



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO FIN DE MASTER

MASTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE O_2 EN LA
DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE N_2O POR
MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL FANGO
ACTIVO

CARMEN INÉS LAGUNA GARCÍA

Septiembre 2014

(Página en blanco)

D. PEDRO A. GARCÍA ENCINA y D^a. IVONNE FIGUEROA GONZÁLEZ, profesor e investigador posdoctoral del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid, respectivamente, CERTIFICAN:

Que D^a. CARMEN INÉS LAGUNA GARCÍA ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Master, del Master en Ingeniería Ambiental, titulado: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE O₂ EN LA DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE N₂O POR MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL FANGO ACTIVO.

Valladolid, 9 de Septiembre de 2014

Fdo. Pedro A. García Encina

Fdo. Ivonne Figueroa González

Reunido el Tribunal designado por el Comité Académico del Master en Ingeniería Ambiental, para la evaluación de los Trabajos Fin de Master, y después de estudiar la memoria y atender a la defensa del trabajo “Efecto de la Concentración de O₂ en la Degradación Biológica de N₂O por Microorganismos presentes en el Fango Activo” presentado por el alumno D^a Carmen Inés Laguna García, decidió otorgarle la calificación de

Valladolid 11 de Septiembre de 2014

El Presidente

El Secretario

Fdo.: Sara Isabel Pérez Elvira

Fdo.: Raúl Muñoz Torre

Vocal

Fdo.: Raquel Lebrero Fernández

ÍNDICE

1 RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
3. OBJETIVO.....	11
4. METODOLOGÍA.....	12
4.1. Análisis del fango activo para la cuantificación de biomasa.....	12
4.2. Elaboración de Curvas de Calibrado.....	12
4.3. Preparación de la Fase Líquida (Medio Mineral).....	14
4.4. Efecto del O ₂ sobre el consumo de N ₂ O.....	14
4.5. Composición elemental de la biomasa.....	17
4.6. Consumo de la fuente de carbono.....	17
4.7. Determinación de Parámetros Cinéticos.....	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5.1. Efectos del O ₂ sobre el consumo de N ₂ O.....	20
5.2. Carbono Orgánico Total (TOC) y Nitrógeno Total (TN).....	23
5.3. Composición de la Biomasa.....	24
5.4. Selección de las condiciones más óptimas.....	25
5.5. Determinación de parámetros cinéticos.....	27
6. CONCLUSIONES.....	31
7. AGRADECIMIENTOS.....	32
8. BIBLIOGRAFÍA.....	33
Anexo.....	34
CURVAS DE CALIBRADO.....	35
EFFECTOS DEL O ₂ SOBRE EL CONSUMO DE N ₂ O.....	37
SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES MÁS ÓPTIMAS.....	38
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS TASA INICIAL DE CONSUMO DE N ₂ O.....	39

1 RESUMEN

La emisión de óxido nitroso, gas de efecto invernadero, se ha visto incrementada en los últimos años como consecuencia del cambio en las actividades llevadas a cabo por el hombre. Este gas es de gran importancia ya que tiene un alto potencial de calentamiento global.

En el presente trabajo se investiga la forma de eliminar el óxido nitroso (N_2O) que puede estar presente en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Este compuesto puede proceder tanto de elementos intermediarios en procesos de nitrificación como de una desnitrificación incompleta. Para ello, se han llevado a cabo varios experimentos utilizando fango activo procedente de la Estación Depuradora de Aguas Residuales de Valladolid, sometiendo a los microorganismos presentes en el mismo a diferentes concentraciones de oxígeno y óxido nitroso con la finalidad de conocer si hay presentes microorganismos que sean capaces de eliminar el N_2O presente en una fase gaseosa. Así mismo, se ha determinado cómo afecta la ausencia o presencia de O_2 en el consumo de N_2O . Un control de la evolución de los gases en el tiempo permite ver como en condiciones anaerobias o en presencia de bajas concentraciones de oxígeno (1% y 2%) tiene lugar un proceso de desnitrificación o eliminación de N_2O .

Se ha llevado a cabo de la misma forma un estudio de la velocidad de consumo del N_2O , para determinar si realmente se veía afectado o no en función de las diferentes concentraciones de oxígeno presentes. De acuerdo con los resultados obtenidos, se sabe que la tasa inicial de consumo de N_2O por parte de los microorganismos va disminuyendo conforme aumenta la concentración de O_2 . Así mismo, las tasas específicas de crecimiento de los microorganismos que eliminan N_2O disminuyen cuando hay oxígeno presente ($\mu_{max} (0\% O_2)=0.00468$ 1/h, $\mu_{max} (1\% O_2)=0.000835$ 1/h, $\mu_{max} (2\% O_2)=0.000326$ 1/h), lo que indica que aunque se desarrollan a menor velocidad, son capaces de eliminar el N_2O en presencia de concentraciones bajas de O_2 .

La experimentación llevada a cabo demuestra que es posible la eliminación de N_2O utilizando los microorganismos presentes en los fangos activos y que además, evaluando diferentes condiciones que pueden llegar a ser las óptimas, se puede llevar a cabo mejoras en este tipo de procesos biológicos.

2. INTRODUCCIÓN

La contaminación atmosférica es un problema de actualidad ya que hasta hace unos años la población no era consciente del grave problema que supone la emisión de gases a la atmósfera sin ser sometidos a tratamientos previos de eliminación, descontaminación o reducción de su toxicidad. Esto era debido a que de forma general los efectos causados por la emisión de gases son a medio o largo plazo, siendo solo a corto plazo en situaciones de accidente, donde se provoca una gran emisión en poco tiempo.

Actualmente, el conocimiento de los daños causados por la emisión de gases ha provocado que exista una legislación estricta en cuando a su emisión, sobre todo aplicada a los Gases de Efecto Invernadero (GEI) ya que son los causantes del calentamiento global, debido a que provocan la disminución de la capa de ozono que nos protege de la radiación solar. (IPCC, 2007)

Las emisiones totales de GEI en 2012 se corresponden con 6.526 millones de toneladas de CO₂ equivalentes (EPA, 2012).

De todos los GEI: Dióxido de carbono (CO₂), Metano (CH₄), Ozono (O₃), Óxidos de Nitrógeno (NO_x), vapor de agua (H₂O g) y Clorofluorocarbonos (CFC) vamos a centrarnos en el Óxido Nitroso (N₂O).

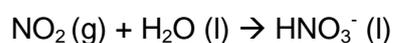
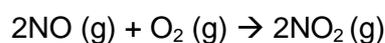
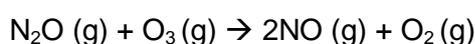
El estudio del N₂O ha tomado gran importancia durante los últimos años, ya que actualmente es uno de los gases de mayor emisión y es el gas de efecto invernadero con el mayor potencial de calentamiento global, aproximadamente 320 veces más alto que el CO₂. Como comparación, el CH₄ tiene un potencial de calentamiento global sólo 23 veces mayor que el CO₂. (IPCC, 1996). Destacar también que tiene un tiempo de permanencia en la atmósfera de aproximadamente 120 años.

Las principales fuentes de emisión de N₂O se encuentran en (Wrange *et al.*, 2001):

- Tratamiento de residuos; durante su combustión.
- Combustión de combustibles fósiles.
- Actividades ganaderas y agrícolas en condiciones anaerobias a partir de abonos minerales del suelo.
- Combustión de la biomasa.

- Gases de escape de los vehículos.
- Plantas de producción de ácido nítrico.
- Plantas de producción de ácido adípico (producto intermedio en la fabricación de polímeros de Nylon).
- Estaciones de Tratamiento de Aguas Residuales (EDAR), que es el objetivo de nuestro proyecto.

Una vez en la atmósfera el N_2O reacciona transformándose en monóxido de nitrógeno (NO) mucho más contaminante ya que con el tiempo se transforma en ácido nítrico dando lugar a la lluvia ácida.



Las tecnologías actuales para la eliminación de óxido nitroso se basan en procesos fisicoquímicos como la reducción catalítica, técnica en la que se utilizan catalizadores para descomponer el N_2O en gases inocuos, pero su costo es muy alto, debido principalmente a que se necesitan temperatura de más de $625^\circ C$ para que la descomposición sea espontánea, por lo que no son rentables este tipo de tratamientos (Se está investigando para reducir esta Temperatura) y tiene el problema de que el N_2O se encuentra presente junto con otros gases que son inhibidores del catalizador (Bahamonde).

