un efecto del reciclo en las etapas anóxica y anaeróbica para las razones de

recirculación estudiadas (0, 2 y 10). Las remociones de nitrógeno total fueron 94,3% y 46,6% para los reactores con R 10 y 0, respectivamente. El reactor sin reciclo fue capaz de oxidar 96,5% del nitrógeno amoniacal total, sin embargo, al no contar con reciclo el nitrógeno fue eliminado a la forma de nitrito y nitrato. La mayor remoción de nitrógeno obtenida en el reactor con mayor razón de recirculación es consistente, ya que la cantidad de nitrógeno como nitritos y nitratos que ingresa a la zona anóxica-desnitrificante donde ocurre la remoción del nitrógeno es proporcional a la razón de recirculación. A mayor razón de reciclo, mayor la disponibilidad de nitrato para desnitrificación y mayor será la eficiencia de remoción de N del sistema (Mosquera et al., 2001).

Los resultados de estratificación axial de los reactores alimentados con hidrolizado de pescado se muestran en la Figura 4-5. Las diferencias son notorias en relación a los perfiles obtenidos con el sustrato anterior. Si bien la zona anóxica/anaeróbica no se ve alterada, observándose un rápido consumo de nitrato y TOC en el primer quinto de los reactores, la liberación de amonio por degradación proteica alcanza valores de concentración mucho mayores producto de este sustrato más proteico (328 mgNAT/L con hidrolizado vs 153 mgNAT/L con RIL sangre en la zona de mayor concentración observada para el reactor sin reciclo), lo cual afecta el desempeño de los reactores, observándose sólo un consumo parcial de amonio en la zona aeróbica de los tres reactores y ausencia de nitrificación en el reactor con mayor razón de reciclo. Por otra parte, tampoco es posible observar un aplanamiento de los perfiles de forma notoria como en el caso anterior, esto puede ser debido a la pérdida de efectividad del sistema de recirculación, producto de los constantes problemas de taponamiento de mangueras producto del cambio de sustrato.

Las eficiencias de remoción de nitrito y nitrato en la zona anóxica fueron del 100% en los reactores R-0 y R-2, mientras que el reactor R-10 no contó con N-NO_x recirculados necesarios para la desnitrificación, debido a la ausencia de nitrificación en la zona aeróbica. La remoción de TOC fue superior al 98% en los tres reactores, de esta manera, al igual que en el caso anterior no se observó un efecto del reciclo en las etapas anóxica y anaeróbica para las razones de recirculación estudiadas. Las remociones de nitrógeno total fueron de 48% para el reactor con razón de reciclo 2, mientras que para el reactor con reciclo 10 no fue posible remover nitrógeno dada la ausencia de nitrificación en la última etapa. El reactor sin reciclo R-0 fue capaz de oxidar el 72,6% del nitrógeno amoniacal total liberado a la forma de nitrato principalmente.

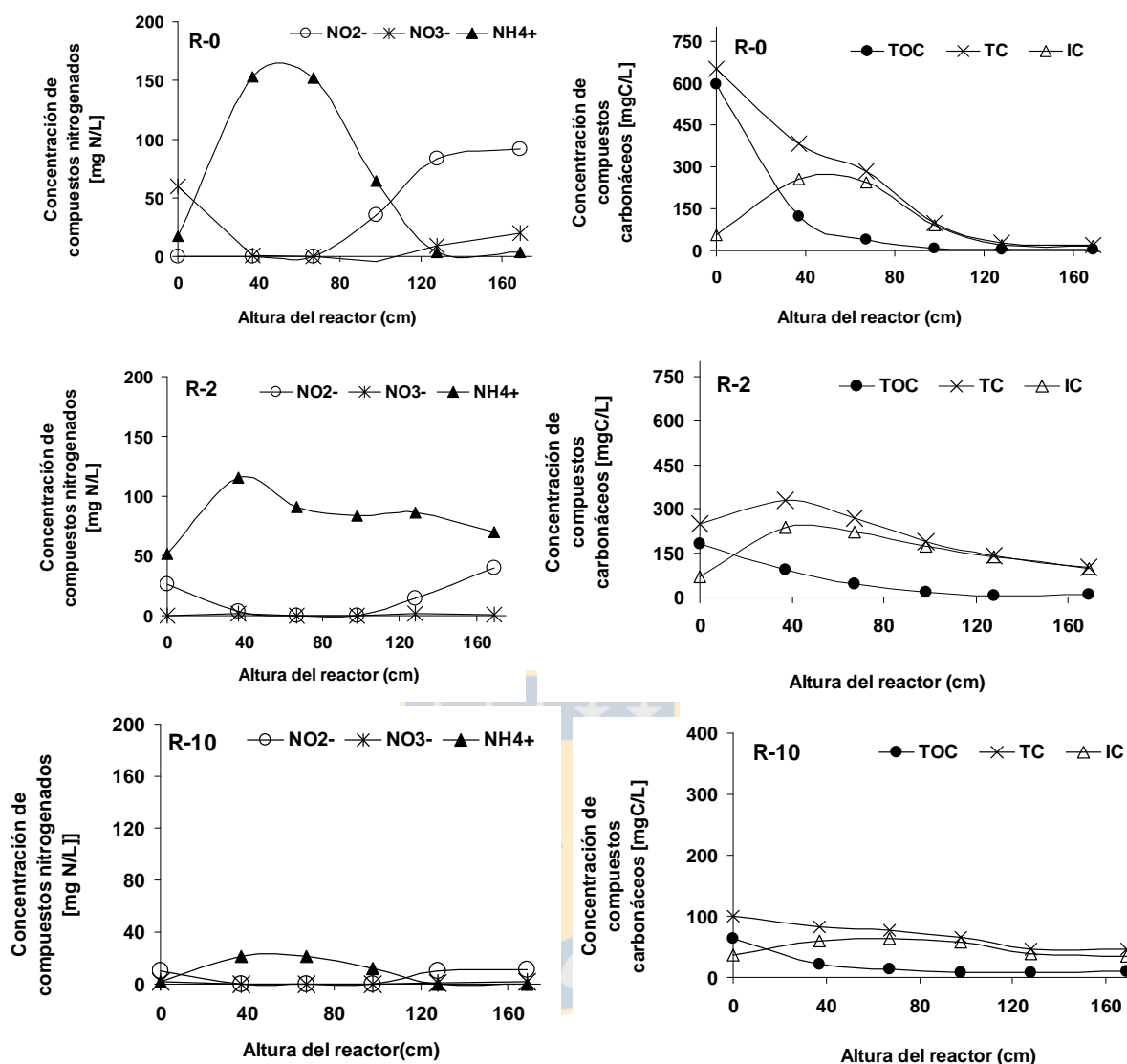


Figura 4-4: Perfil axial de los reactores R-0, R-2 y R-10 correspondiente a sin reciclo, reciclo 2 y reciclo 10, respectivamente, alimentados con RIL pesquero.

Claramente el rendimiento de los reactores se vio severamente afectado con el cambio de sustrato, cuyas principales diferencias con el sustrato anterior fueron una disminución de la proporción TOC/NTK, es decir, el hidrolizado se trata de un sustrato aún más proteico.

Si bien la zona anóxica/anaeróbica no se vio afectada manteniendo la efectividad en la remoción de TOC y NO_x, la nitrificación se vio fuertemente inhibida en el reactor R-10 bajando su eficiencia también en los reactores R-0 y R-2. Además, los reactores se vieron propensos a continuos taponamientos de manguera con este nuevo sustrato.

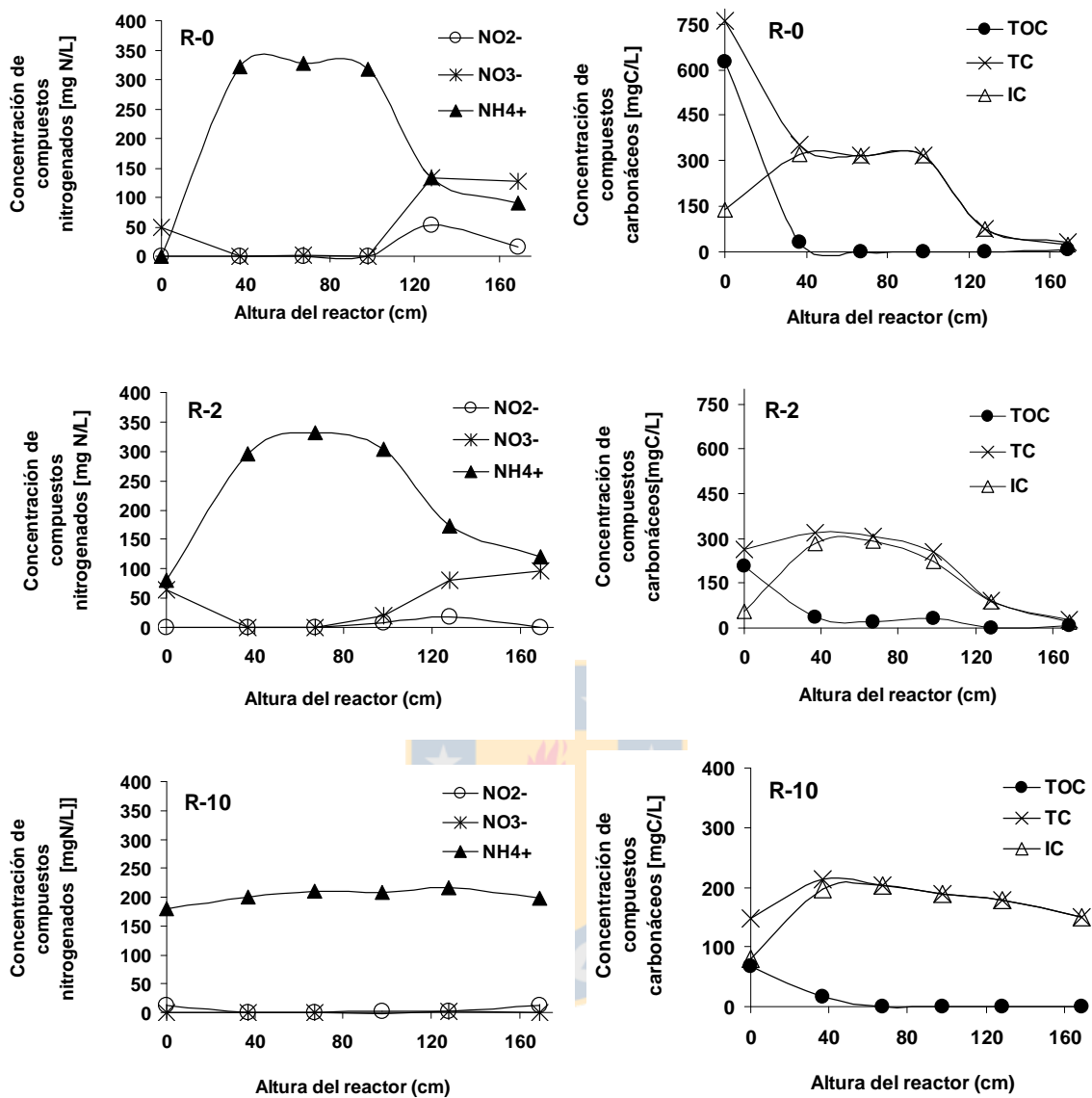


Figura 4-5: Perfil axial de los reactores R-0, R-2 y R-10 correspondiente a sin reciclo, reciclo 2 y reciclo 10 respectivamente, alimentados con hidrolizado de pescado.

Es interesante notar que la suma de nitrito y nitrato a la descarga no calza con la cantidad de amonio oxidado en ningún caso, siendo mayor este último. Esta “pérdida” de nitrógeno bajo condiciones aeróbicas durante la etapa de nitrificación y en ausencia de materia orgánica, ya se ha observado con anterioridad y se han descrito mecanismos no convencionales que explican este comportamiento: 1) la desnitrificación autótrofa por microorganismos desnitrificantes anóxicos y 2) la quimio-desnitrificación, que es un proceso de oxido-reducción (Garzón 2005).

Esto se explicará más adelante con evidencia microbiológica de presencia de bacterias desnitrificantes quimiolitotóxicas en la zona aeróbica, lo cual permite nitrificación y desnitrificación simultánea debido a las limitaciones difusionales que permiten la existencia de zonas anóxicas dentro de la biopelícula, hecho que también fue observado por Moya et al. (2011) en su modelo de reactor anóxico/anaeróbico/aeróbico.

Varios son los autores que han combinado exitosamente los procesos de remoción simultánea de materia orgánica y nitrogenada en reactores en serie (Del Pozo y Diez (2003); Im et al.,(2001); Mosquera-Corral et al. (2003) son algunos ejemplos); sin embargo, son pocos los que han trabajado con sistemas unitarios que acoplen estos procesos en un reactor individual (Martins dos Santos *et al.* 1998).

De acuerdo a la revisión sobre sistemas integrados para la remoción de nitrógeno realizado por estos autores, se plantea que los sistemas basados en tecnología de células inmovilizadas han mostrado que los procesos son claramente atractivos por ser eficientes y compactos, además de efectivos para la remoción de compuestos nitrogenados y DQO desde aguas servidas. Frente a las diferentes configuraciones expuestas en el trabajo de Martins dos Santos et al. (1998), esta tesis plantea una alternativa novedosa para el tratamiento de un RIL pesquero altamente salino y de alta carga orgánica y nitrogenada, ya que incorpora las ventajas de ser una unidad compacta que incluye los procesos de desnitrificación, digestión anaeróbica y nitrificación en una sola unidad, que al ser de células inmovilizadas en un lecho empacado reduce el tamaño del sistema completo, y que dada su disposición no requiere la adición de materia orgánica externa para llevar a cabo la desnitrificación. Las ventajas que presenta este sistema en relación a las unidades compactas revisadas por estos autores, están, por ejemplo, la no necesidad de elementos de control que aseguren la ausencia de C-orgánico al término de una condición anóxica para pasar a la aeróbica, problema propio de los sistemas alternados aeróbicos/anoxicos. Tampoco se observaron los problemas de los sistemas airlift, donde un aumento en el flujo de aire si bien promueve la nitrificación, también promueve la tasa de recirculación afectando la condición anóxica por presencia de oxígeno, provocando una reducción de la actividad desnitrificante y un aumento de la oxidación aeróbica de compuestos orgánicos.

Zhang et al. (2007) en un reactor airlift combinado nitrificante-desnitrificante de biopelículas alcanzaron eficiencias de nitrificación y remoción de NT de 95% y 84% para concentraciones de entrada de COD y TN de 300 y 70 mg/L respectivamente. Para ello debieron optimizar la razón COD/TN alimentada y el flujo de aireación que utilizaban además para recircular el líquido, siendo sus principales problemas el aumento de la razón COD/TN para beneficiar la desnitrificación en perjuicio de la nitrificación, y el aumento del flujo de aireación para beneficiar la nitrificación en perjuicio de la desnitrificación. El primer problema impide operar este tipo de reactor a altas concentraciones de materia orgánica ya que el remanente no consumido por desnitrificación favorece un metabolismo heterótrofo por sobre el nitrificante en la zona aeróbica, a diferencia de nuestros reactores donde la zona anaeróbica consume ese carbono remanente. El segundo problema, determina que el aumento de la razón de reciclo no necesariamente promueve la remoción de TN, ya que para aumentar la recirculación debían aumentar el flujo de aire, lo cual aumentaba el DO en la zona anóxica afectando la desnitrificación. En nuestro caso se observó que el aumento en la razón de reciclo de 2 a 10 mejoró la eficiencia de remoción de TN de 46 a 94% durante el periodo de alimentación con RIL pesquero.

Ros and Vrtovsek, (1998) presentaron un procedimiento de diseño de un reactor combinado anaeróbico/anóxico/aeróbico basándose en datos experimentales obtenidos desde reactores de cada proceso por separado. Dentro de su diseño, contemplaron el tratamiento de RILes de baja concentración de materia orgánica, siendo su principal objetivo la remoción de compuestos nitrogenados, donde la función de la zona anaeróbica no fue la remoción de materia orgánica sino la acidificación de ésta hacia componentes orgánicos fácilmente biodegradables (como ácidos grasos volátiles) y disponibles para la desnitrificación. De hecho, en su caso teórico de estudio debieron contemplar la adición externa de metanol como fuente de carbono a la zona anóxica dada la baja razón COD/N del RIL.

Chui et al. (2001) pusieron a prueba este tipo de conformación propuesta por Ros and Vrtovsek, (1998) con un reactor filtro combinado anaeróbico/anóxico/aeróbico. Ellos lograron remociones de COD y TN de 98 y 90% respectivamente, con un sustrato sintético que simulaba aguas residuales con cargas de COD y TKN de 5000 y 480 mg/L respectivamente. A diferencia de nuestros reactores, ellos ingresaban la corriente recirculada a la zona intermedia del reactor,

determinando así que la zona anóxica-desnitrificante ocurriera en esa zona; sin embargo, con esta disposición se corre el riesgo de que ante eventuales fluctuaciones de carga (no observadas al trabajar con sustrato sintético) el carbono orgánico remanente de la zona anaeróbica no sea suficiente para remover todos los nitratos y nitritos recirculados. En nuestro caso, al trabajar con el reciclo hacia la base del reactor, el RIL alimentado proporciona materia orgánica en exceso para llevar a cabo la desnitrificación sin problemas.

4.3. Determinación de la influencia del oxígeno disuelto en el flujo recirculado

Las mediciones de oxígeno disuelto (OD) realizadas en el flujo recirculado de los reactores con reciclo alimentados con RIL-sangre en estado estacionario dieron 0,94 mgOD/L para el reactor R-2 y 0,12 mgOD/L para el reactor R-10. De acuerdo al modelo de inhibición propuesto por Oh y Silverstein (1998) se evaluó la respuesta de los reactores de acuerdo a los valores de OD medidos. De esta forma tenemos:

$$\frac{r_D}{r_{D \max}} = \frac{1}{1 + \frac{OD}{K}}$$

r_D = velocidad de desnitrificación observada (g N-NO₃/g SSV·d)

$r_{D \max}$ = velocidad de desnitrificación en condiciones anóxicas (g N-NO₃/g SSV·d)

K = constante de inhibición (mg OD/L) = 0,38 ± 0,03 mg/L (Oh y Silverstein 1998)

Para el reactor R-2: $\frac{r_D}{r_{D \max}} = 0,27$ a $0,34$

O bien, la velocidad de desnitrificación se verá reducida en 66-73% con respecto a la velocidad máxima.

Para el reactor R-10: $\frac{r_D}{r_{D \max}} = 0,74$ a $0,77$

O bien, la velocidad de desnitrificación se verá reducida en 23-26% con respecto a la velocidad máxima.

En nuestro caso, la velocidad máxima dada por la condición anóxica corresponde al reactor sin recirculación.

Para evaluar empíricamente el efecto del OD en la zona anóxica se calcularon las eficiencias de remoción de N-NOx al primer y al segundo quinto del reactor en función de las concentraciones de N-NOx alcanzadas a esas alturas. Por otra parte, se calcularon también las velocidades de remoción a dichas alturas considerando el tiempo de residencia hidráulico correspondiente a cada altura (TRH 1º quinto = TRHtotal·1/5 y TRH 2º quinto = TRH total·2/5). En la tabla 4-1 se pueden observar estos valores calculados.

Tabla 4-1: evaluación del efecto de OD en zona anóxica

Reactor	[N-NOx] (mg/L)			E _{N-NOx} (%)		VCN _r (mg/L·d)	
	entrada	1º quinto reactor	2º quinto reactor	1º quinto reactor	2º quinto reactor	1º quinto reactor	2º quinto reactor
R-0	60	0,88	0	98,5	100	147,8	75
R-2	27,1	5,3	0	80,4	100	54,5	33,9
R-10	12,1	0,08	0	99,3	100	30,05	15,13

*[N-NOx] = Concentración de óxidos de nitrógeno (mg N-NOx/L); E_{N-NOx} = Eficiencia de remoción de óxidos de nitrógeno (%); VCN_r = Velocidad específica de remoción de carga de N-NOx (mg N-NOx/L·d)

De la tabla 4-1 podemos observar que si bien las eficiencias globales de remoción de N-NOx alcanzan el 100% en los tres reactores, notamos que al evaluar estas eficiencias al primer quinto de los reactores se encuentran diferencias, siendo ésta más notoria en el reactor R-2 que resultó ser el reactor con mayor concentración de OD en el flujo recirculado y con una disminución en la eficiencia de remoción cercana al 20% con respecto al reactor sin reciclo. Con respecto a las velocidades de remoción calculadas se puede observar que no es posible realizar comparaciones objetivas, dado que el ingreso de N-NOx en cada reactor es variable y depende de la efectividad de la zona aeróbica y la dilución dada por el reciclo. Por ejemplo, aunque la remoción de N-NOx en el reactor R-2 hubiese sido completa al primer quinto, con esa concentración de entrada la velocidad de remoción hubiese sido de 67,8 mg/L·d, correspondiente al 46% de la velocidad de remoción máxima dada por el reactor R-0 sin reciclo, a pesar de que ambos hubiesen tenido un 100% de remoción al primer quinto.

Por otra parte, para realizar una comparación entre los datos teóricos obtenidos por el modelo y los experimentales, consideramos que Oh y Silverstain (1998) utilizaron una concentración de

N-NOx de entrada constante en cada uno de sus experimentos, entonces podemos decir que $VN_r/VN_{r_{\max}} = \text{Ef. remoción}/\text{Ef. remoción}_{\max}$ según se demuestra a continuación:

$$\frac{E_{N-NOx}}{E_{N-NOx_{\max}}} = \frac{\left(\frac{[N-NOx]_A - [N-NOx]_E}{[N-NOx]_A}\right)}{\left(\frac{[N-NOx]_A - [N-NOx]_E}{[N-NOx]_A}\right)_{\max}} = \frac{([N-NOx]_A - [N-NOx]_E)}{([N-NOx]_A - [N-NOx]_E)_{\max}} \quad (4.1)$$

$$\frac{VCNr}{VCNr_{\max}} = \frac{(VCN_A - VCN_E)}{(VCN_A - VCN_E)_{\max}} = \frac{\left(\frac{[N-NOx]_A - [N-NOx]_E}{TRH}\right)}{\left(\frac{[N-NOx]_A - [N-NOx]_E}{TRH}\right)_{\max}} = \frac{([N-NOx]_A - [N-NOx]_E)}{([N-NOx]_A - [N-NOx]_E)_{\max}} \quad (4.2)$$

Por lo tanto:

$$\frac{VCNr}{VCNr_{\max}} = \frac{E_{N-NOx}}{E_{N-NOx_{\max}}} \quad (4.3)$$

* para ver definiciones ir a sección 3.6

De esta forma, podemos comparar las disminuciones de velocidad de reacción predichas por el modelo propuesto por Oh y Silverstain (1998) con nuestras disminuciones en la eficiencia de remoción calculadas con datos empíricos.

Por otra parte, Moya et al. (2011), elaboraron un modelo matemático para reactores filtro compactos anóxico/anaeróbico/aeróbicos validado con datos experimentales obtenidos durante el desarrollo de este trabajo. Lo interesante es que mediante este modelo no se observó inhibición de la desnitrificación por OD recirculado, explicándose este fenómeno como un rápido consumo de OD a la entrada del reactor por oxidación aeróbica de materia orgánica, que inmediatamente da paso a las reacciones anóxicas/anaeróbicas siguientes.

De esta forma, y comparando los resultados obtenidos por ambos modelos más los datos experimentales tenemos la tabla 4-2:

Tabla 4-2: Comparación de los porcentajes de inhibición de la desnitrificación obtenidos experimentalmente y por modelos matemáticos.

Fuente	Inhibición desnitrificación (%) R-2		Inhibición desnitrificación (%) R-10	
	1° quinto reactor	2° quinto reactor	1° quinto reactor	2° quinto reactor
Datos Experimentales	19,6	0	0,7	0
Oh y Silverstain (1998)	66-73	-	23-26	-
Moya et al. (2011)	0	0	0	0

Los porcentajes de inhibición predichos por el modelo de Oh y Silverstain (1998) con biomasa suspendida distan bastante de los obtenidos con datos experimentales (46,4 a 53,4% de desviación en el reactor R-2 y 22,3 a 25,3% en el reactor R-10, evaluados al primer quinto), lo cual nos indica que los sistemas de tratamiento anóxico basados en biomasa inmovilizada responden más eficientemente ante la presencia de OD. En cambio la desviación obtenida por el modelo de Moya et al. (2011) fue tan sólo de 19,6% para el reactor R-2 y 0,7% para el reactor R-10 al primer quinto y de 0% al segundo quinto en ambos reactores, siendo entonces éste modelo más apropiado para predecir el efecto del OD recirculado sobre la zona anóxica-desnitrificante.

De este modo y recapitulando los resultados obtenidos mediante análisis físico-químicos, tenemos un sistema compacto de tratamiento de Riles pesqueros que abarca los procesos de desnitrificación, digestión anaeróbica y nitrificación en una sola unidad; que a su vez responde de forma eficiente con remociones de TOC superiores al 98% y remoción de NT de 94% con una razón de recirculación igual a 10, bajo condiciones de alimentación cercanas a un TOC de 750 mg/L, un TRH de 2d, y un RIL proteico de razón TOC/NTK $\leq 2,6$ y que a su vez, dada la presencia de biopelículas, mantiene su eficiencia en la zona anóxica ante la presencia de oxígeno disuelto a concentraciones que en sistemas de biomasa libre producirían altas inhibiciones. Esto nos da claros indicios de la factibilidad real de este novedoso sistema propuesto, cuya operación bajo las condiciones anteriormente mencionadas presenta altas eficiencias de remoción de compuestos nitrogenados y carbonáceos.

4.4. Análisis poblacional de rectores filtro

El estudio de comunidades microbianas realizado mediante técnicas moleculares consistentes en extracción de DNA, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una región del gen rDNA 16S de Bacterias y Archaeas, y posterior DGGE (electroforesis en gel con gradiente denaturante) fueron llevados a cabo con éxito. En las Figuras 4-6, 4-7 y 4-8 se pueden observar las bandas obtenidas de la extracción de DNA, PCR al gen rDNA 16S de Eubacterias (producto de 1500 pb) y Archaeas (producto de 900 pb) de muestras obtenidas de los reactores alimentados con hidrolizado. En la Figura 4-9 se observan las bandas obtenidas de PCR anidadas realizadas a los productos de PCR full 16S de Eubacterias y Archaeas, obteniendo productos de 200 y 600 pb respectivamente. Los protocolos y programas de PCR utilizados se encuentran descritos en la sección 3.7.

Se observa la presencia de algunas bandas tenues inespecíficas en la PCR de rDNA 16S de Archaeas (Fig. 4-8), sin embargo estas bandas no fueron amplificadas al realizar la PCR anidada.

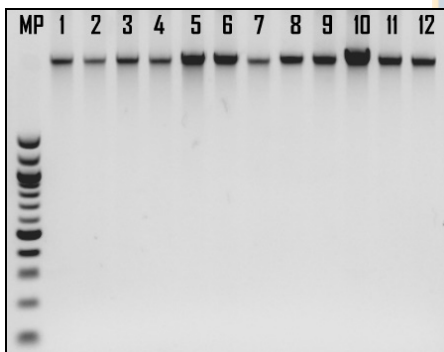


Figura 4-6: Gel de agarosa (1.5% p/v) teñido con RedGel (0,02% v/v) mostrando producto de extracción de DNA total. Carriles 1 a 4: Muestras estratificadas del reactor R-10. Carriles 5 a 8: Muestras estratificadas del reactor R-0. Carriles 9 a 12: muestras estratificadas del reactor R-2. MP: marcador de peso molecular.

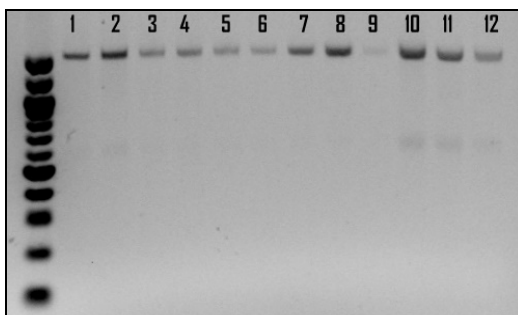


Figura 4-7: Gel de agarosa (1.5% p/v) teñido con RedGel (0,02% v/v) mostrando productos de PCR full del gen 16S rDNA amplificado con los primers eub 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y eub 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Carriles idem a Figura 4-6.

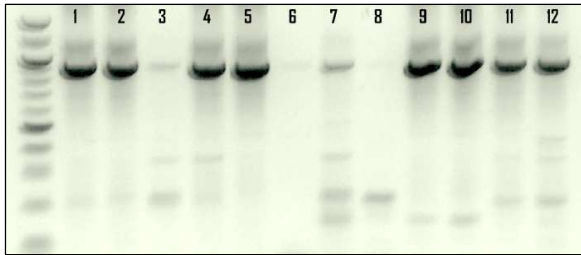


Figura 4-8: Gel de agarosa (1.5% p/v) teñido con RedGel (0,02% v/v) mostrando productos de PCR full archaeas del gen 16S rDNA amplificado con los primers Arch 21f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') y Arch 958R. Carriles idem a Figura 4-6.

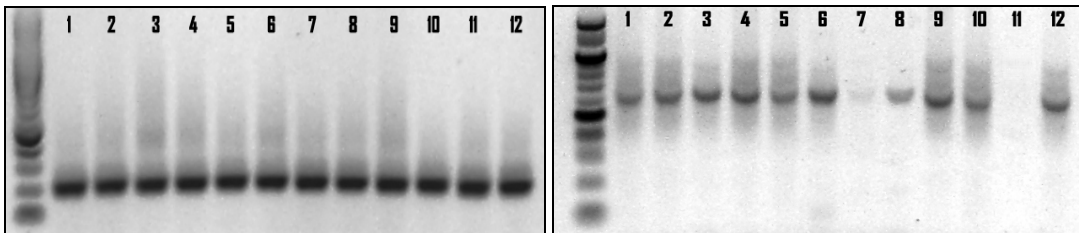


Figura 4-9: Gel de agarosa (1.5% p/v) teñido con RedGel (0,02% v/v) mostrando productos de nested PCR de (izq) región V3 de 16S rDNA amplificada con los primers P3 534r y (der) primers Arch 958r y 344f (GC- clamp). Carriles idem a Figura 4-6.

4.4.1. Comunidades de Eubacterias

En la figura 4-10 se puede observar el patrón de bandeo obtenido en DGGE de eubacterias. Las bandas más intensas indicadas en la figura fueron cortadas, purificadas, reamplificadas y secuenciadas para determinar las comunidades presentes en cada reactor, su disposición y el efecto que tienen las distintas condiciones de recirculación probadas sobre la disposición de estas comunidades.

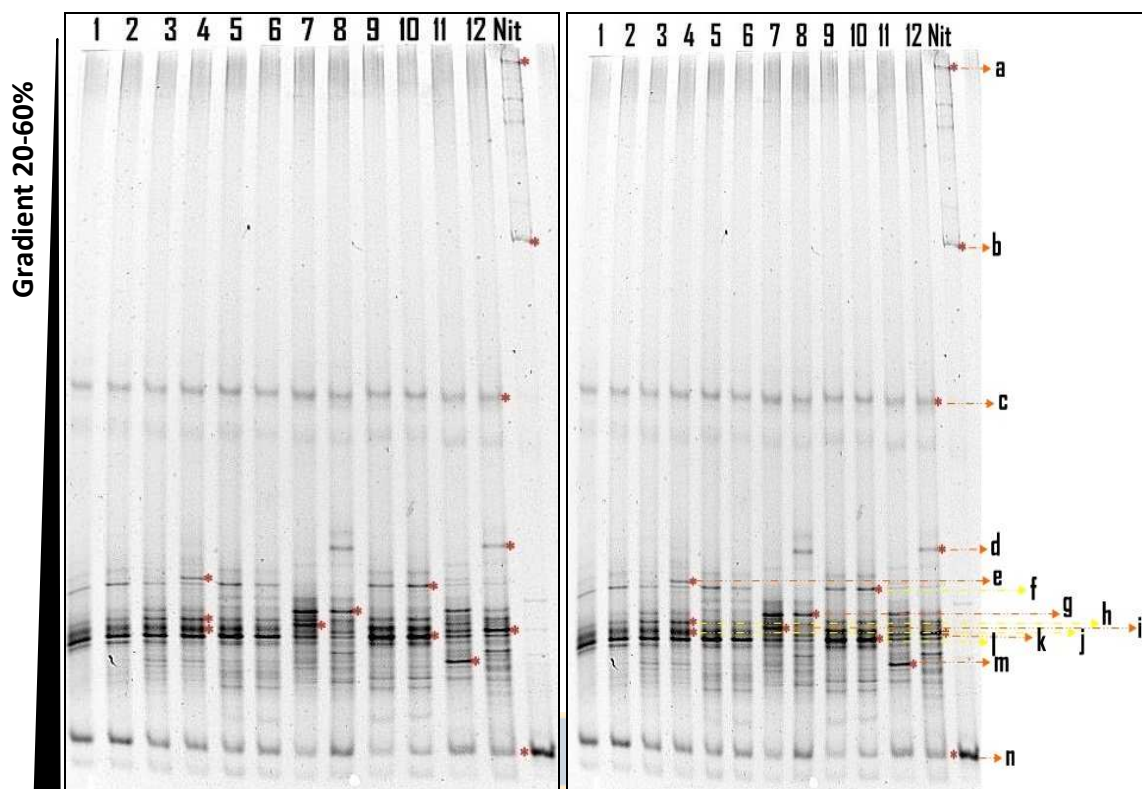


Figura 4-10: DGGE de productos de PCR anidada, amplificados con los primers P3 (GC- clamp) y 534r. Carriles 1 a 4: Muestras estratificadas del reactor R-10. Carriles 5 a 8: Muestras estratificadas del reactor R-0. Carriles 9 a 12: muestras estratificadas del reactor R-2, carril Nit: muestra tomada del reactor de inóculo nitrificante. A la izq se muestra la imagen original con asteriscos rojos que indican las bandas que fueron cortadas, reamplificadas, purificadas y secuenciadas. A la derecha se muestra la misma imagen asignando una letra a cada patrón de bandeo.

El perfil de bandeo de las comunidades bacterianas presentes en los reactores, obtenidas mediante DGGE, revelaron la presencia de 14 bandas predominantes marcadas de la “a” a la “n” según se muestra en la Figura 4-10. Los alineamientos con mayor porcentaje de similitud obtenidos desde GenBank mediante la herramienta Blast de NCBI para las secuencias encontradas por DGGE mostraron la presencia de bacterias no cultivables (2 del grupo gamma proteobacteria, Xanthomonadales, Nitrosomonas y 4 bacterias no cultivables) y bacterias cultivables (Lysobacter, Methylomonas, 2 Thermotogales, Thioalkalivibrio y Sulfurimonas). El detalle de la identificación de las bandas se puede observar en la tabla siguiente (tabla 4-3):

Tabla 4-3: Identificación de bandas secuenciadas obtenidas desde DGGE.

bandas	Secuencia mas cercana	N° acceso GenBank
a	Uncultured gamma proteobacterium clone Nitri_1_g9 16S ribosomal RNA gene	HM193112.1
b	Uncultured Xanthomonadales bacterium clone S08 16S ribosomal RNA gene	FJ786014.1
c	Lysobacter sp. ZS79 16S ribosomal RNA gene	HQ315827.1
d	Uncultured Nitrosomonas sp. partial 16S rRNA gene, clone DGGE band FM1	AJ628354.1
e	Uncultured bacterium isolate SSCP band Ej17 16S ribosomal RNA gene	DQ682517.1
f	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate DGGE band	FN550729.1
g	Methylomonas rubra NCIMB 11913 16S ribosomal RNA gene	AF304194.1
h	Thermotogales bacterium mesG1.Ag.4.2 ctg89	AEDC01000003.1
i	Thioalkalivibrio sp. HL-EbGR7	NC_011901.1
j	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate DGGE band 161_20-2	FN550568.1
k	Uncultured gamma proteobacterium isolate DGGE gel band VF-92 16S ribosomal RNA gene	EU594297.1
l	Thermotogaceae bacterium enrichment culture clone B312130 16S ribosomal RNA gene	HQ133017.1
m	Sulfurimonas denitrificans DSM 1251	NC_007575.1
n	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: nsmpVI20	AB212894.1

Todas las identificaciones referidas fueron confirmadas con 75-99% de similitud.

Mediante el programa ImageJ, cada banda obtenida en DGGE fue seleccionada para medir su intensidad de brillo, restando siempre el brillo de fondo o “ruido” de la imagen, para obtener una medición más precisa de la intensidad de cada banda. Posteriormente, se calcularon porcentajes de intensidad para cada banda en cada carril, tomando como 100% la suma de intensidades en cada carril. De esta forma, se construyó la Tabla 4-4 que nos indica presencia o ausencia de banda en cada carril además del porcentaje de intensidad de brillo que posee cada una.