El N_2O puede reducirse a N_2 por medio de bacterias desnitrificantes, estas utilizan el N_2O como aceptor de electrones y la materia orgánica como fuente de carbono y energía. Los microorganismos más comunes son proteobacterias incluyéndose *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus* y *Propionibacterium*. Los sistemas biológicos de eliminación del N_2O , requieren la presencia de microorganismos que expresen la enzima óxido nitroso reductasa, que cataliza la reducción de N_2O a N_2 (Wrange *et al.*, 2001).

La desnitrificación es el paso de reducción de NO_3^- a N_2 . Las bacterias mencionadas son anaerobias facultativas por lo que son capaces de utilizar el NO_3^- como aceptor de electrones en lugar del oxígeno en condiciones anaerobias o con bajas concentraciones de oxígeno (Wrange *et al.*, 2001)

Actualmente se está apostando por tratamientos biológicos (aplicación en los Biofiltros de tratamiento de gases) que consisten en utilizar microorganismos

específicos que utilicen el N₂O como fuente de nutrientes y energía consiguiendo así su degradación. Este tipo de procesos tienen un menor impacto ambiental (Estrada *et al.*, 2011).

La aplicación de un proceso biológico debe tener como prioridad la adaptación, la caracterización y cuantificación de los microorganismos, así como sus habilidades innatas. Cuando se trata del tratamiento de la contaminación es importante identificar las poblaciones dominantes, pues son las que más van a incidir en la eliminación del contaminante (Liu *et al.*, 2010). Por ello es imprescindible el conocimiento de los microorganismos presentes en los fangos activos para su aplicación en el tratamiento biológico para la eliminación del N₂O.

3. OBJETIVO

El objetivo del presente proyecto fue determinar el efecto de la concentración de oxígeno en el proceso de eliminación de N_2O llevado a cabo por microorganismos presentes en el fango activo con la finalidad de seleccionar las mejores condiciones para la degradación de este contaminante y caracterizar los parámetros cinéticos de los consorcios microbianos que permitan la posterior optimización de los aspectos microbiológicos del proceso de eliminación.

4. METODOLOGÍA

4.1. Análisis del fango activo para la cuantificación de biomasa

La realización de todos los experimentos se ha llevado a cabo utilizando lodo de fangos activos procedentes de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de Valladolid.

La procedencia ha sido siempre la misma, pero para cada experimento se ha utilizado lodo nuevo, por lo que se han realizado los convenientes análisis de Sólidos Suspendingidos Volátiles (SSV)

Es necesario conocer el contenido de biomasa del fango que va a ser utilizado para trabajar siempre con la misma concentración de microorganismos que en este caso fue de 100 mg/L. Para determinar la biomasa contenida en el fango activo se determinó la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y en función del resultado obtenido se añadió el volumen adecuado de fango al medio mineral.

4.2. Elaboración de Curvas de Calibrado

Para determinar la concentración de los gases de interés durante el desarrollo del experimento se realizaron curvas de calibrado (Ver Anexo Figuras A1, A2, A3 y A4) de dióxido de carbono (CO_2), oxígeno (O_2) (Cromatógrafo Bruker TCD) y de óxido nitroso (N_2O) (Cromatógrafo Bruker ECD).

La toma de gases se ha realizado directamente de las bombonas, utilizando bulbos de 250 o 500ml y bolsas de plástico para toma de muestras gaseosas

Las concentraciones utilizadas para la elaboración de cada curva de calibrado se muestran a continuación. Se realizaron triplicados para cada una de las concentraciones empleadas.

- **Curva de Calibrado Dióxido de Carbono (CO_2)**

Se utiliza una bombona de biogás con la siguiente composición: CH_4 (70.53%); CO_2 (24%); N_2 (2.99%); O_2 (0.865%) y H_2S (2.002%). Las mezclas de las diferentes concentraciones inyectadas se realizaron en un bulbo de vidrio con un volumen de 250 ml y utilizando aire como gas de dilución.

La Tabla 1 muestra la preparación de las diferentes concentraciones empleadas en la elaboración de la curva de calibrado.

DILUCIÓN	Concentración de CO ₂ (g/m ³)
250 ml de aire	0.63
1 ml de biogás	2.36
5 ml de biogás	9.26
15 ml de biogás	26.52

Tabla 1. Concentraciones de biogás utilizadas para la elaboración de la curva de calibrado de CO₂

- **Curva de calibrado del Oxígeno (O₂)**

Para la curva de calibrado de O₂ se utilizó la bombona de biogás que contiene 0.865% de O₂, el aire con 21% de O₂ y una bombona de O₂ puro (99%). Las diluciones se realizaron en un bulbo de vidrio con un volumen de 500 ml.

La Tabla 2 muestra las diluciones correspondientes a la curva de calibrado de O₂.

DILUCIÓN	Concentración de O ₂ (g/m ³)
500 ml de aire	275
500 ml de biogás	11.33
500 ml de O ₂ puro	1297

Tabla 2. Concentraciones empleadas para la elaboración de la curva de calibrado del O₂

- **Curva de Calibrado de Óxido Nitroso (N₂O)**

Para la curva de calibrado de N₂O se realizaron diluciones en aire a partir de una mezcla de N₂O a una concentración de 10000 ppm

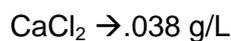
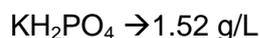
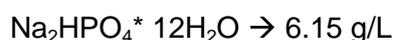
Las diferentes mezclas se realizaron utilizando un bulbo con un volumen de 50 ml. Las concentraciones empleadas se muestran en la Tabla 3.

DILUCION	Concentración de N ₂ O (ppm)	Concentración de N ₂ O (g/m ³)
1 ml de N ₂ O	20	0.0388
4 ml de N ₂ O	80	0.155
10 ml de N ₂ O	200	0.388
25 ml de N ₂ O	500	0.969
50 ml de N ₂ O	1000	1.938

Tabla 3. Concentraciones empleadas para la elaboración de la curva de calibrado del N₂O

4.3. Preparación de la Fase Líquida (Medio Mineral)

La fase líquida empleada para el crecimiento de los microorganismos fue medio mineral con la siguiente composición:



La Solución SL4 se trata de una solución de elementos trazas que contiene: EDTA, 0.5 g/L; FeSO₄·7H₂O, 0.2 g/L; ZnSO₄·7H₂O, 0.01 g/L; MnCl₂·4H₂O, 0.003 g/L; H₃BO₃, 0.03 g/L; CoCl₂·6H₂O, 0.02 g/L; CuCl₂·2H₂O, 0.001 g/L; NiCl₂·6H₂O, 0.002 g/L; NaMoO₄·2H₂O, 0.003 g/L.

Como fuente de carbono para los microorganismos se adicionaron al medio mineral glucosa (C₆H₁₂O₆) y acetato de sodio ([C₂H₃O₂]⁻Na), con una concentración de 50 mg/L de cada uno de ellos.

Todas las soluciones se conservan refrigeradas a 4 °C siempre que no se estén utilizando.

4.4. Efecto del O₂ sobre el consumo de N₂O

Para determinar si los microorganismos presentes en el fango activo procedente de la depuradora eran capaces de eliminar N₂O a diferentes concentraciones de O₂, se realizó un primer ensayo con botellas más pequeñas.

Cada botella contenía 20 ml de medio mineral, 100µl de glucosa y 100µl de acetato de sodio y lodo activo. La fase gaseosa estaba compuesta por 2 ml de N₂O en todas las botellas y concentraciones crecientes de O₂. (Tabla 4)

En función de los resultados obtenidos durante el ensayo se decidió aumentar el volumen para facilitar los análisis requeridos.