Tabla 4-4: Intensidades de banda relativas en (%) extraídas mediante el programa ImageJ.

carril banda	1 (TM1 R10)	2 (TM2 R10)	3 (TM3 R10)	4 (TM4 R10)	5 (TM1 R0)	6 (TM2 R0)	7 (TM3 R0)	8 (TM4 R0)	9 (TM1 R2)	10 (TM2 R2)	11 (TM3 R2)	12 (TM4 R2)	Nit
a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,4
b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18,7
c	5,3	5,2	3,9	4,1	5,8	5,7	3,9	4,8	5,3	5,6	2,9	3,9	-
d	-	-	-	-	-	-	-	6,9	-	-	-	5,6	-
e	-	-	-	7,7	-	-	-	-	-	-	2,7	2,0	-
f	7,5	12,2	5,8	5,8	11,6	6,9	-	-	10,8	13,9	2,9	3,3	-
g	-	-	9,2	7,7	-	-	20,0	18,8	-	-	13,8	9,6	-
h	13,6	13,2	15,8	15,6	15,2	14,4	16,5	15,7	17,8	16,9	11,3	15,7	-
i	-	-	-	-	-	-	18,5	-	-	-	13,9	-	-
j	25,9	22,9	21,6	21,8	23,5	21,6	-	-	28,0	26,6	-	-	-
k	-	-	-	-	-	-	14,5	17,5	-	-	15,7	24,9	4,1
l	33,2	32,2	27,0	24,6	28,9	34,3	15,2	15,5	32,5	30,2	14,9	16,9	-
m	-	-	8,6	5,7	7,0	7,0	7,4	10,0	-	-	15,5	10,1	-
n	14,6	14,4	8,1	6,9	8,0	10,1	3,9	10,8	5,6	6,8	6,4	7,9	60,8

* Carriles 1 a 4: Muestras estratificadas del reactor R-10, carriles 5 a 8: Muestras estratificadas del reactor R-0, carriles 9 a 12: muestras estratificadas del reactor R-2, carril Nit: muestra del reactor de inóculo nitrificante. TM1,2,3,4: Toma muestra 1,2,3 y 4. R0: reactor sin reciclo; R2: Reactor con R=2; R10: Reactor con R=10.

A simple vista podemos notar que las dos primeras bandas a y b identificadas como bacterias no cultivables clon nitrificante y Xanthomonadales están presentes en el reactor de inóculo nitrificante pero no así en los reactores. Sin embargo, las bandas k y n encontradas también en el reactor nitrificante e identificadas como gamma proteobacterium no cultivable y bacteria no cultivable están presentes en los carriles 7-8 y 11-12 para la banda k (zona aeróbica de reactores R-0 y R-2 respectivamente), y en todos los carriles para la banda n. Si bien estas bandas (k y n) no pudieron ser identificadas a la altura de género, (debido muy probablemente a la alta cantidad de especies no cultivables que debieran haber en una comunidad compleja propia de un sistema de tratamiento de RILes), la presencia de éstas en el reactor nitrificante nos da indicios de que es muy probable de que se trate de especies nitrificantes.

Por otra parte, se puede observar que las bandas más representadas en los tres reactores (además de la banda n), son las bandas c, h y l, correspondientes al género *Lysobacter sp.*, al orden Thermotogales y familia Thermotogaceae respectivamente. *Lysobacter sp.* ha sido descrito como un habitante ubicuo de agua y suelo; sin embargo también se han logrado aislar

de otros diversos ambientes, como por ejemplo de gránulos anaeróbicos provenientes de un reactor UASB (Bae et al., 2005).

Thermotogales por su parte, son un grupo bacteriano donde todas las especies cultivables conocidas son anaeróbicas y termófilas o hipertermófilas; sin embargo, se ha comprobado la existencia de linajes de este grupo que habitan ambientes mesotérmicos, observándose su presencia en variados ambientes como biorreactores y fermentadores (Nesbø et al., 2010). Muchas especies de este grupo utilizan el sulfuro como aceptor de electrones en su metabolismo generando H_2S . Pueden utilizar diversos sustratos, carbohidratos complejos, proteínas, incluso desechos orgánicos, generando gas hidrógeno como subproducto (van Ooteghem et al., 2001).

Con respecto a las otras bacterias identificadas fuera de las bacterias no cultivables sin identificación aún en GenBank, se encuentran *Nitrosomonas sp.*, *Methylomonas rubra*, *Thioalkalivibrio sp.* y *Sulfurimonas denitrificans*. Estas corresponden a bacterias amonio-oxidante, metanotrófica, oxidante de sulfuro y oxidante de sulfuro y nitrito respectivamente.

Para una visión más esquemática de los análisis de identificación se construyeron las figuras 4-11, 4-12 y 4-13, donde se puede apreciar el porcentaje de cada bacteria identificada para cada altura de reactor de donde se extrajo muestra. En ellas podemos apreciar la diversidad de bacterias encontradas a cada altura de los reactores, además de la abundancia relativa de estas en cada zona. A las bacterias identificadas como bacterias no cultivables (uncultured bacterium) se les agregó la letra correspondiente a la banda de procedencia para evitar confusiones.

Observamos que en el reactor R-0 (Figura 4-11) encontramos presencia de bacterias del orden Thermotogales a lo largo de todo el reactor, estas bacterias reductoras del azufre nos indican que éste, así como la emisión de sulfuro de hidrógeno está presente también en todo el reactor, lo cual es evidenciado por el fuerte olor a huevo podrido característico de este gas, que poseen las muestras al ser tomadas del reactor. Por otra parte, encontramos la bacteria *Sulfurimonas denitrificans* también a lo largo de todo el reactor. Esta bacteria quimiolitotrofa probablemente pudiera estar estrechamente asociada al metabolismo de Thermotogales, dado que el H_2S producido por estos últimos es aprovechado por esta bacteria oxidante de sulfuro y que a su vez acopla esta oxidación con la reducción del nitrato (desnitrificación) liberando a su vez nitrógeno gaseoso. A su vez encontramos la bacteria *Thioalkalivibrio sp.* en el tercer toma

muestra (comienzo de zona aeróbica) también oxidante de sulfuro. Resulta interesante como estas bacterias anaeróbicas están presentes tanto en la zona anaeróbica como aeróbica del reactor, lo cual es atribuible a la presencia de biopelículas, las cuales permiten la presencia de zonas anóxicas en la zona interna de estos incluso en soportes ubicados en la zona aeróbica, es decir, existe una estratificación en la biopelícula desde la base del soporte a la zona externa de la biopelícula, además de la estratificación a lo largo del reactor estudiada en este trabajo. El hallazgo de bacterias reductoras de nitrato en la zona aeróbica, nos presenta una clara explicación al fenómeno observado en la Figura 4-5, donde notamos en los reactores alimentados con hidrolizado que efectivamente nitrificaron (R-0 y R-2), que la suma de nitritos y nitratos ($N-NO_x$) producidos en la zona aeróbica (144 y 97 $mgN-NO_x/L$ en los reactores R-0 y R-10 respectivamente) fue menor al amonio descargado en la zona aeróbica (238 y 211 $mgTAN/L$ en los reactores R-0 y R-2 respectivamente), es decir, se observó una “pérdida” de nitrógeno de 39,5 y 54% en la zona aeróbica de los reactores R-0 y R-2, respectivamente. Esto pudiera ser atribuible a asimilación o a stripping (arrastre de amoníaco gaseoso), sin embargo, al tener estos antecedentes microbiológicos de la presencia de bacterias desnitrificantes quimiolitotóxicas en la zona aeróbica, podemos atribuir esta menor concentración de $N-NO_x$ a la descarga, a la reducción de éstos vía desnitrificación en la zona aeróbica del reactor, como será discutido más adelante. Un fenómeno similar al descrito anteriormente se observa en los reactores R-2 y R-10 (Figuras 4-12 y 4-13) con presencia de *Thermotogales* a lo largo de todo el reactor y *Sulfurimonas denitrificans* asociadas pero solo en la zona aeróbica.

Otra distribución interesante observable en las figuras, es la presencia de *Nitrosomonas sp.* en la zona aeróbica superior de los reactores R-0 y R-2 (ver Figuras 4-11 y 4-12) así como también de *Uncultured gamma proteobacterium “k”*, encontrada también en el reactor de inóculo nitrificante, por lo que se supone también una bacteria nitrificante no cultivable. Esta última también está presente solo en la zona aeróbica de los reactores R-0 y R-2, lo cual explicaría la prácticamente nula nitrificación en el reactor R-10 donde ninguna de estas bacterias está presente. Sí se encontró presencia en todos los reactores y a todas las alturas de una bacteria no cultivable “n” presente también en el reactor nitrificante, sin embargo, se desconoce que rol pudiera estar cumpliendo esta bacteria, pues al no estar identificada y dada su ubicuidad a lo largo de todos los reactores, no calza con un perfil nitrificante por ser éstas aerobias estrictas.

Otra bacteria encontrada a lo largo de los tres reactores fue *Lysobacter sp.*, bacteria aeróbica quimiorganotrófica (Christensen 1978), género ampliamente utilizado para la producción de enzimas extracelulares y antibióticos, pero como se mencionó anteriormente, han sido aislados de diversos ambientes, incluso desde gránulos anaeróbicos provenientes de un reactor UASB (Bae et al. 2005), sin embargo se desconoce su rol a nivel ecológico.

También encontramos la bacteria *Methylomonas rubra* exclusivamente en la zona aeróbica de los tres reactores. El género *Methylomonas sp.* y en general las bacterias metanotróficas son aerobias estrictas, requieren del oxígeno para la oxidación del metano a dióxido de carbono (Colby et al. 1975), es por esto que la encontramos sólo en la zona aeróbica de los reactores. Los altos porcentajes encontrados de esta bacteria en los reactores nos da indicios de una alta producción de metano, el cual no fue posible medir dado el alto flujo de aire inyectado a los reactores, lo que hizo imposible detectar los gases producidos en el reactor en las muestras de gas tomadas a la salida del reactor. Por otra parte, si se quisiera utilizar el gas metano producido en los reactores como biogas, esto nos indica que para este tipo de sistemas, este debe ser recolectado antes de la etapa aeróbica, pues esta zona permite el desarrollo de bacterias metanotróficas que oxidan el metano a CO₂.

Finalmente resulta interesante observar la distribución de las dos bacterias no cultivables “f” y “j”. Notamos que en el reactor R-0 (Figura 4-11) éstas se encuentran presentes exclusivamente en la zona anaeróbica del reactor, sumando ambas altos porcentajes de 35 y 29% en el primer y segundo toma muestra, respectivamente. En el reactor R-2, también suman altos porcentajes en estos dos toma muestras (39 y 41%) sin embargo, también encontramos a la bacteria “f” en la zona aeróbica con porcentajes de 3% en ambos toma muestras superiores. Y en el reactor R-10 la estratificación de estas bacterias se pierde aún más, obteniéndose porcentajes de 33, 35, 28 y 6% para el primer, segundo, tercer y cuarto toma muestra, respectivamente. Con esta observación, entonces podemos pensar que probablemente estas bacterias estén asociadas a un metabolismo anaeróbico, probablemente heterótrofas, que requieren materia orgánica disponible en la parte baja del reactor y que ésta al ser abatida, no permite el desarrollo de estas bacterias en la zona superior como es el caso del reactor sin recirculación R-0; sin embargo al aplicar un reciclo, el alejamiento del flujo tipo pistón a uno con tendencia a un RCPA, homogenizaría los compuestos dentro del reactor, y de esta forma permitiría el desarrollo de estas bacterias “f” y “j” a lo largo de todo el reactor, como muestra la

tendencia observada anteriormente de homogenización en la distribución de estas bacterias a mayor razón de reciclo.

Por otra parte, se construyeron los gráficos de la Figura 4-14 para poder apreciar la abundancia total de cada reactor, con los porcentajes relativos de cada microorganismo identificado. Notamos que el reactor que presenta menor abundancia es el reactor de reciclo 10, el cual probablemente debido a la alta recirculación produce una homogenización de la biomasa presente, la cual, debido a fenómenos de competencia, impide el desarrollo de otras especies, como por ejemplo nitrificantes en la zona aeróbica debido a presencia de heterótrofas como se discute en la página 7.



Figura 4-11: Composición porcentual de cada muestra estratificada de biomasa del reactor R-0, Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.

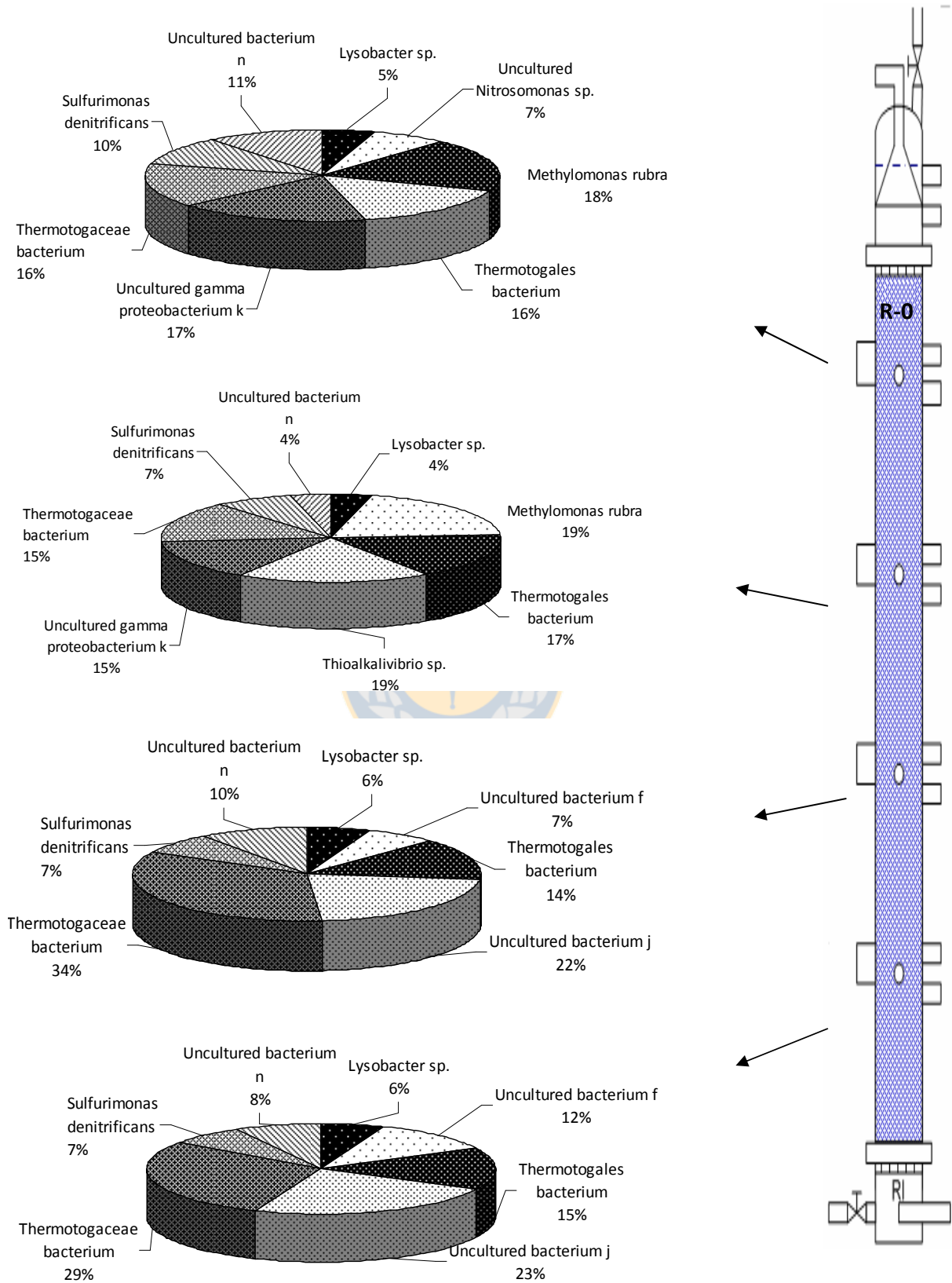


Figura 4-12: Composición porcentual de cada muestra estratificada de biomasa del reactor R-2, Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.

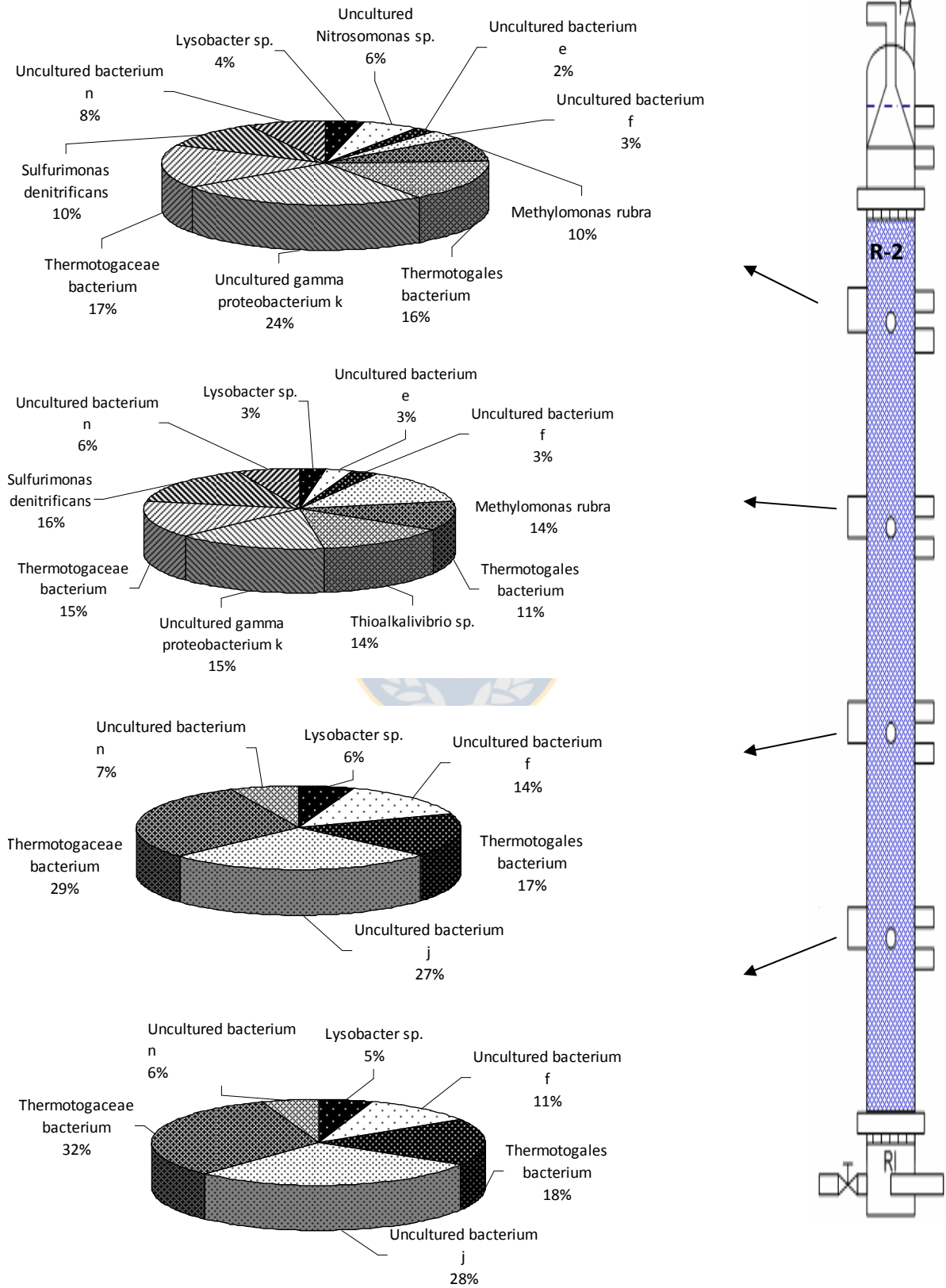
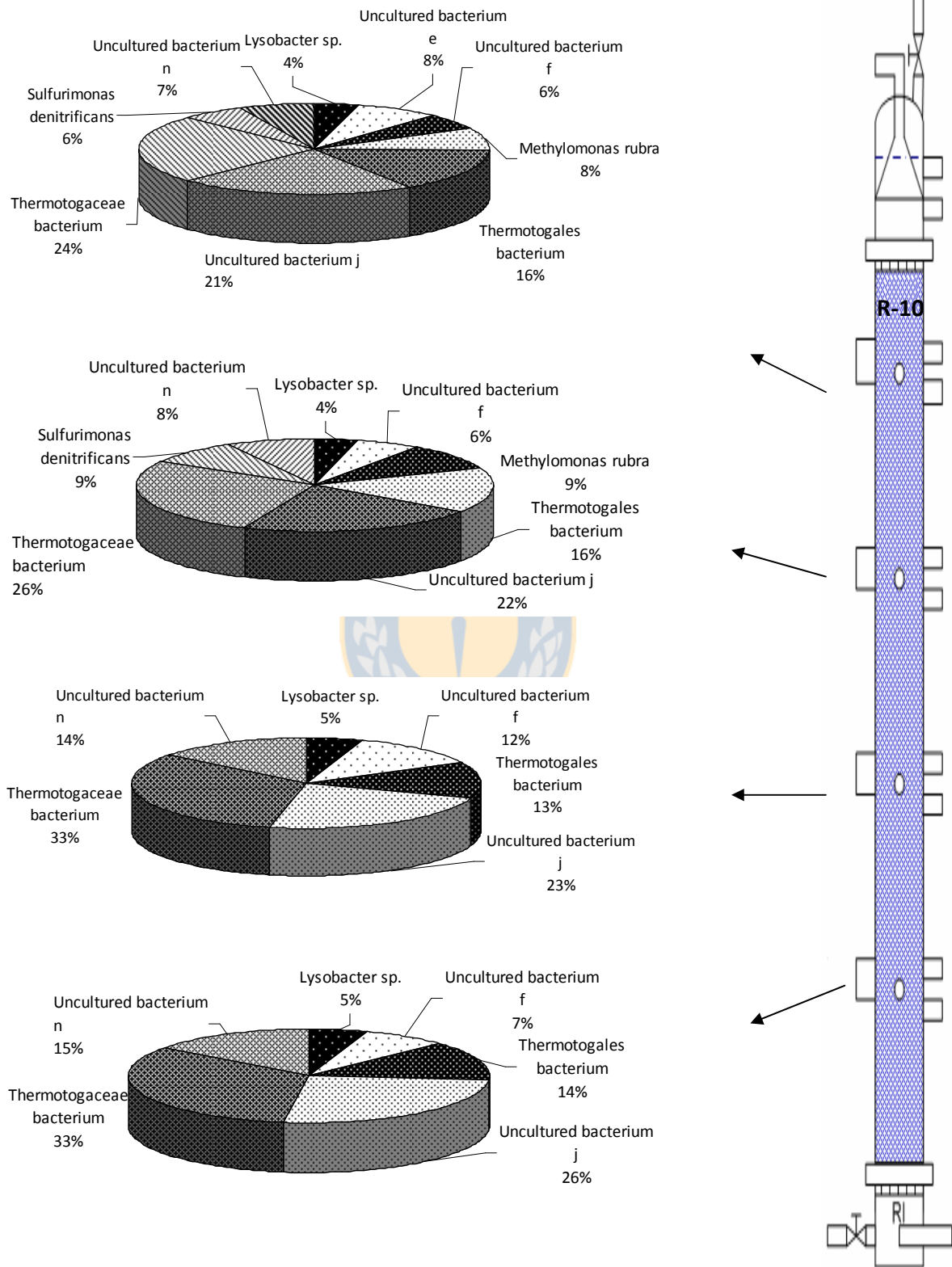
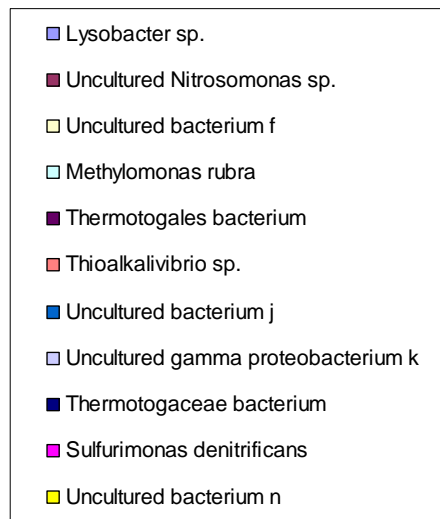
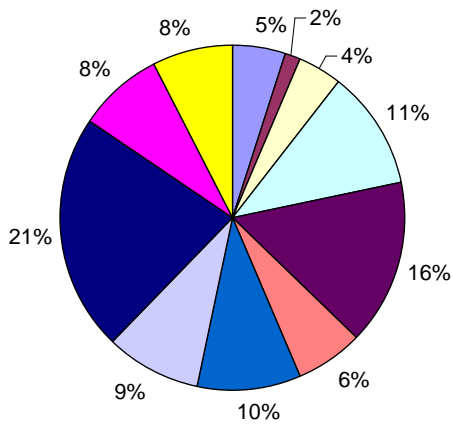


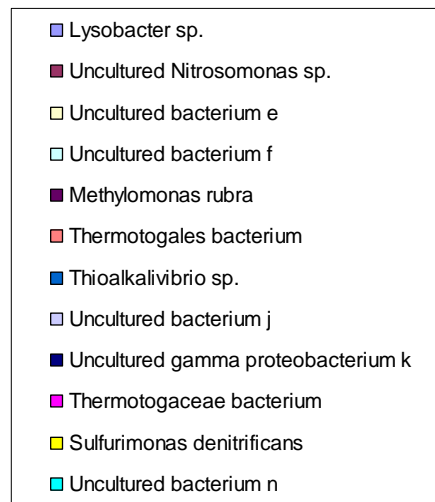
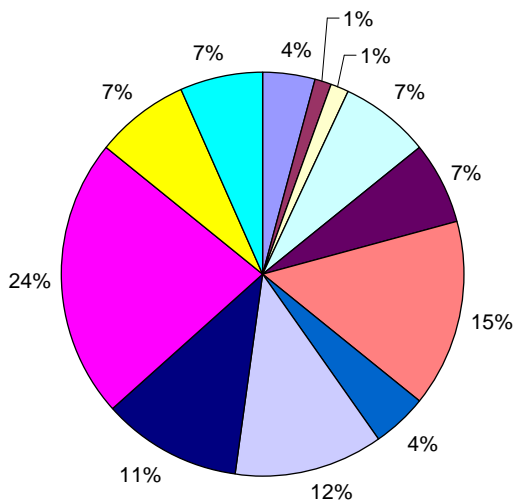
Figura 4-13: Composición porcentual de cada muestra estratificada de biomasa del reactor R-10, Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.



R-0



R-2



R-10

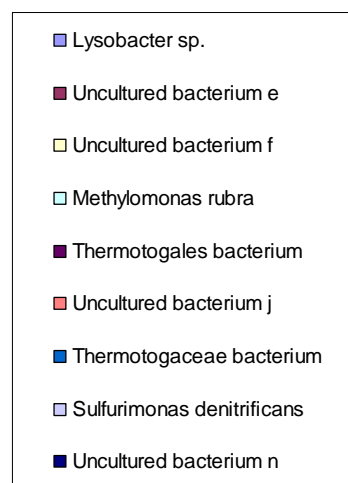
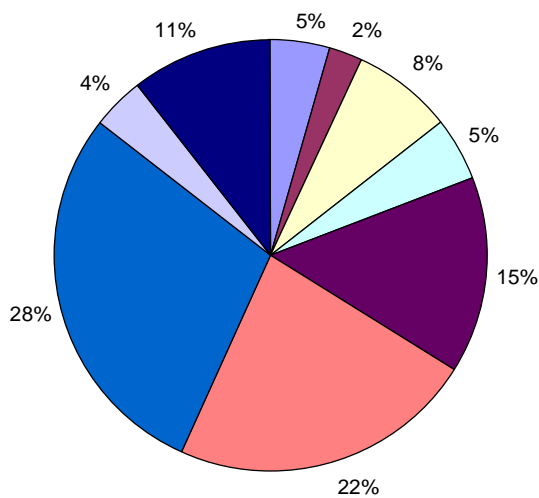


Figura 4-14: Composición porcentual de la abundancia total de microorganismos presentes en cada reactor. Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.

En las figuras anteriores se puede apreciar a simple vista algunas diferencias entre los reactores en su diversidad principalmente, sin embargo, para no caer en comparaciones subjetivas, se utilizó el programa PRIMER 6 para realizar los análisis de comparación de datos. Se realizaron análisis MDS (escalamiento multidimensional) para evaluar la estratificación de los reactores y análisis de Cluster para evaluar el efecto del reciclo sobre las comunidades mediante la comparación de cada zona de los tres reactores.

Mediante análisis MDS se compararon las muestras de:

- carriles 1-2-3-4 correspondientes al reactor R-10 (Figura 4-15)
- carriles 5-6-7-8 correspondientes al reactor R-0 (Figura 4-16)
- carriles 9-10-11-12 correspondientes al reactor R-2 (Figura 4-17)

Al observar la primera figura (Figura 4-15) observamos la alta similitud (80%) entre las 3 primeras zonas del reactor R-10, siendo la cuarta y última zona la más disímil la cual comparte un 60% de similitud con las otras 3 zonas. Esto nos da indicios de poca estratificación en este reactor, sobre todo si lo comparamos con las otras dos figuras (4-16 y 4-17) correspondientes a los reactores R-0 y R-2 respectivamente, las cuales muestran una marcada diferencia entre las dos primeras zonas anaeróbicas y las otras dos zonas aeróbicas. La figura 4-16 correspondiente al reactor R-0 muestra que las dos primeras zonas anaeróbicas (M5 y M6) comparten una similitud de 80%, mientras que las dos últimas aeróbicas (M7 y M8) una similitud de 60%, y a su vez este par de zonas, anaeróbica y aeróbica, entre si son similares sólo en un 50%, lo cual claramente indica una notoria diferencia en la disposición de las comunidades a lo largo de este reactor. Con respecto a la figura 4-17 correspondiente al reactor R-2, se observa el mismo comportamiento que en R-0, donde las dos primeras zonas (M9-M10) así como las dos últimas (M11-M12) comparten una similitud del 80%, sin embargo, las dos anaeróbicas con las dos aeróbicas entre si son similares solo en un 40%, siendo éste el reactor que presenta una mayor diferencia en la disposición de microorganismos entre la zona anaeróbica y la zona aeróbica.

De esta forma podemos afirmar que una alta razón de recirculación sí afecta la estratificación de los microorganismos presentes en un reactor filtro, disminuyendo considerablemente al trabajar con reciclos altos como es el caso de nuestro reactor R-10.

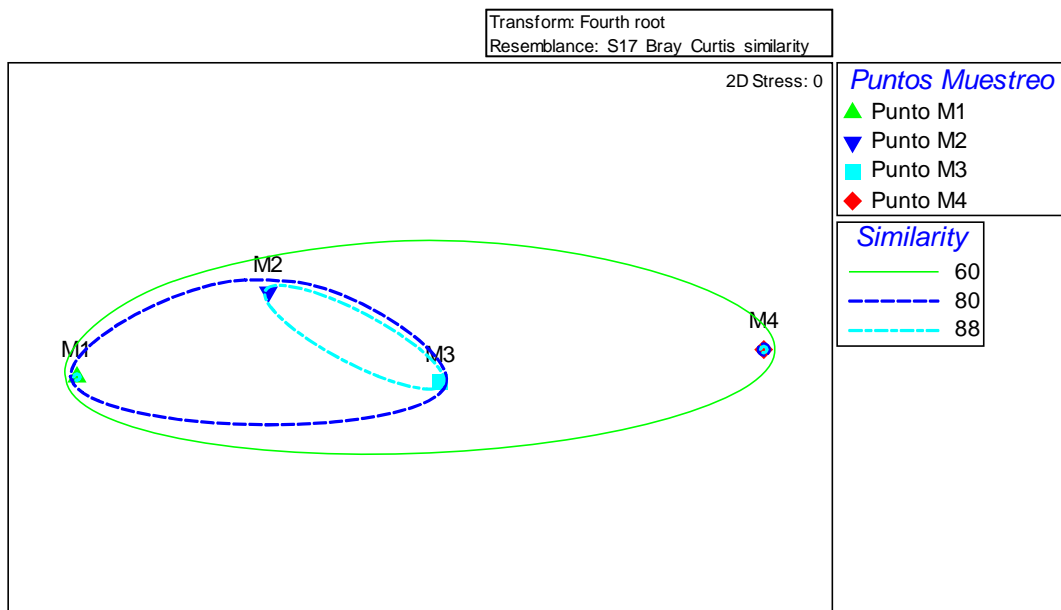


Figura 4-15: Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE 1, 2, 3 y 4 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-10.

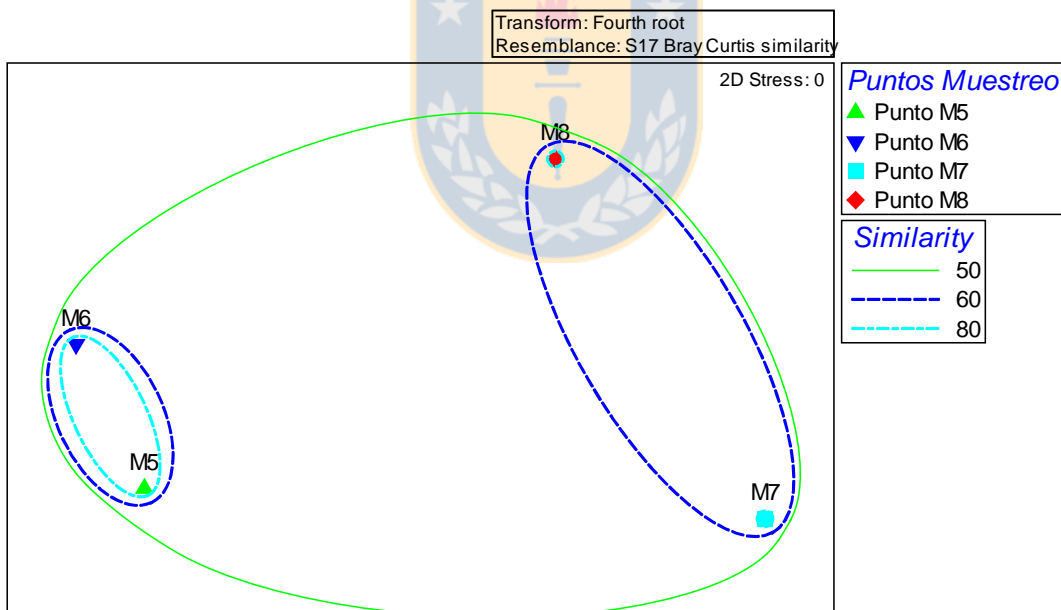


Figura 4-16: Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE 5, 6, 7 y 8 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-0.

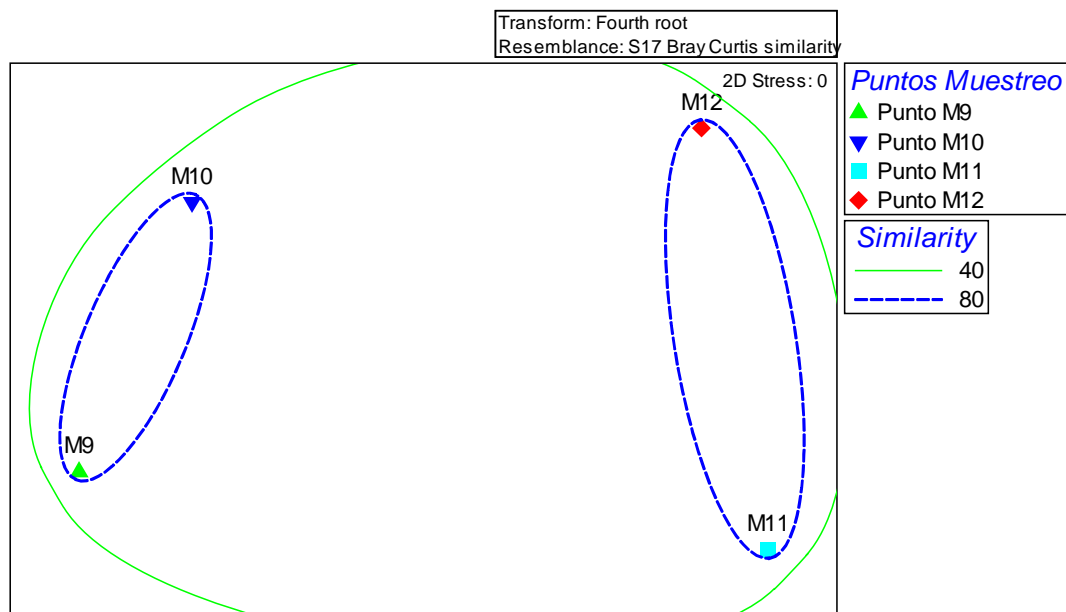


Figura 4-17: Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE 9, 10, 11 y 12 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-2.