Botella	O ₂	%O ₂
1	0ml	0%
2	1ml	1%
3	2ml	2%
4	5ml	5%
5	Aire	21%

Tabla 4. Concentraciones de O₂ en los ensayos de viabilidad del fango

Los ensayos de eliminación de N₂O se llevaron a cabo por duplicado en botellas cerradas con un volumen de 1200 ml. de acuerdo con la metodología mostrada en la Figura 1. Cada botella contenía 200 ml de medio mineral y dos fuentes de carbono orgánicas (glucosa y acetato de sodio) así como lodo activo obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales. La fase gaseosa estaba compuesta por N₂O a una concentración de 200 ppm y diferentes concentraciones de O₂. (Tabla 5). Los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura controlada (25 °C), con agitación de 300 rpm durante 10 días). La eliminación de N₂O durante los experimentos se determinó mediante cromatografía de gases, el crecimiento de los microorganismos se determinó de manera indirecta a través de la cuantificación de CO₂ mediante cromatografía de gases.

Botella	Volumen de O ₂ adicionado	%O ₂
1	0 ml	0%
2	10 ml	1%
3	20 ml	2%
4	50 ml	5%
5	Aire	21%

Tabla 5. Concentraciones de O₂ en los ensayos de eliminación de N₂O

Todas las botellas excepto la botella 5 y su duplicado son lavadas con helio durante 10 minutos aproximadamente antes de adicionar el O₂ requerido para las distintas concentraciones. Una vez terminada su preparación se dejan estabilizar en el agitador orbital a 300 rpm y una temperatura de 25°C.

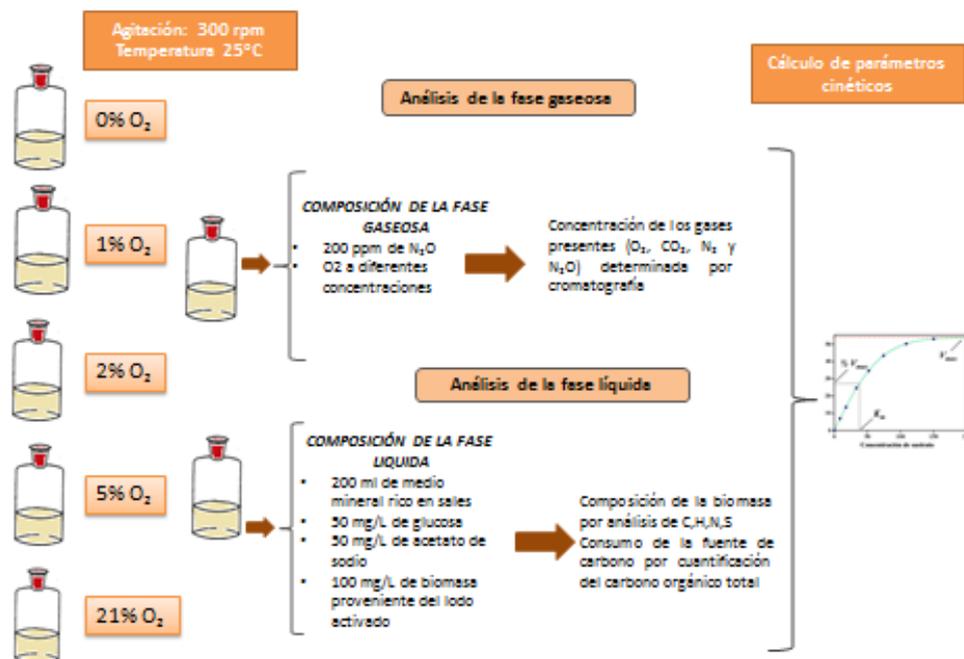


Figura 1. Diseño experimental para la eliminación del N₂O

4.5. Composición elemental de la biomasa

Para determinar la composición de la biomasa, es necesario obtener un mínimo de 5 mg de biomasa en peso seco de cada una de las condiciones empleadas. Para ello se reproducen las condiciones empleadas en el experimento de eliminación de N_2O manteniendo las botellas durante 13 días, realizando un análisis de gases el día que se han preparado y a los 9 días para determinar el consumo de N_2O .

Pasado el tiempo indicado se toman las muestras de la fase líquida y se centrifugan 10 minutos a 10000 rpm para obtener la biomasa.

El sobrenadante es retirado y será utilizado para la preparación de las muestras para análisis de TOC.

La biomasa se cambia de recipiente con ayuda de 10ml de agua desionizada, se centrifuga de nuevo y se retira el sobrenadante. Se introducen las muestras en la estufa a una temperatura de 100°C durante 24 horas.

Pasado este tiempo se colocan en un mortero y con ayuda de parafilm se envuelve este para evitar pérdida de biomasa. Se muele hasta obtener un tamaño pequeño y homogéneo.

Las muestras son pesadas y enviadas a la Universidad Complutense, Madrid, donde analizarán el contenido en biomasa en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de Microanálisis Elemental.

4.6. Consumo de la fuente de carbono

El sobrenadante obtenido después de centrifugar las muestras es utilizado para determinar el Carbono Orgánico Total (TOC). Para ello se realizó el filtrado del sobrenadante de cada botella y de agua destilada. Para realizar ésta determinación se necesitan entre 20-30ml de muestra. Para realizar una medición correcta, las muestras se diluyen 1:1 para ajustar las concentraciones a los límites de detección del equipo utilizado. Las muestras obtenidas se utilizan para determinar también el TN (Nitrógeno Total).

Las muestras necesarias para realizar el análisis son:

- Blanco de agua
- Solución TN (Nitrógeno Total; 20 mg/L)
- Solución IC (Carbono Inorgánico; 100 mg/L)
- Solución TC (Carbono Total: 100 mg/L)

Las muestras a analizar se diluyen de acuerdo a lo requerido utilizando agua y se coloca una solución control que representa la concentración de azúcares al inicio del experimento. El blanco de agua y las soluciones de TN, IC y TC han de colocarse al inicio y final del análisis para verificar el buen funcionamiento del equipo.

4.7. Determinación de Parámetros Cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos de los microorganismos presentes en el fango activo que son capaces de eliminar el N_2O , se realizaron diversas cinéticas de consumo de sustrato. Se preparan tres botellas de 1200 ml en las cuales se adiciona como medio líquido, el medio mineral (200ml), una fuente de carbono (1ml de glucosa y 1 ml de acetato) y un volumen de 3 ml de fango. Se lleva a cabo un lavado de las botellas con helio una vez cerradas y se adiciona O_2 a diferentes concentraciones. (Tabla 6). Se preparan 5 botellas con cada una de las concentraciones de O_2 (0%, 1% y 2%) y se le añade a cada una de ellas una concentración diferente de N_2O . (Tabla 7).

Botella	[O_2]
B1	0% (0ml)
B2	1% (10ml)
B3	2% (20ml)

Tabla 6. Diferentes concentraciones de gas O_2 para determinar los parámetros cinéticos

Botella	[N_2O]
B1, B2 y B3	20 ppm (1ml)
	50 ppm (5ml)
	100ppm (10ml)
	200 ppm (20ml)
	500 ppm (50ml)

Tabla 7. Concentraciones crecientes de N_2O para determinar los parámetros cinéticos

Es importante que la adición de fango en cada botella se realice de forma secuencial, de modo que la primera inyección en todas las botellas se lleve a cabo pasados 10 minutos de la adición del fango. Se realizan con cada una de

las muestras inyecciones a intervalos regulares de tiempo con la finalidad de obtener las curvas de consumo de N_2O a las diferentes concentraciones de O_2 empleadas.

Los parámetros cinéticos obtenidos serán la tasa inicial de consumo para cada una de las concentraciones de N_2O empleadas, la tasa máxima específica de crecimiento μ_{max} y la constante de saturación K_s . Estos datos permiten conocer en qué condiciones crecen más rápido los microorganismos y en qué condiciones es más fácil asimilar los nutrientes por los microorganismos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Efectos del O₂ sobre el consumo de N₂O

Los ensayos realizados en las botellas pequeñas permitieron observar errores experimentales, cuya subsanación permitió mejorar los ensayos posteriores, por ejemplo, se producía la entrada de aire, posiblemente debido a que estuvieran mal selladas y al alto número de pinchazos al que son sometidos los tapones de goma de las botellas. En el experimento final se procedió a sellar las botellas con cinta aislante, así como reducir en lo posible el número de pinchazos.