En resumen, y considerando los aspectos relevantes para lo cual fueron diseñados estos reactores, (abatimiento de compuestos carbonáceos y nitrogenados), en la figura 18 se agruparon los diversos microorganismos identificados en función de los procesos y roles que cumplen dentro del sistema. De esta forma encontramos heterótrofos, heterótrofos-reductores de S° (responsables de la fermentación anaeróbica de materia orgánica); nitrificantes; desnitrificantes autótrofos (responsables de la desnitrificación en la zona aeróbica); bacterias no cultivables (cuyo rol se puede inferir de acuerdo a su distribución) y sin dejar de lado por supuesto a oxidantes de S° y metanotróficas; que si bien los procesos químicos que llevan a cabo no fueron abarcados en este estudio, su abundancia observada nos indica por una parte que no podemos dejar de lado el ciclo del S° dado que las bacterias oxidantes de S° pueden oxidar a sulfatos el H_2S generado por las bacterias reductoras del S° encontradas en gran abundancia a lo largo de los tres reactores; y por otra parte, las bacterias metanotróficas pueden abatir el gas metano generado en el reactor. Dado que el CH_4 es un gas invernadero, y el H_2S es altamente tóxico, los procesos asociados a estas bacterias se plantean como un interesante tema de estudio.

De acuerdo a los procesos químicos medidos en esta tesis, en la zona anóxica-anaeróbica de los reactores donde ocurre el abatimiento de la materia orgánica y oxidación total de nitritos y nitratos, encontramos predominantemente bacterias heterótrofas (21,7, 21,0 y 22,2% en los reactores R-0, R-2 y R-10 respectivamente) y bacterias no cultivables (13,4, 15,4 y 14,8% en los reactores R-0, R-2 y R-10 respectivamente). Luego en la zona aeróbica, estas bacterias comienzan a ser desplazadas por otras, sobre todo en los reactores R-0 y R-2 que presentaron mayor estratificación, donde la nitrificación observada anteriormente por la oxidación de amonio a NO_x es atribuible a bacterias nitrificantes halladas en porcentajes de 14,0 y 15,0% en la zona aeróbica de estos reactores, mientras que en el reactor R-10 que no mostró nitrificación, sólo se halló 4,2% de bacterias nitrificantes en esta zona. Estas probablemente fueron desplazadas por la abundante presencia de bacterias no cultivables, que muestran una abundancia de 17,9% en esta zona del reactor R-10, en relación al 2,8% de abundancia en el reactor R-2 y nula en R-0. En el caso de las desnitrificantes autótrofas, su abundancia es un tercio y un medio aproximadamente de las nitrificantes halladas en la zona aeróbica de los reactores R-0 y R-2, lo cual explica la “desaparición” de nitrógeno observada mediante análisis químicos, que alcanzó valores de 39,5 y 54% de desaparición en los reactores R-0 y R-2, atribuible a desnitrificación autótrofa.

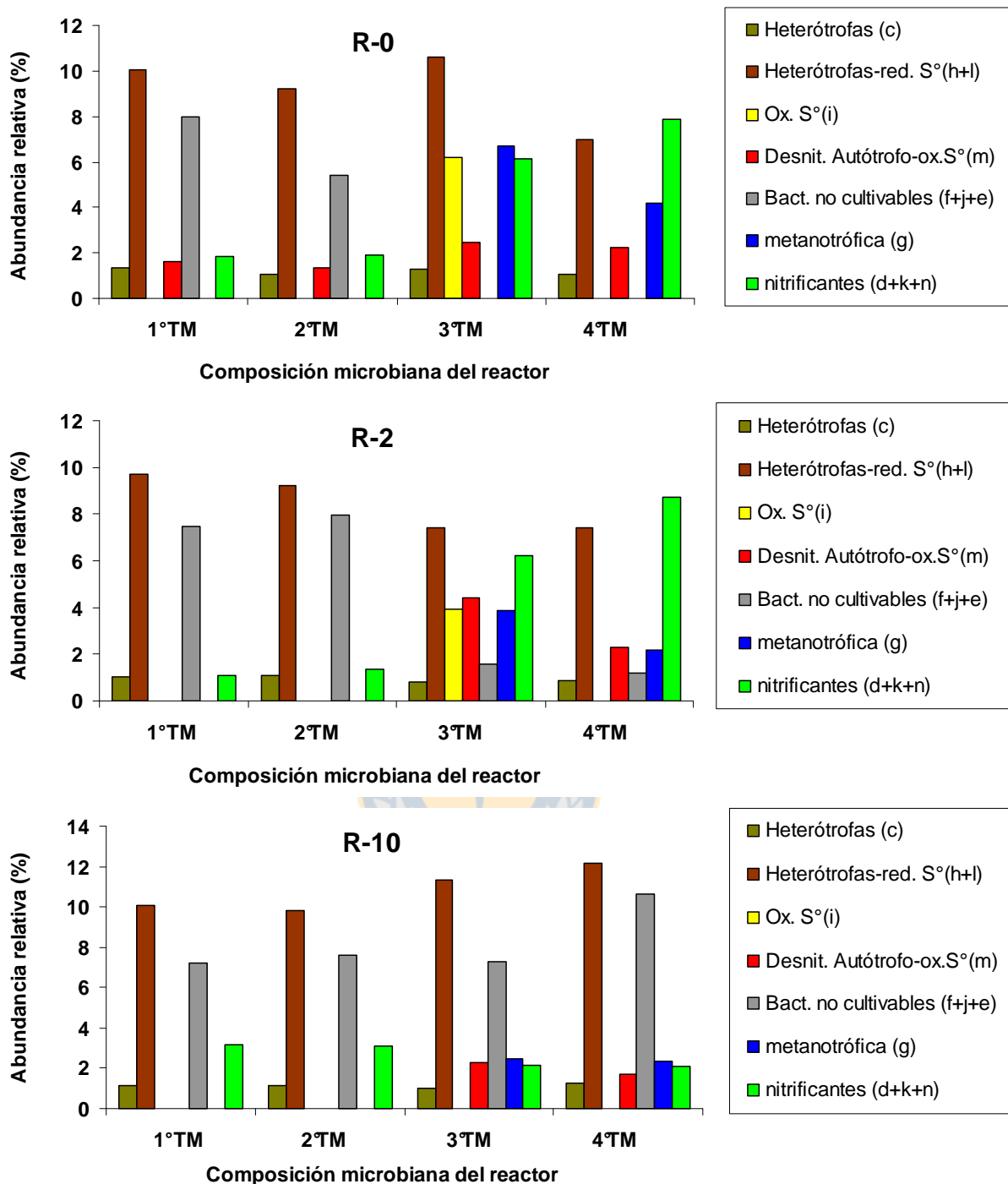


Figura 4-18 : Abundancias relativas para cada toma muestra en cada reactor, de los grupos bacterianos agrupados en: Heterótrofos (c: *Lysobacter sp.*); Heterótrofos-reductores de S° (h+l: Thermotogales + Thermotogaceae); Oxidantes de S° (i: *Thioalkalivibrio sp.*); Desnitrificantes autótrofos-oxidantes de S° (m: *Sulfurimonas denitrificans*); Bacterias no cultivables (bacterias no cultivables “f”, “j” y “e”); Metanotróficas (g: *Methylomonas rubra*); y Nitrificantes (d+k+n: *Nitrosomonas sp.* + gamma proteobacterium + bacteria no cultivable “n”).

Para analizar el efecto del reciclo en cada zona del reactor, se compararon las siguientes muestras mediante análisis de Cluster:

- carriles 1, 5 y 9 correspondientes al primer toma muestra de cada reactor (R-10, R-0 y R-2 respectivamente) (Figura 4-19)
- carriles 2, 6 y 10 correspondientes al segundo toma muestra de cada reactor (R-10, R-0 y R-2 respectivamente) (Figura 4-20)
- carriles 3, 8, 11 correspondientes al tercer toma muestra de cada reactor (R-10, R-0 y R-2 respectivamente) (Figura 4-21)
- 4, 9, 12 correspondientes al cuarto toma muestra de cada reactor (R-10, R-0 y R-2 respectivamente) (Figura 4-22)

Al observar las cuatro figuras podemos observar que el análisis agrupó los reactores R-0 y R-2 dejando fuera del grupo al reactor R-10 en tres de los cuatro puntos de muestreo, es decir en la primera, tercera y cuarta altura o zona de los reactores, los reactores R-0 y R-2 presentan una mayor homogeneidad entre ellos (84, 80 y 82% respectivamente), mientras que R-10 es el más heterogéneo con respecto a los otros dos, presentando diferencias de similitud entre un 7 a un 22% en estas alturas.

En el segundo punto de muestreo el reactor clasificado fuera del grupo más homogéneo corresponde al reactor R-0, sin embargo la diferencia entre el grupo homogéneo (R-2 y R-10) y el grupo heterogéneo (R-0) es menor al 1%.

Notamos que las mayores diferencias de similitud entre el reactor R-10 y los otros dos (R-0 y R-2) se producen en el tercer y cuarto toma muestra (ver Figuras 4-21 y 4-22), es decir en la zona aeróbica de los reactores. Esto es atribuible al efecto del reciclo, pues como se mencionó anteriormente, la alta razón de recirculación produjo un efecto de homogenización de las comunidades bacterianas a lo largo del reactor, disminuyendo así considerablemente la estratificación de éstas, lo cual es consistente y explica además la ausencia de nitrificación en el reactor R-10, dado que un perfil homogéneo indica la presencia de microorganismos heterótrofos en todos los estratos del reactor lo cual resulta negativo para las comunidades nitrificantes por la competencia ejercida por las heterótrofas como se discute en la página 7.

De este modo, el análisis de Cluster ubica al reactor con mayor razón de reciclo como el más disímil, que de acuerdo a los análisis de MDS, es debido a la baja estratificación que

presenta este reactor en relación a los otros dos. Así, concluimos que un alto reciclo produce una reducción promedio de la estratificación microbiana de 11% en el reactor con reciclo 10 en relación a los otros dos (R-0 y R-2).

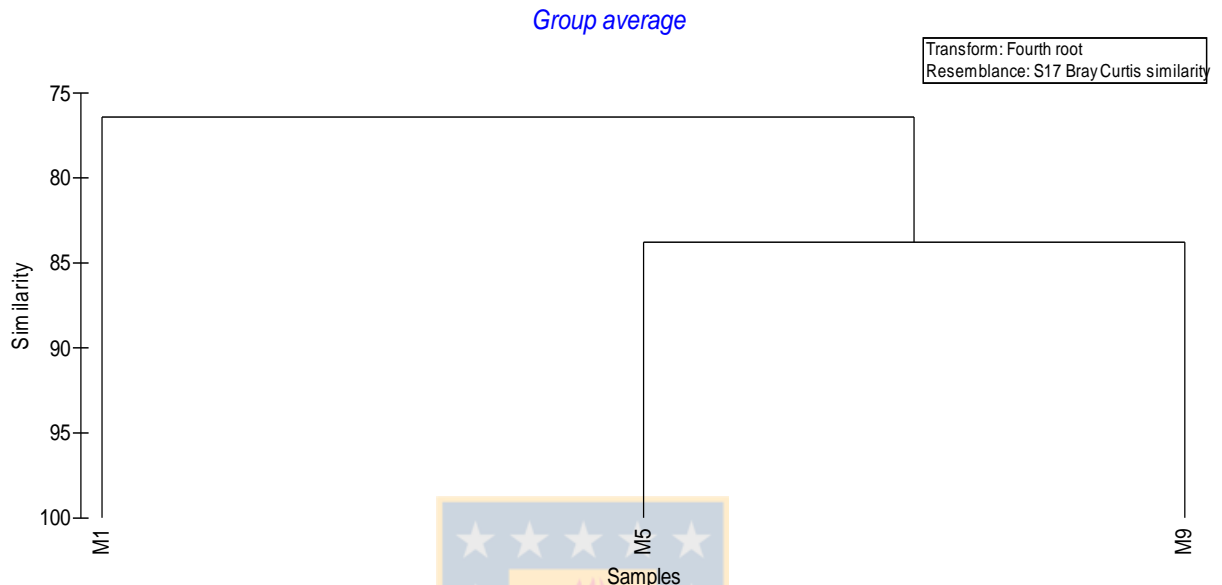


Figura 4-19: Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE 1, 5 y 9 (M1, M5 y M9 en la figura) correspondientes a las muestras del primer toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.

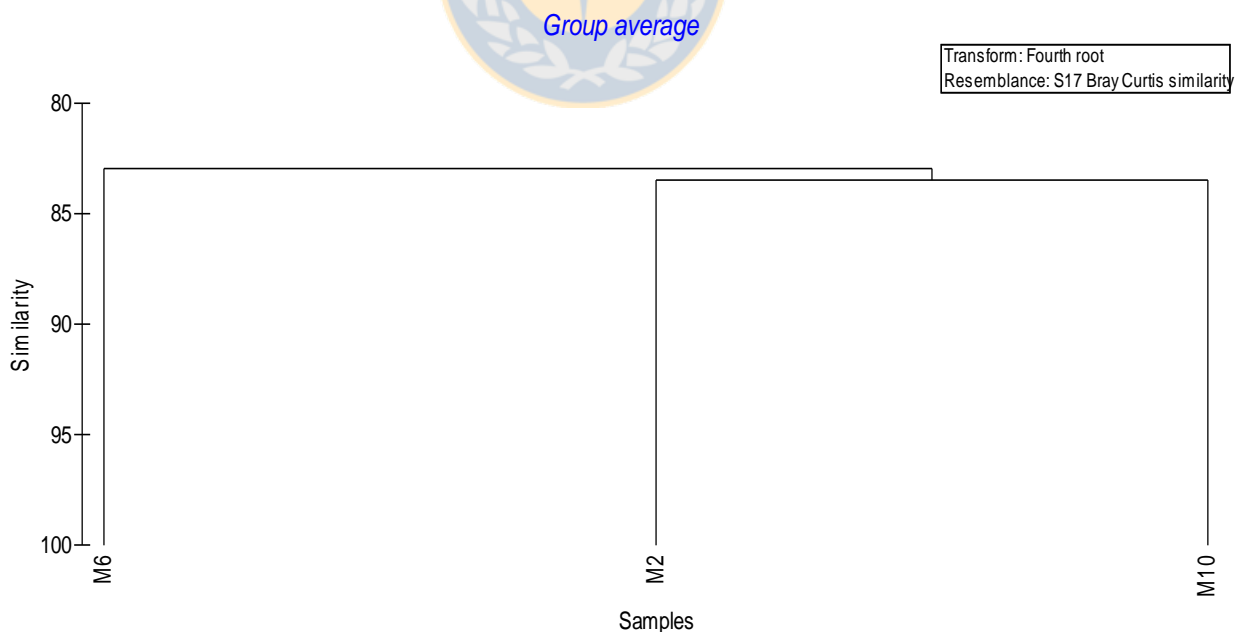


Figura 4-20: Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE 2, 6 y 10 (M2, M6 y M10 en la figura) correspondientes a las muestras del segundo toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.

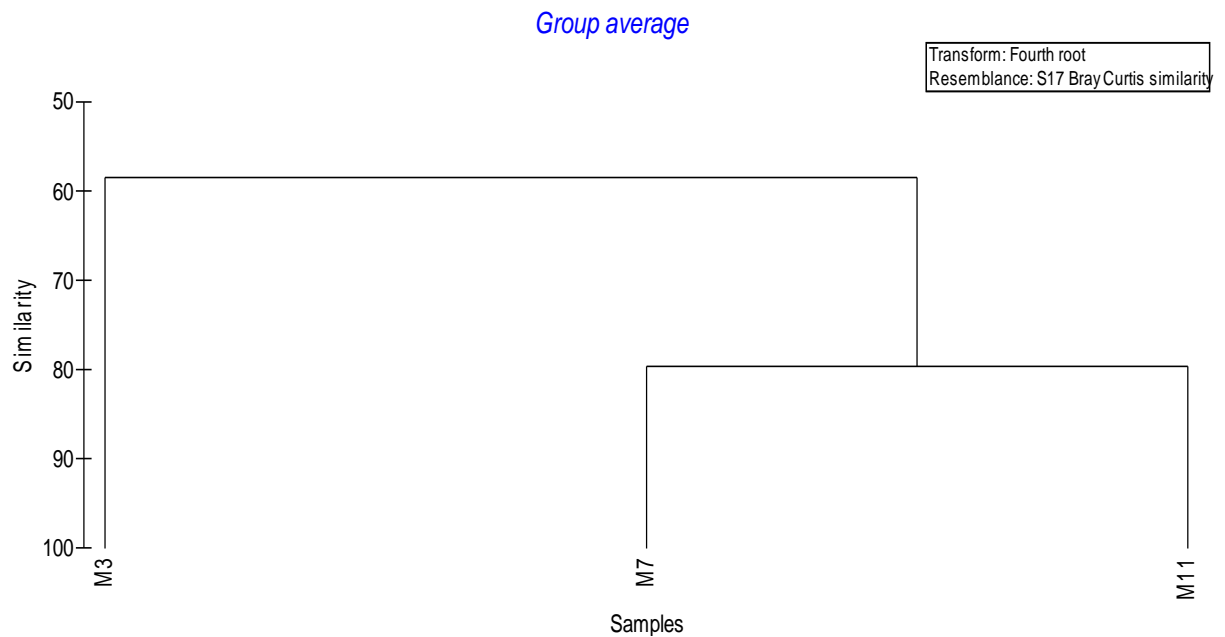


Figura 4-21: Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE 3, 7 y 11 (M3, M7 y M11 en la figura) correspondientes a las muestras del tercer toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.