En la realización del ensayo se extraía un volumen de gas de las botellas cerradas igual al volumen de O₂ y N₂O que iba a adicionarse, con la finalidad de evitar sobrepresiones, pero esto favorecía la entrada de aire al aumentar como ya se ha comentado el número de pinchazos al que eran sometidas. En el experimento final se ha omitido la extracción de gas, pues un análisis de la presión ha demostrado que la sobrepresión producida no era excesiva.

La realización de los ensayos hizo evidente que era necesario aumentar la fase líquida, así como la concentración de biomasa inicial, para poder obtener la cantidad de biomasa suficiente para los análisis requeridos.

Una vez finalizado el experimento en botellas de menor volumen, se procedió a repetir el experimento utilizando botellas con un volumen de 1200 ml. Las botellas, como ya se mencionó en la metodología, contenían N₂O a una concentración de 200 ppm y diferentes concentraciones de O₂. La Tabla A1 del Anexo muestra las concentraciones de los diferentes gases al inicio del experimento. En la Tabla A2 del Anexo se pueden observar las concentraciones de los mismos gases después de 9 días en los que las botellas estuvieron sometidas a una agitación de 300 rpm y fueron incubadas a 25°C.

Como se observa en la Figura 2, la concentración de CO₂ va aumentando con respecto al tiempo lo cual es un indicativo de que se está produciendo actividad metabólica por parte de los microorganismos y en las botellas se observa un aumento de la biomasa. La concentración de O₂ (Figura 3) disminuye probablemente debido a que los microorganismos lo están utilizando como fuente de energía.

Los resultados del análisis de N₂O muestran que la concentración de este gas ha disminuido por completo en las botellas 1, 2 y 3, mientras que en las botellas 4 y 5

el consumo de N_2O por parte de los microorganismos es reducido (Figura 4). Esto es debido a que esas primeras botellas apenas tienen oxígeno, lo que provoca que los microorganismos comiencen rápidamente a consumir el N_2O , llevando a cabo un proceso de desnitrificación. Mientras que en las botellas 4 y 5, la alta concentración de oxígeno, provoca que este se consuma primero debido a que es más fácilmente asimilable. Con respecto a la concentración de N_2 (Figura 5), no se registran cambios significativos en las concentraciones registradas al inicio y final del experimento.

Después de 13 días de experimentación, las botellas que permanecían cerradas son abiertas y vaciadas y la fase líquida es centrifugada para separar la biomasa y el sobrenadante para análisis posteriores de TOC y composición química de la biomasa.

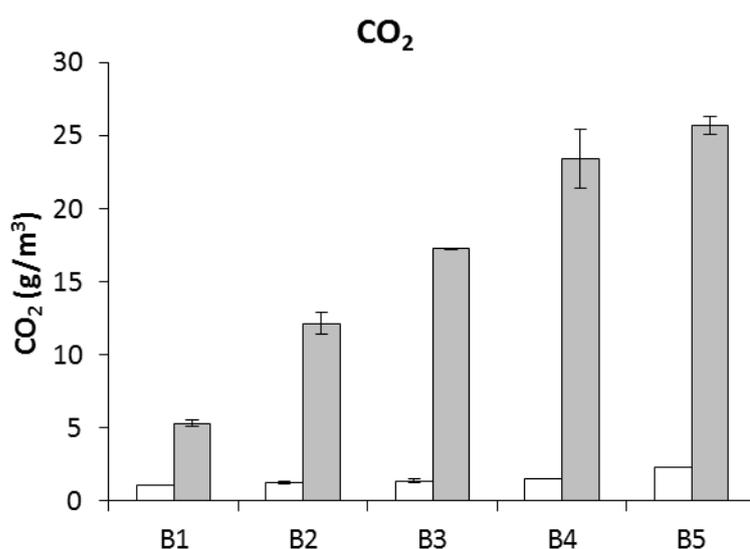


Figura 2. Evolución de la Concentración de CO_2 en las diferentes botellas. □ Día 0; ■ Día 9. B1 (0% O_2), B2 (1% O_2), B3 (2% O_2), B4 (5% O_2), B5 (21% O_2)

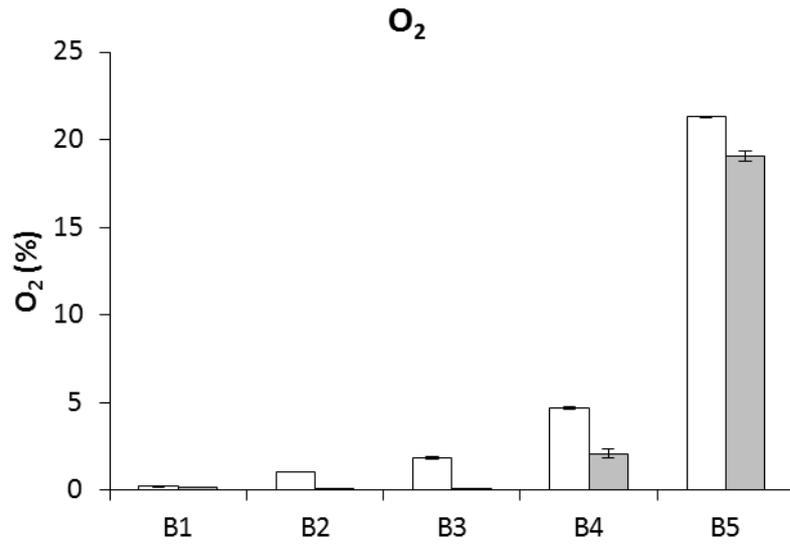


Figura 3. Evolución de la Concentración de O₂ en las diferentes botellas. □ Día 0; ■ Día 9. B1 (0% O₂), B2 (1% O₂), B3 (2% O₂), B4 (5% O₂), B5 (21% O₂)

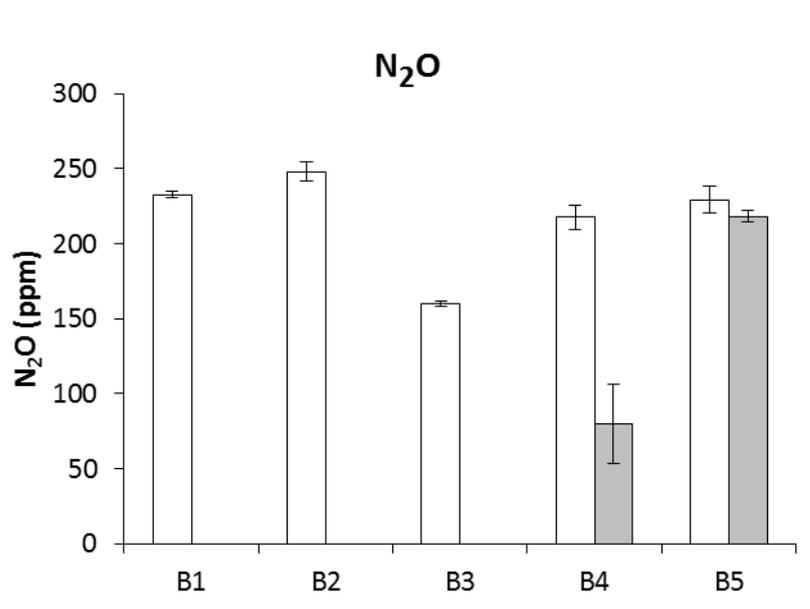


Figura 4. Evolución de la Concentración de N₂O en las diferentes botellas. □ Día 0; ■ Día 9. B1 (0% O₂), B2 (1% O₂), B3 (2% O₂), B4 (5% O₂), B5 (21% O₂)

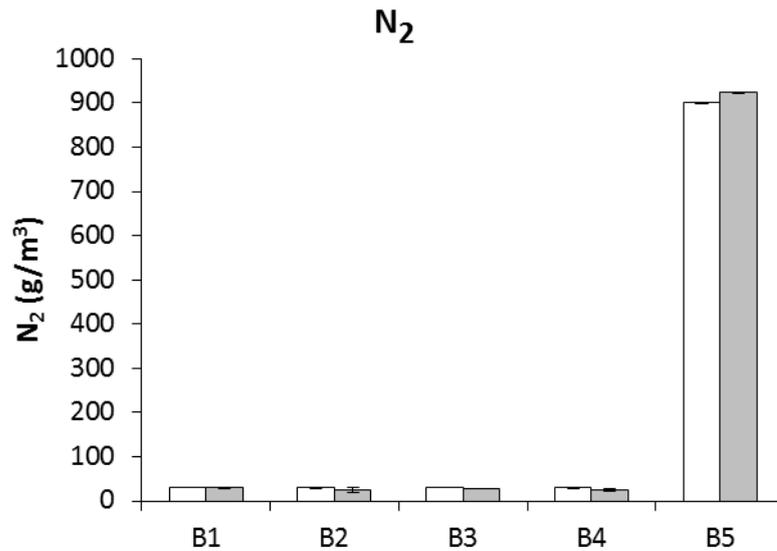


Figura 5. Evolución de la Concentración de N₂ en las diferentes botellas. □ Día 0; ■ Día 9. B1 (0% O₂), B2 (1% O₂), B3 (2% O₂), B4 (5% O₂), B5 (21% O₂)

5.2. Carbono Orgánico Total (TOC) y Nitrógeno Total (TN)

La tabla 8 muestra la concentración de nitrógeno (TN) presente en el medio líquido, expresado en mg/L para cada una de las diferentes condiciones utilizadas. La concentración inicial el en medio era de 0.16 mg/L y fue aumentando en todas las botellas debido a la adición de N₂O, ya que es la única fuente de nitrógeno añadida.

Botella	%O ₂	TN (mg/L)
B0	0	0.16
B1	0	2.01
B2	1	1.98
B3	2	1.65
B4	5	2.51
B5	21	2.81

Tabla 8. Concentración de nitrógeno total

Se ha comprobado que en la fase gaseosa se pierde algo de N₂. En el análisis de TN se aprecia un pequeño aumento de este nitrógeno con respecto al blanco, lo cual es un indicativo de que parte de ese nitrógeno pasa al medio líquido.

La Tabla 9 muestra la concentración de Carbono Orgánico Total (TOC) expresado en mg/L al final del experimento; se observa que la concentración de oxígeno presente tiene influencia sobre la cantidad de fuente de carbono consumida.

Botella	TOC (mg/L)
B0	21.35
B1	19.13
B2	8.41
B3	5.49
B4	4.21
B5	4.55

Tabla 9. Concentración de carbono orgánico total en las botellas evaluadas al final del experimento. B0: concentración inicial.

5.3. Composición de la Biomasa

El análisis de la composición de la biomasa se llevó a cabo para conocer si se estaban asimilando los nutrientes del medio de manera diferente, principalmente para intentar determinar que ocurría con el N₂O, ya que los resultados muestran que el nitrógeno de la fase gaseosa no aumenta. Los resultados (Tabla 10) muestran que el nitrógeno presente en las células no aumenta por lo que se puede concluir que las células no lo están asimilando para formar parte de su biomasa.

Botellas	%C ± I	%H ± I	%N ± I	%S ± I
0	38.40 ± 0.26	5.66 ± 0.24	7.19 ± 0.25	0.87 ± 0.35
1	38.00 ± 0.26	5.57 ± 0.24	6.02 ± 0.25	1.20 ± 0.35
2	38.01 ± 0.26	5.52 ± 0.24	5.81 ± 0.25	0.98 ± 0.35
3	36.65 ± 0.26	5.49 ± 0.24	6.39 ± 0.25	0.92 ± 0.35
4	32.41 ± 0.26	4.49 ± 0.24	4.71 ± 0.25	0.75 ± 0.35
5	32.09 ± 0.26	4.73 ± 0.24	5.00 ± 0.25	0.83 ± 0.35

Tabla 10. Composición de la Biomasa. La botella 0 es un blanco que indica la composición inicial de la biomasa. B1 (0%), B2 (1%), B3 (2%), B4 (5%), B5 (21%)

Los valores de los porcentajes de C y N obtenidos son muy bajos, el carbono debería estar en torno al 50 % y el nitrógeno entorno al 10%, esto nos indica que posiblemente habría que aumentar estas fuentes.

5.4. Selección de las condiciones más óptimas

De acuerdo con los resultados obtenidos finalizado el experimento, se observa que en las botellas 4 y 5 que son las que contienen una mayor concentración de O_2 , la eliminación de N_2O es muy baja, debido probablemente a que la presencia del oxígeno puede impedir que los microorganismos utilicen preferentemente el óxido nitroso. Por esta razón, se decidió descartar estas condiciones y seguir adelante sólo con las concentraciones de 0%, 1% y 2% de O_2 ya que de acuerdo con la evolución de la concentración de N_2O a diferentes concentraciones de oxígeno, observamos que el consumo de óxido nitroso es mucho mayor cuando la concentración de oxígeno es baja debido a que este consumo se favorece en condiciones anaerobias. Con la finalidad de realizar estudios posteriores que nos proporcionen información sobre las poblaciones microbianas que son capaces de eliminar el N_2O bajo las condiciones evaluadas, las botellas seleccionadas se mantuvieron con las condiciones iniciales por un periodo de 30 días para permitir el acondicionamiento de los microorganismos así como el incremento en la biomasa. Las Figuras 6 y 7 muestran la evolución de la concentración de O_2 y N_2O respectivamente, se realizaron mediciones mediante cromatografía de gases para conocer la concentración de los gases evaluados y así poder introducir en las botellas el volumen necesario de cualquiera de los gases, siempre que estos se hubieran consumido y fuera necesario volver a ajustar la concentración inicial (ver Anexo A3, A4 y A5). Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones se mantenían constantes. En las Tablas 11 y 12 se observan los datos obtenidos durante este periodo y los volúmenes de O_2 y N_2O introducidos en las botellas.

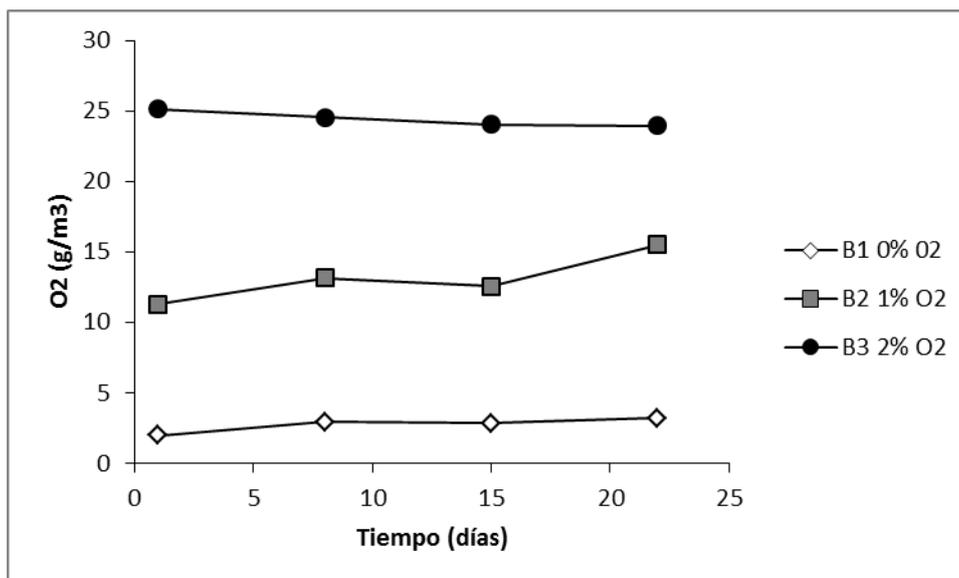


Figura 6. Evolución de la concentración de O₂ durante el ensayo de eliminación de N₂O para la obtención de la biomasa aclimatada ◊ B1: 0% de O₂; ■ B2; 1% de O₂; • B3: 2% de O₂.