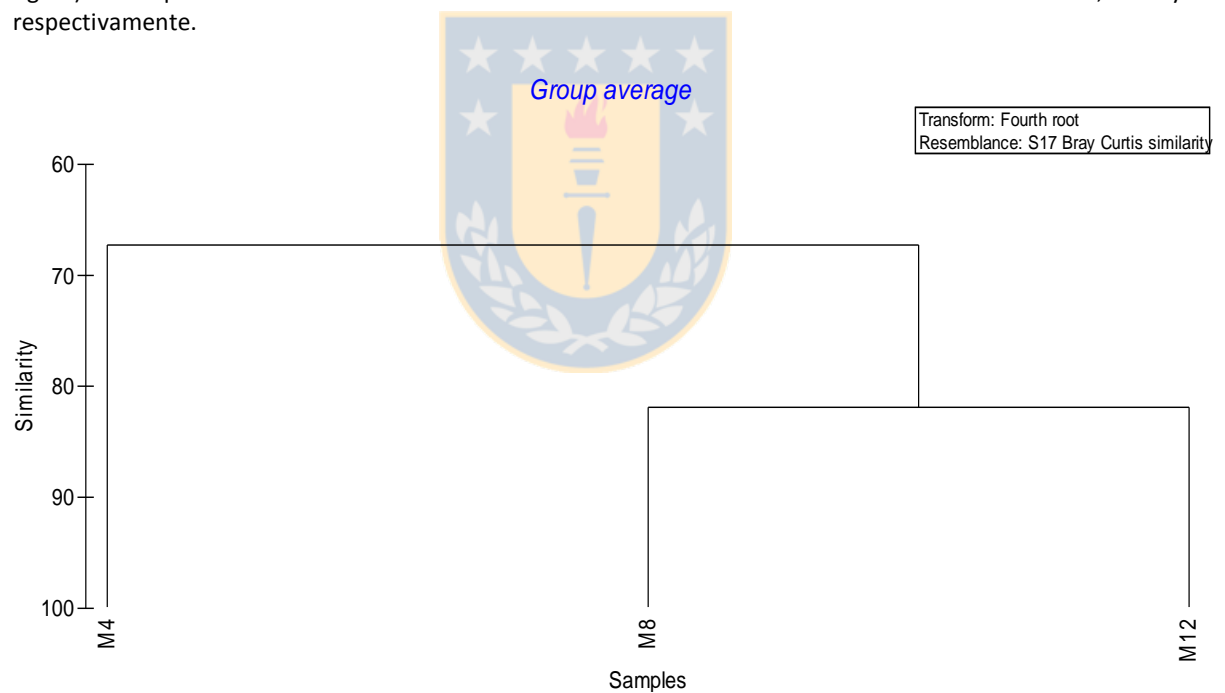


Figura 4-22: Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE 4, 8 y 12 (M4, M8 y M12 en la figura) correspondientes a las muestras del cuarto toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.

4.4.2. Comunidades de Archaeas

La Figura 4-22 muestra el perfil de bandeado obtenido por DGGE de la comunidad de archaeas presente en los 3 reactores filtro. Se pudo observar la presencia de 5 bandas predominantes (A, B, E, F y G en la Figura 4-23) repetidas por lo general en varias de las muestras obtenidas a distintas alturas de cada reactor. Estas bandas indicadas en la figura, al igual que en DGGE de eubacterias, fueron cortadas, purificadas, reamplificadas y secuenciadas para determinar las comunidades presentes en cada reactor, su disposición y el efecto que tienen las distintas condiciones de recirculación probadas sobre la disposición de estas comunidades. Los alineamientos más cercanos obtenidos desde GenBank mediante la herramienta Blast de NCBI para las secuencias encontradas por DGGE mostraron exclusivamente la presencia de tres archaeas metanogénicas: *Methanoculleus marisnigri*, *Methanoplanus petrolearius* y *Methanohalophilus mahii*. El detalle de la identificación de las bandas se puede observar en la tabla 4-5. Todas las identificaciones referidas fueron confirmadas con sobre 90% de similitud.

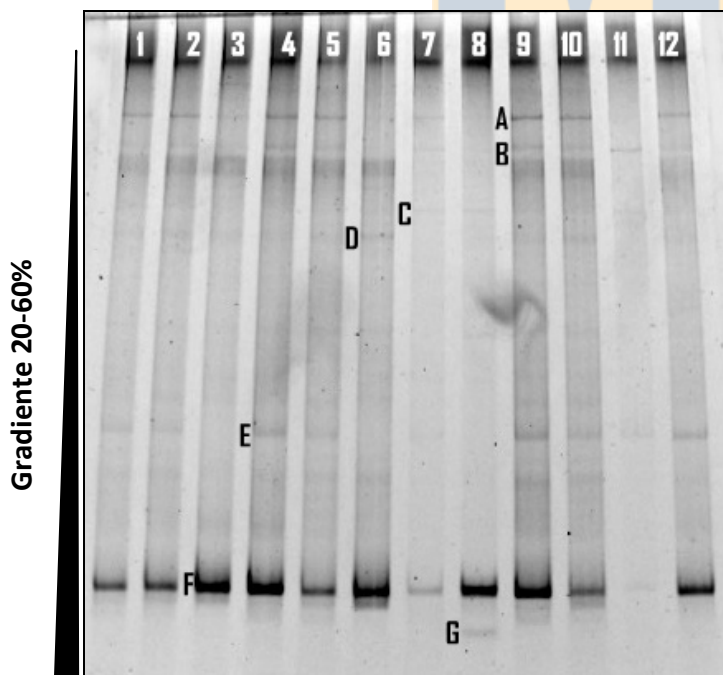


Figura 4-23: DGGE de productos de PCR amplificados con los primers Arch 958r y 344f (GC- clamp). Carriles 1 a 4: Muestras estratificadas del reactor R-10. Carriles 5 a 8: Muestras estratificadas del reactor R-0. Carriles 9 a 12: muestras estratificadas del reactor R-2. De todas las bandas indicadas en la figura, sólo las mas intensas (A, B, E, F y G) fueron cortadas, reamplificadas, purificadas y secuenciadas.

Tabla 4-5: Identificación de bandas secuenciadas obtenidas desde DGGE de Archaeas.

muestra	Secuencia más cercana	N° acceso GenBank
A	secuenciación no exitosa	-
B	Methanoculleus marisnigri	NC_009051.1
E	Methanoplanus petrolearius	NC_014507.1
F	Methanohalophilus mahii	NC_014002.1
G	contaminación del gel	-

Al igual que con bacterias, cada banda obtenida en DGGE fue seleccionada para medir su intensidad de brillo mediante el programa ImageJ, restando el brillo de fondo o “ruido” de la imagen, para obtener una medición más precisa de la intensidad de cada banda. Posteriormente, se calcularon porcentajes de intensidad para cada banda en cada carril, tomando como 100% la suma de intensidades en cada carril. De esta forma se construyó la Tabla 4-6 que nos indica presencia o ausencia de banda en cada carril además del porcentaje de intensidad de brillo que posee cada una.

Tabla 4-6: Intensidades de banda relativas en (%) extraídas mediante el programa ImageJ.

carril	1 (TM1 R10)	2 (TM2 R10)	3 (TM3 R10)	4 (TM4 R10)	5 (TM1 R0)	6 (TM2 R0)	7 (TM3 R0)	8 (TM4 R0)	9 (TM1 R2)	10 (TM2 R2)	11 (TM3 R2)	12 (TM4 R2)
A	19,5	14,4	4,3	10,9	13,6	-	16,4	-	15,7	18,7	-	9,8
B	2,4	3,0	3,0	3,4	4,6	-	6,0	-	5,0	4,0	29,7	1,7
C	-	-	-	-	-	-	3,8	2,7	-	-	21,5	-
D	1,8	3,2	0,3	-	0,2	5,5	-	-	2,9	8,2	-	-
E	5,1	4,7	-	5,7	3,5	-	7,9	-	8,6	5,9	27,5	9,2
F	71,2	74,7	92,4	80,0	78,1	94,5	65,9	97,3	67,8	63,3	21,3	79,3

* Carriles 1 a 4: Muestras estratificadas del reactor R-10, carriles 5 a 8: Muestras estratificadas del reactor R-0, carriles 9 a 12: muestras estratificadas del reactor R-2, carril Nit: muestra del reactor de inóculo nitrificante. TM1,2,3,4: Toma muestra 1,2,3 y 4. R0: reactor sin reciclo; R2: Reactor con R=2; R10: Reactor con R=10.

Observamos en la tabla 4-6 que la banda más representada en los reactores es la banda F identificada como *Methanohalophilus mahii*. Esta especie de archaea metanogénica es un microorganismo halófilo, es decir que habita ambientes de alta salinidad, encontrándose por lo general en sedimentos anaeróbicos con niveles de salinidad iguales o superiores al agua de mar (Paterek y Smith, 1988). Con respecto a las otras especies identificadas, *Methanoculleus marisnigri* es una archaia anaerobia metanogénica, y ha sido aislada de digestores anaeróbicos, así como otras especies de su género también aisladas desde diferentes tipos de digestores anaerobios (Anderson et al., 2009). *Methanoplanus petrolearius* es una archaea metanogénica

capaz de producir metano a partir de $H_2 + CO_2$, formiato, y $CO_2 +$ propanol, siendo sus condiciones óptimas de crecimiento $37^\circ C$, 10-20 g/L de NaCl y pH 7 (Ollivier et al., 1997). La identificación de estas bacterias es consistente de acuerdo a lo reportado en bibliografía, ya que *Methanohalophilus* requiere alta salinidad (como nuestro sustrato), *Methanoculleus* ha sido aislada en diversas oportunidades desde digestores anaerobios y *Methanoplanus* tiene sus condiciones de crecimiento óptimas ($37^\circ C$, 10-30 gNaCl/L, pH 7,0) dentro del rango de condiciones que manejan nuestros reactores ($30^\circ C$, 24 gNaCl/L, pH 6,5-7,9), además de ser todas metanogénicas, lo cual es esperado encontrar en un reactor donde ocurre digestión anaerobia.

Para observar las abundancias totales así como los porcentajes relativos de cada banda (identificada y no identificada) se construyeron los gráficos de la figura 4-24. Notamos que en los tres reactores, la especie más abundante identificada fue *M. mahii*, con porcentajes que van desde 58 a 84%.

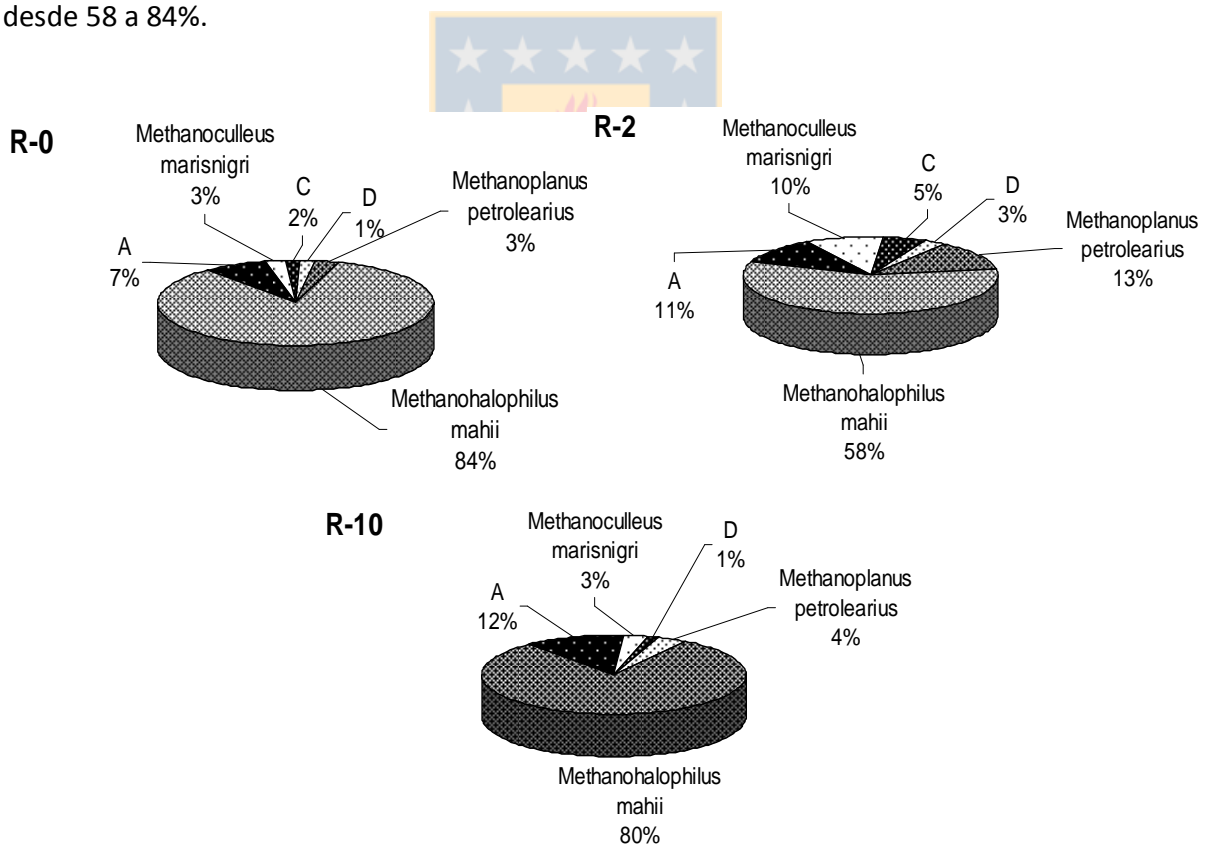


Figura 4-24: Composición porcentual de la abundancia total de archaeas presentes en cada reactor. Porcentajes relativos calculados de acuerdo a la intensidad lumínica de cada banda obtenida en DGGE.

Al igual que como se realizó con las muestras de bacterias, las muestras de archaeas fueron sometidas a análisis de MDS y Cluster para evaluar estratificación de comunidades de archaeas así como el efecto del reciclo sobre estas. Se compararon los mismos sets de muestras que en los análisis de bacterias y los resultados se muestran en las figuras de la 4-25 a la 4-31.

En las figuras 4-25, 4-26 y 4-27 correspondientes a los análisis de MDS realizados a cada reactor R-10, R-0 y R-2 respectivamente, podemos observar una alta dispersión de los datos en el reactor R-0 y R-2 (figuras 4-26 y 4-27) donde la similitud entre todos los datos alcanza tan sólo 40%, en relación al reactor R-10 que posee una alta similitud de 80% entre los 4 puntos de muestreo. Esto nos vuelve a dar indicios del efecto de la recirculación sobre la estratificación de los datos, ya que el reactor que posee un alto valor de reciclo (R-10) muestra un carácter más homogéneo de sus datos, es decir una baja estratificación o diferenciación de los microorganismos a lo largo del reactor.

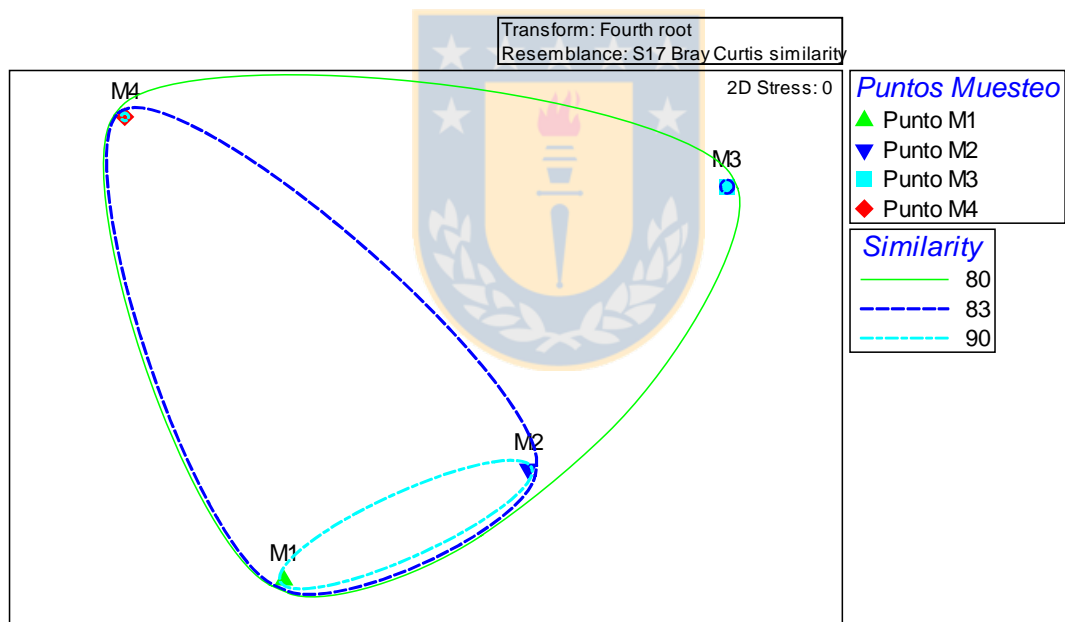


Figura 4-25: Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 1, 2, 3 y 4 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-10.

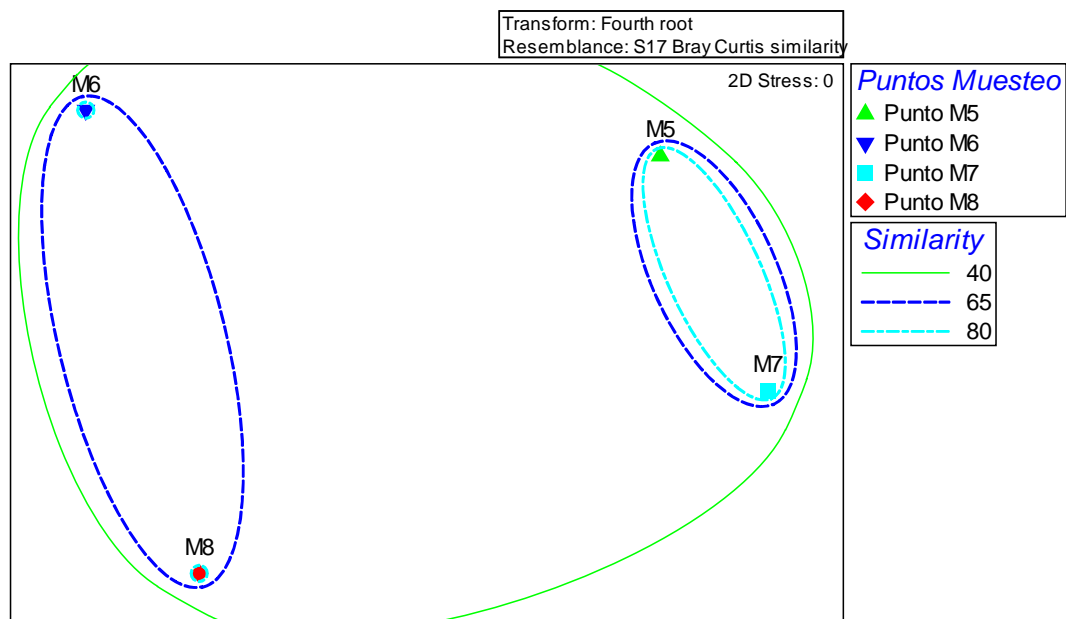


Figura 4-26: Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 5, 6, 7 y 8 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-0.