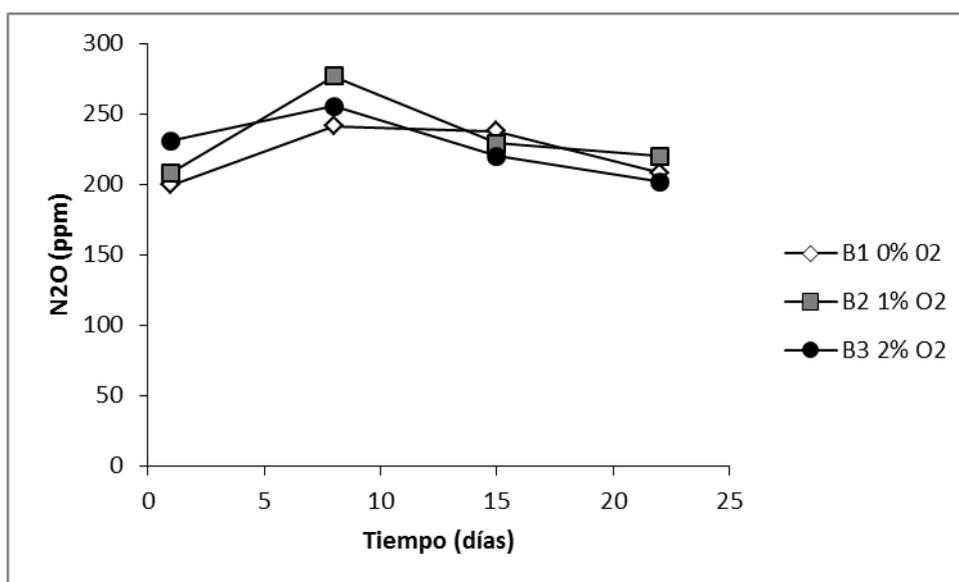


Figura 7. Evolución de la concentración de N₂O durante el ensayo de eliminación de N₂O para la obtención de la biomasa aclimatada ◊ B1: 0% de O₂; ■ B2; 1% de O₂; • B3: 2% de O₂.

Botella	[O ₂] día 7	[O ₂] requerido	[O ₂] adicionado
B1	0.143%	0% (0ml)	0% (0ml)
B1R	0.048%	0% (0ml)	0% (0ml)
B2	0.055%	1% (10ml)	0.945% (10ml)
B2R	0.105%	1% (10ml)	0.895% (9ml)
B3	1.268%	2% (20ml)	0.732% (7.4ml)
B3R	1.175%	2% (20ml)	0.825% (8.3ml)

Tabla 11. Concentración de O₂

Botella	[N ₂ O] día 7	[N ₂ O] requerida	[N ₂ O] adicionada
B1	0 ppm	200ppm (20 ml)	200ppm (20 ml)
B1R	0 ppm	200ppm (20 ml)	200ppm (20 ml)
B2	1.53 ppm	200ppm (20 ml)	200ppm (20 ml)
B2R	0.43 ppm	200ppm (20 ml)	200 ppm (20ml)
B3	206 ppm	200ppm (20 ml)	0 ppm (0 ml)
B3R	198 ppm	200ppm (20 ml)	0 ppm (0ml)

Tabla 12. Concentración de N₂O

Finalmente, una vez transcurridos los 30 días de aclimatación, se centrifuga el contenido de las botellas, se recoge la biomasa y se guarda congelada.

5.5. Determinación de parámetros cinéticos

Determinados los parámetros cinéticos, se obtienen las curvas que nos indican la velocidad de consumo del N₂O llevada a cabo por los microorganismos presentes en el medio líquido.

Los resultados obtenidos en el cromatógrafo una vez inyectadas las botellas nos dan el resultado en ppm en la fase gaseosa, a partir de la cual debemos calcular la concentración en la fase líquida en g/m³ a partir de la constante de Henry (H), que nos permite conocer a una temperatura constante la cantidad de gas que se encuentra disuelta en el medio líquido. El valor de la constante de Henry para el N₂O es de 1.63.

La Tabla 13 muestra las pendientes obtenidas al representar el tiempo de cinética vs la concentración de N₂O (Ver Anexo Figuras A5-A19) para cada una de las concentraciones empleadas, este dato representa la tasa inicial de consumo de N₂O.

[N ₂ O] (ppm)	B1 (g/m ³ /h)	B2 (g/m ³ /h)	B3 (g/m ³ /h)
20	0.0110	0.0038	0.002
50	0.0235	0.0134	0.0068
100	0.0375	0.0164	0.0076
200	0.0703	0.0328	0.0112
500	0.1126	0.0364	0.0129

Tabla 13. Tasa inicial de consumo a diferentes concentraciones de N₂O. B1 (0% O₂), B2 (1% O₂) y B3 (2% O₂).

Cuanto mayor es la concentración de O₂ presente, menor es la tasa específica de consumo de N₂O lo que indica que los microorganismos consumen más rápido el N₂O en ausencia de oxígeno que es el proceso típico de desnitrificación; sin embargo, es importante resaltar que aunque la eliminación de N₂O es más lenta, en el fango activo hay presencia de microorganismos que son capaces de consumir N₂O en presencia de O₂.

Cuanto mayor es la concentración de N₂O, en las tres botellas, mayor es la tasa inicial de consumo; es decir, con la misma concentración de oxígeno, los microorganismos consumen más rápido el N₂O.

Para determinar los parámetros cinéticos (μ_{max} y K_s), se utilizó la Ecuación de Monod, que describe el crecimiento celular en función de la disponibilidad de un sustrato limitante, en este caso ese sustrato (S) limitante es el N₂O adicionado, necesitamos conocer la tasa específica de crecimiento (μ) y calcular la tasa específica máxima de crecimiento (μ_m) así como la K_s que es la constante de Monod (concentración a la cual μ es $\frac{1}{2}$ de μ_m). (Tabla 14)

Ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_m * (S / (K_s + S))$$

Botellas	μ_{\max} (1/h)	K_s (g/m ³)
B1 (0% O₂)	0.00468	0.6026
B2 (1% O₂)	0.000835	0.1100
B3 (2% O₂)	0.000326	0.1012

Tabla 14. Parámetros cinéticos obtenidos mediante la ecuación de Monod (μ_{\max} y K_s) a diferentes concentraciones de O₂

Los valores experimentales de μ se obtienen dividiendo la tasa inicial de consumo calculada anteriormente (Tabla 13) entre la biomasa total que tiene un valor de 51 g/m³. Los valores teóricos de los parámetros cinéticos, se obtienen mediante aproximaciones por métodos numéricos utilizando el complemento de Excel, Solver. En las Figuras 8, 9 y 10 se observan las gráficas que representan la dependencia de la velocidad específica de crecimiento (μ) respecto a la concentración de sustrato (N₂O), tanto para los valores experimentales como para los valores teóricos.

El mayor valor de μ_{\max} (valor máximo que puede alcanzar la velocidad de crecimiento cuando $S \gg K_s$) que en este caso se corresponde con la botella B1, indica que en esas condiciones los microorganismos son capaces de crecer más rápido se encuentra el microorganismo, puede ser debido a que al encontrarse en ausencia de oxígeno el microorganismo no encuentre ningún inhibidor o limitante que impida o retarde su crecimiento; es decir, puede existir una influencia del oxígeno que provoque que a menor presencia de este compuesto mayor sea la velocidad de crecimiento.

El menor valor de K_s , (concentración de nutriente limitante a la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima) indica que los microorganismos presentes en ese medio, en este caso la botella B3, son los más afines por el sustrato; es decir, son los microorganismos que más facilidad tienen para consumir el N₂O, aunque su tasa de consumo y de crecimiento sea menor; es decir, tenemos dos condiciones diferentes, una cuando el oxígeno es cero y otra cuando hay oxígeno, ya que los valores de K_s de las botellas B2 y B3 son muy parecidos

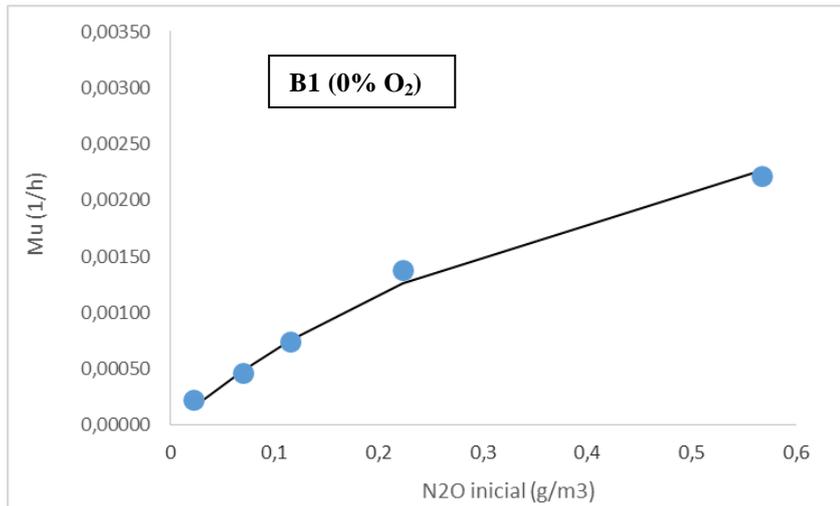


Figura 8. Concentración inicial N₂O vs tasa específica de crecimiento. B1 (0% O₂). ● Valores obtenidos experimentalmente; — Valores teóricos

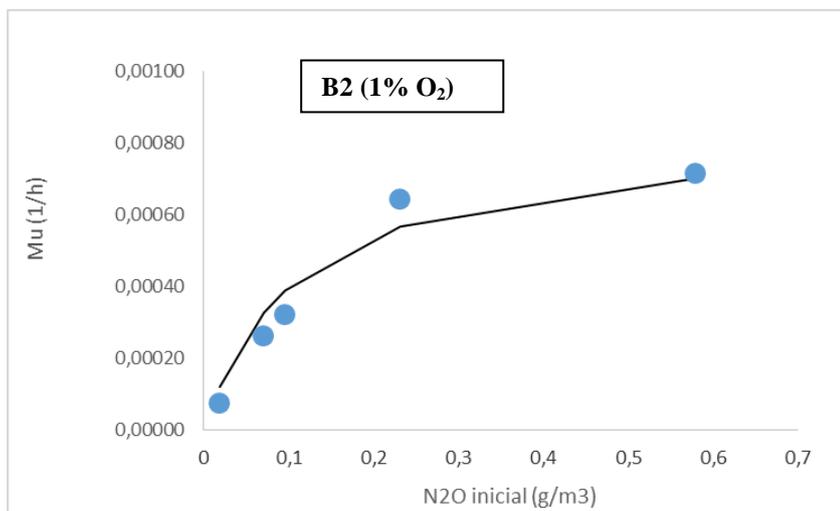


Figura 9. Concentración inicial de N₂O vs tasa específica de crecimiento. B2 (1% O₂). ● Valores obtenidos experimentalmente; — Valores teóricos

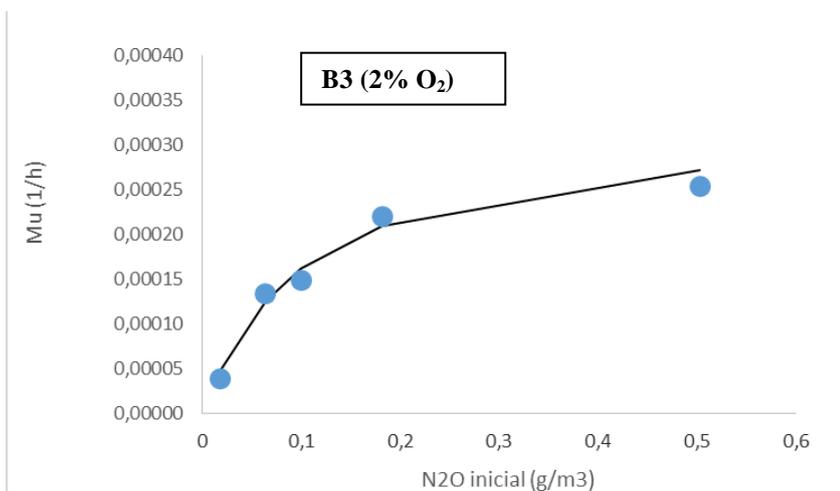


Figura 10. Concentración inicial de N₂O vs tasa específica de crecimiento. B3 (2% O₂). ● Valores obtenidos experimentalmente; — Valores teóricos

6. CONCLUSIONES

La experimentación llevada a cabo ha demostrado que en presencia de condiciones anaerobias o bajas concentraciones de oxígeno, el N_2O presente en el medio gaseoso es degradado y consumido por los microorganismos presentes en el Fango Activo.

En condiciones aerobias, este consumo de N_2O no se produce o bien es mucho más lento, debido a que el oxígeno presente en la fase gaseosa es mucho más soluble en el medio líquido, y además es un compuesto más fácilmente asimilable.

El uso de N_2O como única fuente de nitrógeno puede obligar a que los microorganismos lo consuman y probablemente lo utilicen para su crecimiento, ya que no tienen en el medio otras fuentes de nitrógeno. Sería probable que los microorganismos lo estén incorporando en sus rutas metabólicas pero no como parte de su biomasa, siendo por esto que cuando en el medio no hay presencia de oxígeno el N_2O es consumido de forma instantánea. Sin embargo, no es claro que el nitrógeno sea asimilado por las células ya que su composición química no lo demuestra y además tampoco se observa un aumento de la concentración en la fase gaseosa. Es posible que una parte se solubilice en el medio líquido ya que el análisis de nitrógeno total muestra que la concentración con respecto al blanco aumenta en todos los experimentos.

Queda mucha investigación aún por delante para definir claramente el uso que los microorganismos dan al N_2O que consumen y eliminan, pero la sustitución de los medios fisicoquímicos por medios biológicos para la eliminación del N_2O es cada vez más viable por lo que es importante destacar el estudio a fondo de los fangos activos.

7. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a Ivonne Figueroa González, por su apoyo y enseñanzas durante la fase de investigación; además de por la orientación, seguimiento y supervisión continua durante la realización de la memoria.

Me gustaría agradecer también a Guillermo Quijano Govantes por toda la ayuda aportada en la resolución de los problemas encontrados durante la fase de investigación.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ahn J.H., Kim S., Park H., Rahm B., Pagilla K., K. Chandran. (2010). N₂O emissions from Activated Sludge Processes 2008-2009: Results of a National Monitoring Survey in the United States. *Environ Sci Technol*, 44: 4505-45-11.

Bahamonde, A. (s.f.). Eliminación de NO_x en gases de Combustión. Reducción Catalítica Selectiva.

USEPA (2012) Inventory of U.S. greenhouse gas emissions and sinks. United States Environmental Protection Agency. EPA

Estrada J., Kraakman B., Muñoz R., R. Lebrero. (2011). A comparative analysis of odour treatment technologies in wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol*, 45: 1100-1106.

IPCC, (2007). *Climate Changes 2007: synthesis report*, Intergovernmental Panel on Climate Change.

J. C. López, G. Quijano, T.S.O: Souza, J.M. Estrada, R. Lebrero, R. Muñoz. (2013). Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges. *Microbiol Biotechnol*

Liu C., Yang L, Wu G., Zhang S., Li X, J.B. Guo (2010). Estimation of dominant microbial population sizes in the anaerobic granular sludge of a full-scale UASB treating streptomycin wastewater by PCR-DGGE. *World J Microbiol Biotechnol*, 26: 375-379.

M. T. Madigan, J. M. Martin, J. Parker (1999). Brock, *Biología de los Microorganismos*.

Santiago Villaverde. (2004). Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. *Environmental Science and Bio/Technology* 3: 171-183

Thomas Stocker & Qin Dahe. IPCC (2013). *Climate Changes: The Physical Science Basis Working Group I contribution to the IPCC Fifth Assessment Report*.

Wrange N., Velthof. G.L., van Beusichem M.L., O. Oenema. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol Biochem*, 33: 1723-1732.