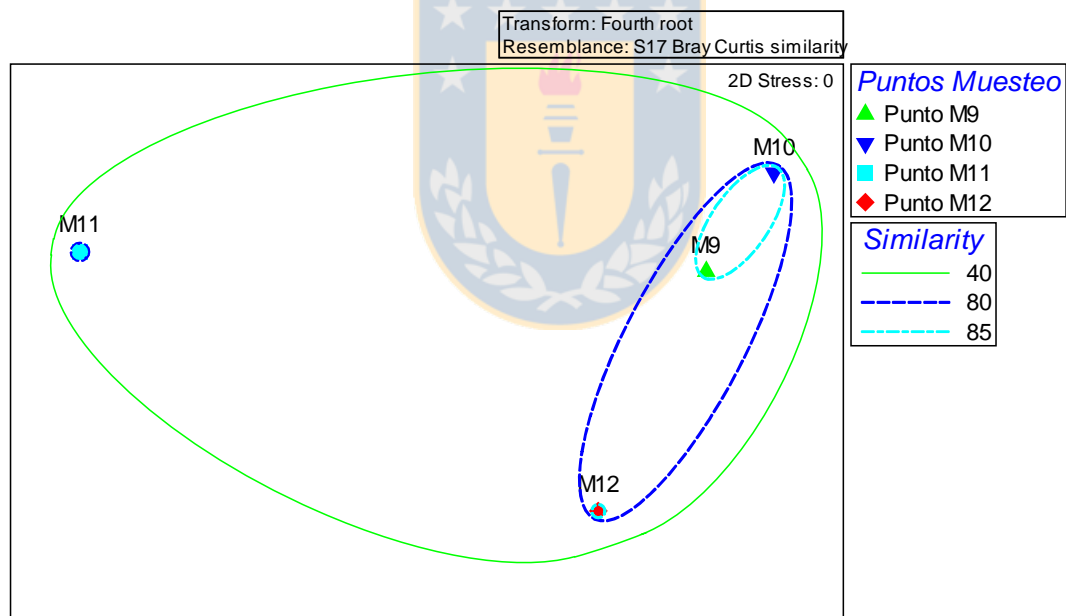


Figura 4-27: Análisis de MDS realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 9, 10, 11 y 12 correspondientes a las muestras estratificadas tomadas del reactor R-2.

Con respecto al análisis de Cluster observable en las figuras 4-28, 4-29, 4-30 y 4-31 correspondientes a las comparaciones entre puntos de muestreo estratificados 1, 2, 3 y 4 de los reactores, podemos notar que la primera figura correspondiente al primer toma muestra es la que presenta mayor similitud en sus datos, disminuyendo ésta considerablemente en los puntos

de muestreo superiores. Esto nos indica que la primera zona de los reactores donde ocurre desnitrificación y digestión anaeróbica en condiciones anóxica/anaeróbicas es la más conservada en términos de los microorganismos archaea presentes, presentando una similitud cercana al 90%. En los puntos de muestreo superiores (figuras 4-29, 4-30 y 4-31) se observó una tendencia a agrupar los reactores con reciclo dejando fuera del grupo al reactor sin reciclo, esto para el segundo y cuarto toma muestra, compartiendo estos dos reactores una alta similitud (85 y 95% para el segundo y cuarto toma muestra respectivamente) y siendo el reactor R-0 el grupo heterogéneo en estos dos casos, compartiendo solo un 66 y 50% de similitud con los otros dos reactores. Mediante una visión global de los resultados arrojados por este análisis no se puede apreciar en forma clara un efecto del reciclo sobre las comunidades de archaeas presentes en los reactores; estas se encuentran distribuidas de forma mas bien homogénea en la primera zona indistintamente de la razón de reciclo, y en las zonas superiores no se observa un patrón claro de distribución, siendo este más bien aleatorio. Posiblemente el bajo número de bandas encontradas y por tanto de datos obtenidos es poco apropiado para este tipo de análisis, afectando el agrupamiento de los datos.

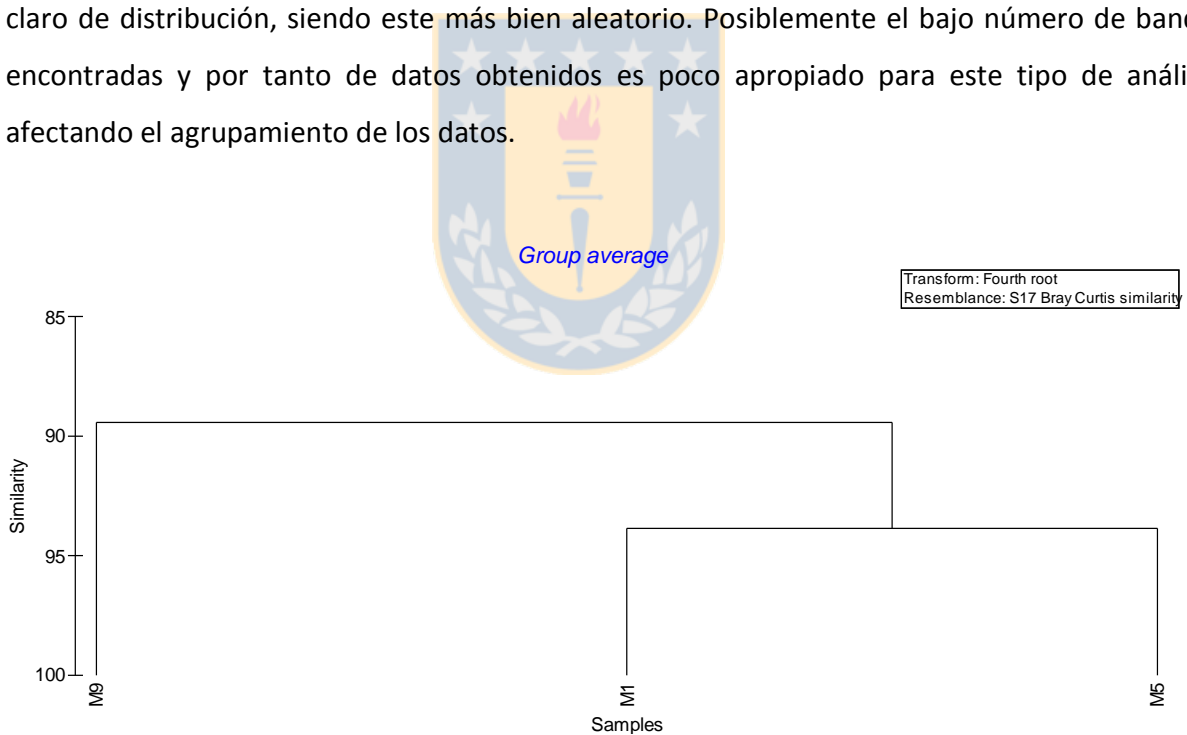


Figura 4-28: Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 1, 5 y 9 (M1, M5 y M9 en la figura) correspondientes a las muestras del primer toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.

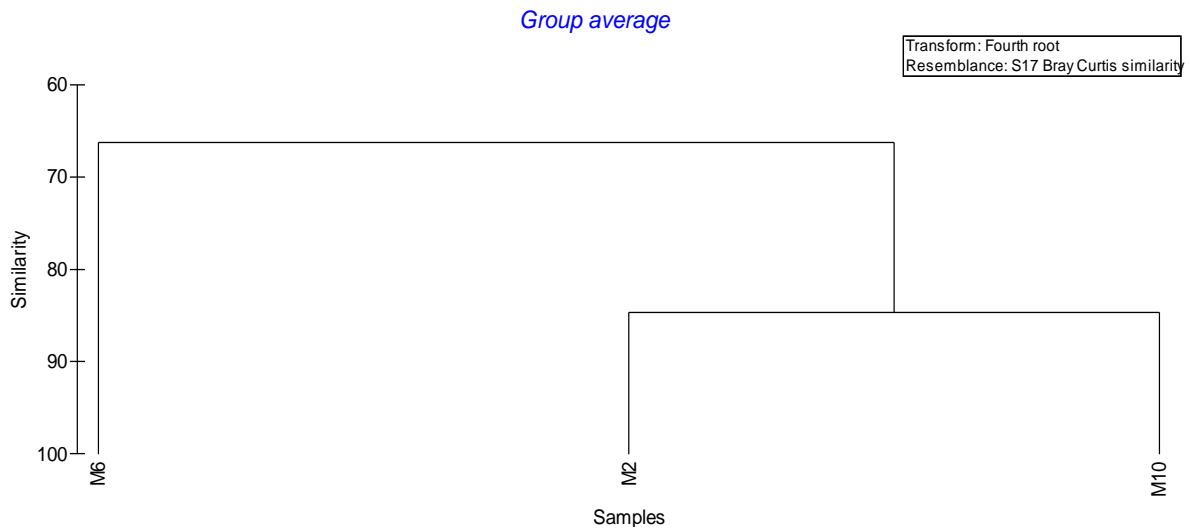


Figura 4-29: Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 2, 6 y 10 (M2, M6 y M10 en la figura) correspondientes a las muestras del segundo toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.

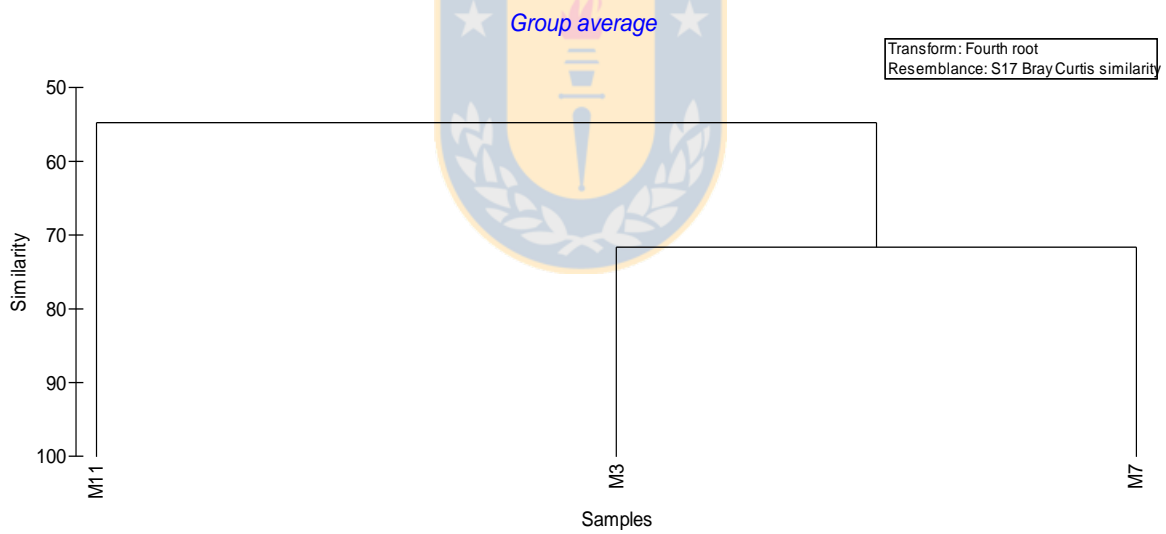


Figura 4-30: Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 3, 7 y 11 (M3, M7 y M11 en la figura) correspondientes a las muestras del tercer toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.

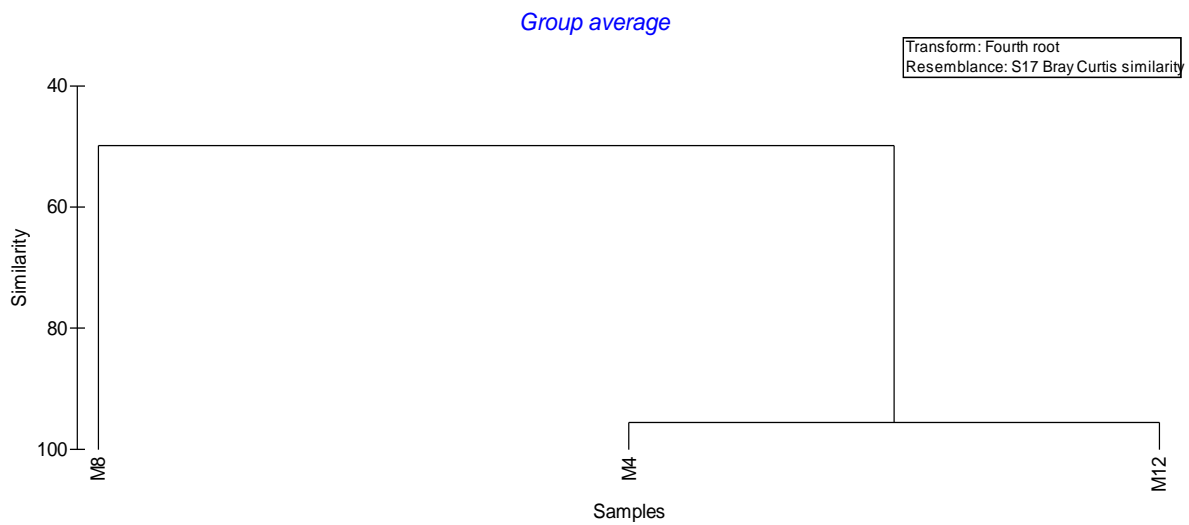


Figura 4-31: Análisis de Cluster realizado a las muestras de los carriles de DGGE de archaeas 4, 8 y 12 (M4, M8 y M12 en la figura) correspondientes a las muestras del cuarto toma muestra de los tres reactores R-10, R-0 y R-2 respectivamente.

En la figura 4-32 Se corrobora esta distribución más bien aleatoria de las bacterias metanógenas identificadas en los reactores, donde, si bien se observa una distribución más homogénea en el reactor R-10 en relación a los otros dos, se evidencia una distribución ubicua de estas archaeas a lo largo de los tres reactores, observándose una fuerte caída sólo en la zona de inyección de aire (3° TM) en los reactores R-0 y R-2.

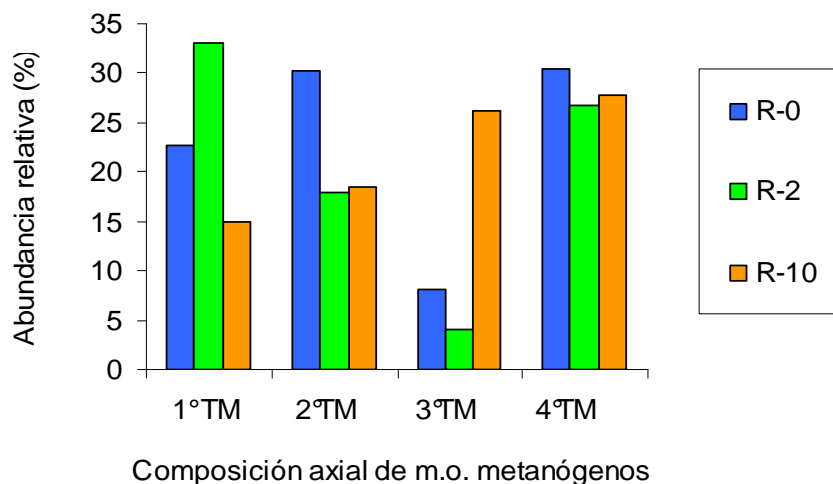


Figura 4-32: Abundancias relativas (%) de archaeas metanogénicas (*M. marisnigri* + *M. petrolearius* + *M. mahii*) para cada toma muestra en cada reactor, R-0, R-2 y R-10. TM: toma muestra.

De este modo podemos concluir que sí se observó un fuerte efecto del reciclo sobre las comunidades de archaeas, evidenciado mediante análisis MDS como una pérdida de estratificación de 40% en el reactor de mayor reciclo (80% de similitud entre los 4 puntos de muestreo del reactor R-10 contra un 40% observado en los reactores R-0 y R-2)), sin embargo la ubicación de archaeas metanogénicas no se limitó a la zona anaeróbica, sino que se encontraron a lo largo de todo el eje axial de los reactores.



5. Conclusiones

- Se demostró que es posible realizar los procesos de desnitrificación, digestión anaeróbica y nitrificación en un reactor filtro de procesos integrados anóxico/anaeróbico/aeróbico, para el tratamiento de vertidos salinos de alta carga orgánica proteica, lo cual se logra debido al establecimiento de una biomasa especializada.
- La zona anóxica-desnitrificante tuvo una eficiencia de remoción de N-NO₃⁻ del 100% sin requerir una fuente externa de materia orgánica gracias a la disposición propuesta, mientras que las de remoción de TOC fueron mayores al 98% en todos los reactores. Se observó una mayor eficiencia en la remoción de nitrógeno en el reactor con mayor razón de reciclo (94,3 % en el reactor con reciclo 10 y 46,6 % con reciclo 2). Sin embargo, la remoción de materia orgánica no se vio afectada.
- La utilización de un sustrato alternativo preparado con hidrolizado de pescado de proporción TOC/NTK 2,8 veces menor al RIL pesquero (2,8 veces más proteico) mostró una fuerte caída en el desempeño de la zona aeróbica de los reactores, disminuyendo a un 30% la remoción de nitrógeno en el reactor de reciclo 2, siendo incluso nula en el reactor de reciclo 10; mientras que la remoción de TOC no se vio afectada.
- Se observó un leve efecto del OD en el flujo recirculado sobre la zona anóxica, presentándose una disminución del 20% en la eficiencia de remoción de N-NO_x medida al primer quinto del reactor de reciclo 2 con 0,94 mgOD/L, sin embargo las eficiencias globales de remoción de N.NO_x fueron en todos los casos de 100%.
- Se observó una alta desviación (22-25% en R-10 y 46-53% en R-2) entre los porcentajes de inhibición de la desnitrificación predichos por el modelo de Oh y Silverstain (1998) y los porcentajes obtenidos experimentalmente, lo cual nos indica que los sistemas de tratamiento anóxico basados en biomasa inmovilizada responden más eficientemente ante la presencia de OD. El modelo de Moya et al. (2011) resultó más apropiado para predecir el efecto del OD recirculado sobre la zona anóxica-desnitrificante mostrando desviaciones de 19,6% para R-2 y nula para R-10.
- Análisis de MDS y Cluster revelaron estratificación de microorganismos en los reactores R-0 y R-2, mientras que el R-10 mostró una distribución más homogénea, con una

reducción promedio de estratificación de 11% para bacterias y de 40% para archaeas en relación a los otros dos reactores; por otra parte, de esta forma podemos afirmar que una alta razón de recirculación sí afecta la estratificación de los microorganismos presentes en un reactor filtro, disminuyendo considerablemente al trabajar con ciclos altos.

- Se observó una correlación entre los procesos químicos medidos y los grupos bacterianos identificados, siendo de particular interés el hallazgo de bacterias desnitrificantes-autótrofas que explican la desaparición de nitrógeno observada en la zona aeróbica de 39,5 y 54% en los reactores R-0 y R-2 respectivamente. De este modo, esta diferencia observada entre el amonio oxidado y NO_x producidos, es atribuible a desnitrificación autótrofa, cuyas bacterias responsables corresponden a un tercio y un medio de la abundancia de bacterias nitrificantes halladas en los reactores R-0 y R-10.
- El hallazgo de grupos bacterianos responsables de procesos químicos no estudiados en esta tesis, se plantean como un interesante tema de estudio, dado que involucran el posible abatimiento de H_2S , gas altamente tóxico, y CH_4 , gas de efecto invernadero.
- Este estudio ha presentado más evidencia sobre la factibilidad y efectividad del tratamiento de riles en reactores compactos, presentando un diseño novedoso que permite la remoción simultánea de materia orgánica y nitrogenada de forma eficiente, además de permitir un ahorro total de materia orgánica destinada a la desnitrificación.
- Se demostró la presencia de comunidades complejas de microorganismos que coexisten y se distribuyen de acuerdo a la disponibilidad de los diversos sustratos liberados durante la degradación proteica, conocimiento que permite tener una visión más acabada del proceso además de generar nuevas interrogantes respecto a procesos metabólicos aún no estudiados asociados a las diversas bacterias identificadas que colonizan este tipo de reactores, y que mediante la búsqueda de nuevas respuestas permitan optimizar aún mas el tratamiento de RILes pesqueros.

6. Bibliografía

- Akunna JC, Bizeau C, Moletta R. (1994). Nitrate Reduction by Anaerobic Sludge Using Glucose at Various Nitrate Concentrations - Ammonification, Denitrification and Methanogenic Activities. *Environmental Technology*, 15(1):41-49.
- Anderson I., Sieprawska-Lupa M., Lapidus A., Nolan M., Copeland A., Glavina del Rio T., Tice H., Dalin E., Barry K., Saunders E., *et al.* (2009). Complete genome sequence of *Methanoculleus marisnigri* Romesser et al. 1981 type strain JR1. *Stand Genomic Sci* 1:189-196.
- Anthonisen A., Oler R., Prakasam T., Srinath E. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Water environment federation*, 48(5): 835-852
- Antileo C., Aspé E., Urrutia H., Zaror C., Roeckel M. (2002). Nitrifying biomasa acclimatation to high ammonia concentration. *Journal of environmental Engineering*, 128(4):367-375.
- Antileo C., Werner A., Ciudad G., Muñoz C., Bornhardt C., Jeison D., Urrutia H. (2006). Novel operational strategy for partial nitrification to nitrite in a sequencing batch rotating disk reactor. *Biochemical Engineering Journal*. 32: 69-78
- APHA-AWA-WPFC. (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17ª edición, Washington DC. USA.
- Aspe, E., Marti, M.C., Jara, A., Roeckel, M., 2001. Ammonia inhibition in the anaerobic treatment of fishery effluents. *Water Environment Research* 73:154-164.
- Bae, H. S., W. T. Im, and S. T. Lee. (2005). *Lysobacter concretionis* sp. nov., isolated from anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1155-61.

- Buschmann A, Fortt A. 2005. Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y alternativas para un desarrollo sustentable. *Revista Ambiente y Desarrollo*, 21(3):58-64.
- Campos V., León C., Mondaca M. (2010). Arsenic mobilization by epilithic bacterial communities associated with volcanic rocks from Camarones river, Atacama desert, northern Chile. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* DOI 10.1007/s00244-010-9601-7
- Carrera J, Vicent T, Lafuente J. (2004). Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochemistry*, 39(12): 2035-2041.
- Christensen P., Cook F. (1978). *Lysobacter*, a new genus of nonhiting, gliding bacteria with a high base ratio. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28(3):367-393.
- Chui PC, Terashima Y, Tay JH, Ozaki H. (2001). Wastewater treatment and nitrogen removal using submerged filter systems. *Water Science and Technology*, 43(1):225-232.
- Colby J., Dalton H., Whitrenbury R. (1975). An improved assay for bacterial methane mono-oxygenase: some properties of the enzyme from *Methylomonas methanica*. *Biochem. J.* 151:459-462.
- cl.invertia.com/noticias/noticia.aspx?idNoticia=200907132146_INV_78221685. 26.07.2009.
- Dahab M., Lee Y. (1988). Nitrate removal from water supplies using biological denitrification. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 60(9):1670-1674.
- Del Pozo R, Diez V. (2003). Organic matter removal in combined anaerobic-aerobic fixed-film bioreactor. *Water Research*, 39(6):1114-1122.
- Del Pozo R, Diez V. (2005). Integrated anaerobic-aerobic fixed-film reactor for slaughterhouse wastewater treatment. *Water Research*, 39(6):1114-1122.

- Delgado A, Espe E, Martí MC, Roedel M. (2004). The effect of volatile fatty acids on the nitrification of a saline effluent. *Environmental Technology*, 25(4):413-422.
- Díaz E., Amils R., Sanz J. (2003). Molecular ecology of anaerobic granular sludge grown at different conditions. *Water Science and Technology*. 48(6):57-64.
- Fernández N., Díaz E., Amils R., Sanz J. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial Ecology*. 56:121-132
- Galvez JM, Gómez MA, Hontoria E, González-Lopez J. (2003). Influence of hydraulic loading and air flow rate on urban wastewater nitrogen removal with a submerged fixed-film reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 101(2): 219-229.
- Garzón-Zúñiga M. (2005). Non-conventional nitrogen transformation and removal mechanisms in wastewater treatment systems. *Ing. Hidráulica en Mexico*. 20(4):137-149.
- Giustinianovich E. (2009). Adaptación de inóculo nitrificante a vertidos salinos de alta carga nitrogenada. Informe de Tesis Bioingeniería, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- Gönenç E, Harremoës P. (1990). Nitrification in rotating disc systems. Part II. Criteria for simultaneous mineralization and nitrification. *Water Research*, 24:499–505.
- Im J., Woo H., Choi M., Han K., Kim C. (2001) Simultaneous organic and nitrogen removal from municipal landfill leachate using an anaerobic-aerobic system, *Water Research*, 35(10), 2403-2410.
- Joo S., Kim D., Yoo I., Park K, Cha G. (2000). Partial nitrification in an upflow biological aerated filter by O₂ limitation. *Biotechnology letters* 22: 937-940.

- Kwon G., Sohn H., Shin K., Kim E., Seo B. (2005). Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 67:845-850.
- Ling J., Chen S.L. (2005). Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. *Aquacultural Engineering*, 33(2):150-162
- Martins dos Santos A.P.; Tramper J. and R. H. Wijffels (1998). Integrated nitrogen removal in compact systems by immobilized microorganisms: new-generation bioreactors. In, *Biotechnology Annual Review* (Editor: M.R. El-Gewely), Volume 4, 323- 394.
- Michaud L., Blancheton J.P., Bruni V., Piedrahita R. (2006). Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural Engineering*, 34(3):224-233.
- Mosquera-Corral A, Campos J, Sánchez M, Méndez R, Lema J. (2001). Simultaneous methanogenesis and denitrification of pretreated effluents from a fish canning industry. *Water Research*, 35(2), 411-418.
- Mosquera-Corral A, Campos J, Sánchez M, Méndez R, Lema J. (2003). Combined system for biological removal of nitrogen and carbon from a fish cannery wastewater. *Journal of environmental Engineering*, 129(9), 826-833.
- Moya J., Huiliñir C., Peredo K., Aspé E., Roeckel M. (2011). Modeling of simultaneous denitrification-anaerobic digestion-organic matter aerobic oxidation and nitrification in an anoxic-anaerobic-aerobic compact filter reactor. Paper enviado a *Journal of Biotechnology*.
- Muñoz C. (2005). Diseño, habilitación y puesta en marcha de reactores filtros para la remoción simultánea de materia orgánica y nitrógeno. Memoria de título Ingeniería Civil Química, Depto. de Ing. Qca., Universidad de Concepción.

- Muyzer G., Smalla K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. Ed. Springer Netherlands 73: 127–141
- Nesbø C., Kumaraswamy R., Dlutek M., Doolittle W., Foght J. 2010. Searching for mesophilic Thermotogales bacteria: "Mesotogas" in the wild. *Appl. Environ. Microbiol.* Published online doi:10.1128/AEM.02846-09
- Oh J, Silverstein J. (1999). Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Water Research*, 33(8):1925-1937.
- Ollivier B., Cayol J., Patel B., Magot M., Fardeau M., Garcia J. (1997). *Methanoplanus petrolearius* sp. Nov., a novel methanogenic bacterium from an oil-producing well. *FEMS Microbiol Lett.* 147(1): 51-56.
- Pak D, Chang W. (2000). Simultaneous removal of nitrogen and phosphorus in a two-biofilter system. *Water Science and Technology*, 41(12):101-106.
- Paterek J., Smith P. (1988). *Methanohalophilus mahii* gen. nov. sp. Nov. a methylotrophic halophilic methanogen. *Int. Journal of Syst. Bact.* 38(1): 122-123
- Quijada H. (2009). Sistema de aireación en reactor filtro desnitrificante/anaeróbico. Informe de Memoria de Título, Depto. De Ing. Química, Universidad de Concepción.
- Ramos A.F., Gómez M.A., Hontoria E. and González-López J. (2007). Biological nitrogen and phenol removal from saline industrial wastewater by submerged fixed-film reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 142(1-2):175-183.
- Reyes J., Razo E., Gomez J. (2004). Simultaneous biological removal of nitrogen, carbon and sulfur by denitrification. *Water Research*, 38:3313-3321.

- River L., Aspé E., Roeckel M., Martí C. (1998). Evaluation of clean technology processes in the marine products processing industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 73:217-226.
- Roeckel M., Aspé E., Walter K. (2009). "Analysis of nitrogen and carbon removal from organic loaded effluents using reactors in series and only one reactor". In: Columbus Frank; "Water Treatment: Processes, Uses and Ecological Impact". Editorial Nova Science Publishers, Inc., Nueva York.
- Ros M, Vrtovsek J. (1998). Wastewater treatment and nutrient removal in the combined reactor. *Water Science and Technology*, 38(1):87-95.
- Ryhiner G., Sorensen K., Birou B., Gros H. (1994). Biofilm reactors configuration for advanced nutrient removal. *Water Science and Technology*, 29(10-11):111-117.
- Sánchez, O., Aspe, E., Marti, M.C., Roeckel, M., 2005. Rate of ammonia oxidation in a synthetic saline wastewater by a nitrifying mixed-culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80:1261-1267.
- Sanz J., Köchling T. (2006). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry*. 42:119-133.
- Subsecretaría de pesca, Departamento de Acuicultura. Informe Ambiental de la acuicultura. (2006). <http://www.subpesca.cl/mostrararchivo.asp?id=2934>
- Tian F., Yu Y., Chen B., Li H., Yao Y., Guo X. (2009). Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis. *Polar Biol*. 32:93-103.
- Van Ooteghem S., Beer S., Yue P. (2001) Hydrogen production by the thermophilic bacterium, *Thermotoga neapolitana*. *Proc. 2001 DOE Hydrogen Prog. Review*.

- Villaverde S., Fdz-Polanco F., García P. (1999). Nitrifying biofilm acclimatation to free ammonia in submerged biofilters. Start-up influence. *Water Research*. 34(2): 602–610.
- www.datossur.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=621:modificaciones-a-la-ley-de-pesca-y-acuicultura&catid=35:nacional&Itemid=18-. 26.07.2009.
- www.mardechile.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=1852:entendiendo-la-crisis-salmonera&catid=53:contenido. 26.07.2009.
- Xia S., Li J., Wang R. (2007). Nitrogen removal performance and microbial community structure dynamics response to carbon nitrogen ratio in a compact suspended carrier biofilm reactor. *Ecological engineering*. 32:256-262
- Yasumoto M., Nishijima M., Ngirchechol M., Kanoh K., Ahizuri Y., Miki W. (2006). Isolation of marine bacteria by in situ culture on media supplemented polyurethane foam. *Mar. Biotechnol.* 8(4):227-237.
- Zhang X., Zhou J., Guo H., Qu Y., Liu G., Zhao L. (2007). Nitrogen removal performance in a novel combined biofilm reactor. *Process Biochemistry*, 42, 620-626.



7. Anexos

A. Supuesto de Estado Estacionario

Los reactores que tratan vertidos alimenticios no cumplen a cabalidad con la definición de estado estacionario ya que las concentraciones de alimentación son siempre variables. No obstante, si se intenta disminuir estas variaciones es posible observar un comportamiento cercano al estacionario, ya que las variables de salida se mueven dentro de pequeños rangos en torno a un valor fijo. Para realizar los análisis, en este trabajo se supondrá estado estacionario bajo el criterio que se explica a continuación.

En las siguientes tablas (tablas A-1 y A-2) se muestran las variables de salida consideradas de mayor relevancia: N-NOx (nitritos más nitratos), TAN y TOC del efluente líquido, ya que estas son las de mayor interés. Para el análisis de condición estacionaria se consideraron las últimas 5 mediciones realizadas, se calculó el promedio de estos puntos, la desviación estándar de los mismos, así como la variación de las mediciones determinada como la diferencia de cada valor con respecto al promedio dividido por la concentración de entrada de NTK y TOC para los compuestos nitrogenados y TOC respectivamente. Sobre este último cálculo realizado para cada medición se esperó obtener una variación menor al 10%.

En la tabla A-1 se muestran las últimas mediciones obtenidas con el primer sustrato probado correspondiente a un RIL de sangre de pescado, y se observa que todas las variables consideradas alcanzan un valor relativamente constante y en la mayoría de los casos se cumple con el criterio de condición estacionaria, salvo un punto de N-NOx en el reactor R-O y dos puntos de N-NOx en el reactor R-2. Esta variación mayor al 10% en tres mediciones se debe posiblemente a la dificultad de fijar este tipo de RIL a una concentración fija, producto de la alta variabilidad de concentración de este RIL proveniente de la industria pesquera. Sin embargo, al determinar la desviación promedio de las variaciones de las mediciones, se observa que en todos los casos este valor no supera el 10% a excepción de la variable N-NOx en el reactor R-2.

En la tabla A-2 se muestran las últimas mediciones obtenidas al utilizar el segundo sustrato correspondiente a hidrolizado de pescado. En este caso se observa que sí se cumple a cabalidad la condición de estado estacionario, incluso las variaciones nos superan siquiera el 2%. Esto se

debe posiblemente y al contrario del primer RIL probado, a una mayor facilidad de fijar la concentración de entrada, dado que este sustrato en polvo podía ser pesado en una balanza analítica otorgando mayor exactitud al sustrato preparado.

Tabla A-1: Verificación de estado estacionario para operación con RIL-sangre

variable	Medición	R-0		R-2		R-10	
		Conc. (mg/L)	Variación c/r a NTK entrada (%)	Conc. (mg/L)	Variación c/r a NTK entrada (%)	Conc. (mg/L)	Variación c/r a NTK entrada (%)
N-NOx	1	96,9	7,6	44,6	1,3	17,1	1,2
	2	94,9	8,3	8,5	13,6	25,2	-1,6
	3	111,5	2,7	40,6	2,6	13,3	2,5
	4	161,5	-14,4	42,8	1,9	27,9	-2,5
	5	131,7	-4,2	105,0	-19,3	19,1	0,5
	promedio	119,3	0,0	48,3	0,0	20,5	0,0
	desv.est.	27,8	9,5	35,0	11,9	5,9	2,0
TAN	1	7,5	0,2	44,0	2,9	1,6	0,8
	2	23,9	-5,4	25,0	9,4	5,3	-0,5
	3	4,0	1,4	69,8	-5,9	0,0	1,3
	4	0,3	2,7	62,6	-3,5	6,3	-0,8
	5	4,7	1,1	61,0	-2,9	6,0	-0,7
	promedio	8,1	0,0	52,5	0,0	3,8	0,0
	desv.est.	9,2	3,1	18,1	6,2	2,9	1,0
variable	Medición	Conc. (mg/L)	Variación c/r a TOC entrada (%)	Conc. (mg/L)	Variación c/r a TOC entrada (%)	Conc. (mg/L)	Variación c/r a TOC entrada (%)
TOC	1	4,4	0,1	5,1	0,4	1,6	0,8
	2	3,5	0,5	3,0	1,1	5,3	-0,5
	3	6,7	-0,7	8,5	-0,8	0,0	1,3
	4	2,7	0,7	7,4	-0,4	6,3	-0,8
	5	6,7	-0,6	7,4	-0,4	6,0	-0,7
	promedio	4,8	0,0	6,3	0,0	3,8	0,0
	desv.est.	1,8	0,6	2,2	0,8	2,9	1,0

Tabla A-2: Verificación de estado estacionario para operación con hidrolizado de pescado.

variable	Medición	R-0		R-2		R-10	
		Conc. (mg/L)	Variación c/r a NTK entrada (%)	Conc. (mg/L)	Variación c/r a NTK entrada (%)	Conc. (mg/L)	Variación c/r a NTK entrada (%)
N-NOx	1	177,4	1,9	91,9	0,7	35,8	-1,7
	2	204,0	-1,3	84,2	1,6	20,0	0,2
	3	206,6	-1,6	113,6	-1,8	26,4	-0,5
	4	197,0	-0,5	97,8	0,0	13,9	0,9
	5	180,7	1,5	103,1	-0,6	13,3	1,0
	promedio	193,1	0,0	98,1	0,0	21,9	0,0
	desv.est.	13,4	1,6	11,2	1,3	9,4	1,1
TAN	1	82,3	2,0	111,0	0,2	190,8	1,2
	2	105,6	-0,8	105,7	0,9	213,5	-1,4
	3	101,0	-0,2	101,2	1,4	197,8	0,4
	4	91,9	0,8	118,1	-0,6	207,3	-0,7
	5	114,0	-1,8	129,0	-1,9	197,1	0,5
	promedio	98,9	0,0	113,0	0,0	201,3	0,0
	desv.est.	12,2	1,4	10,9	1,3	9,0	1,1
variable	Medición	Conc. (mg/L)	Variación c/r a TOC entrada (%)	Conc. (mg/L)	Variación c/r a TOC entrada (%)	Conc. (mg/L)	Variación c/r a TOC entrada (%)
TOC	1	7,0	-0,1	9,4	-0,2	0,0	0,0
	2	6,1	0,0	13,3	-0,7	0,4	0,0
	3	10,7	-0,6	3,6	0,6	0,0	0,0
	4	0,5	0,7	6,4	0,2	0,0	0,0
	5	6,1	0,0	7,1	0,1	0,0	0,0
	promedio	6,1	0,0	7,9	0,0	0,1	0,0
	desv.est.	3,7	0,5	3,6	0,5	0,2	0,0