Yongzhen Peng, Guibing Zhu. (2006). Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway *Microbiol Biotechnol*. 73: 15-26

Anexo

CURVAS DE CALIBRADO

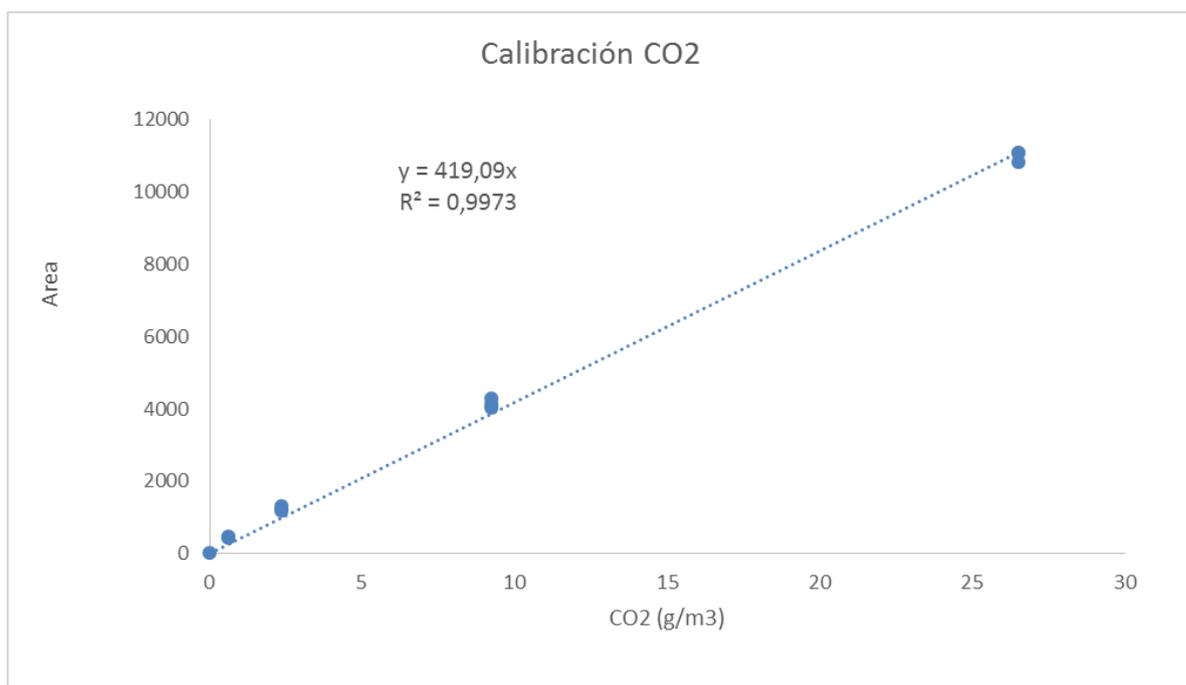


Figura 11. Curva de Calibrado de CO₂

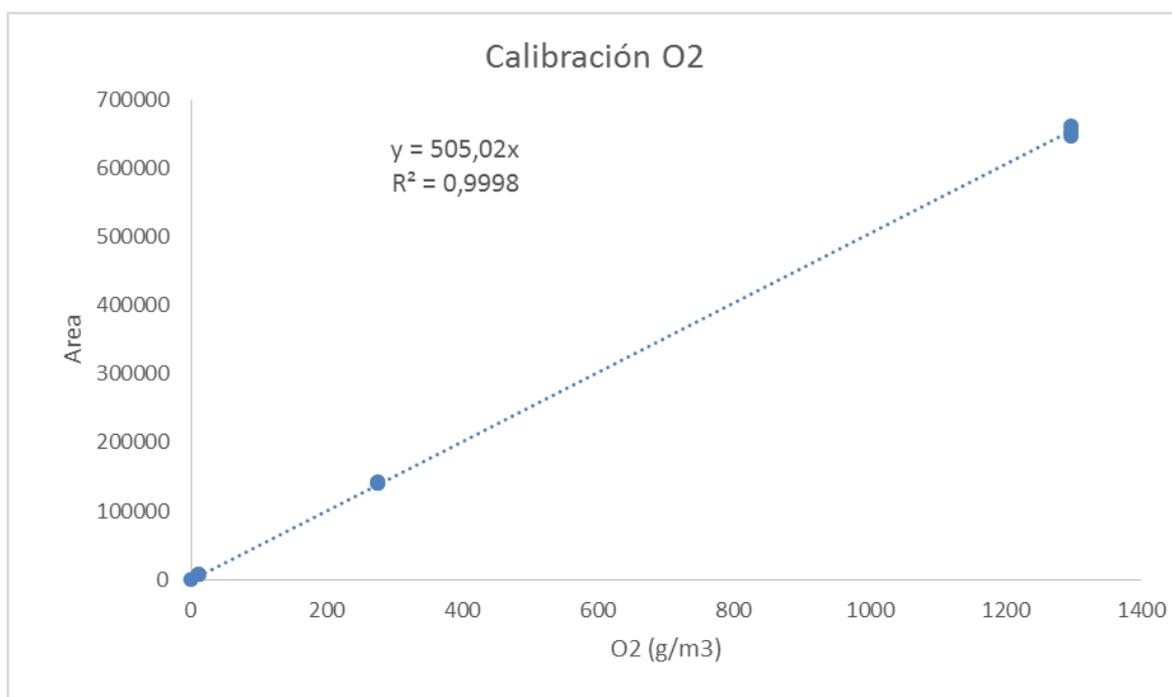


Figura 12. Curva de Calibrado de O₂

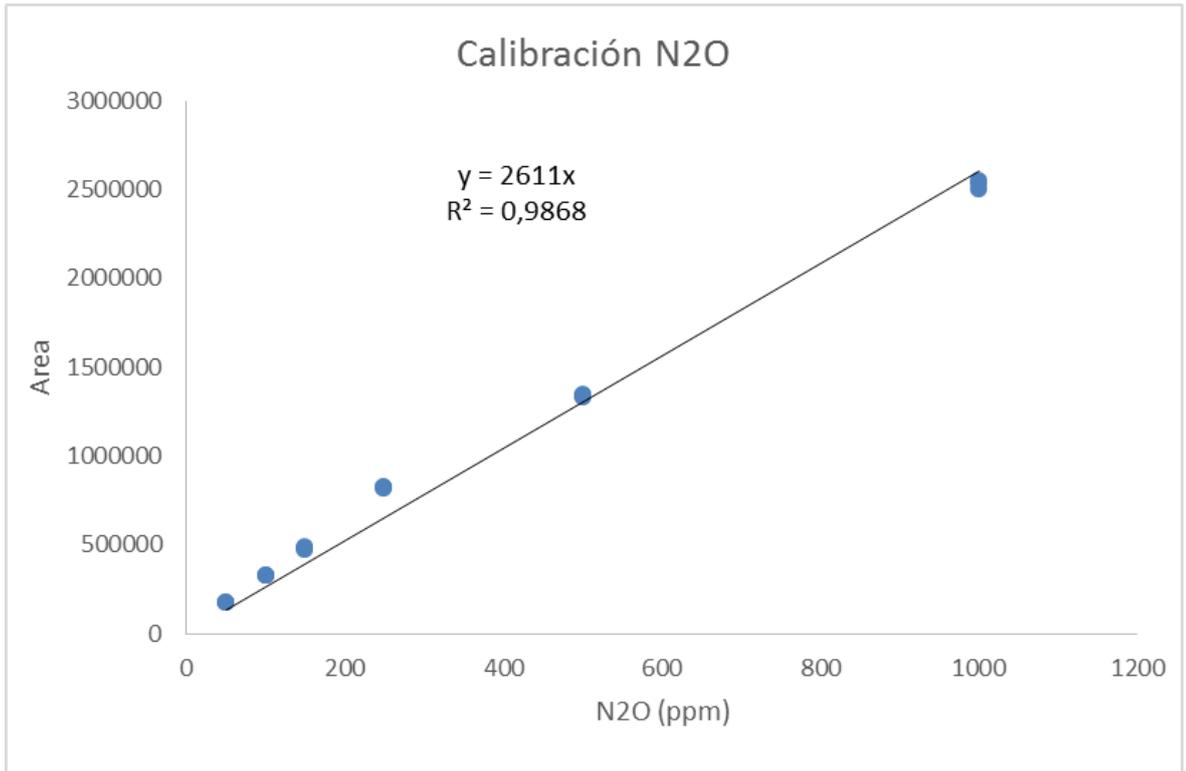


Figura A3. Curva de Calibrado de N₂O. . De 0 ppm a 1000 ppm (volumen de inyección 100 µl)

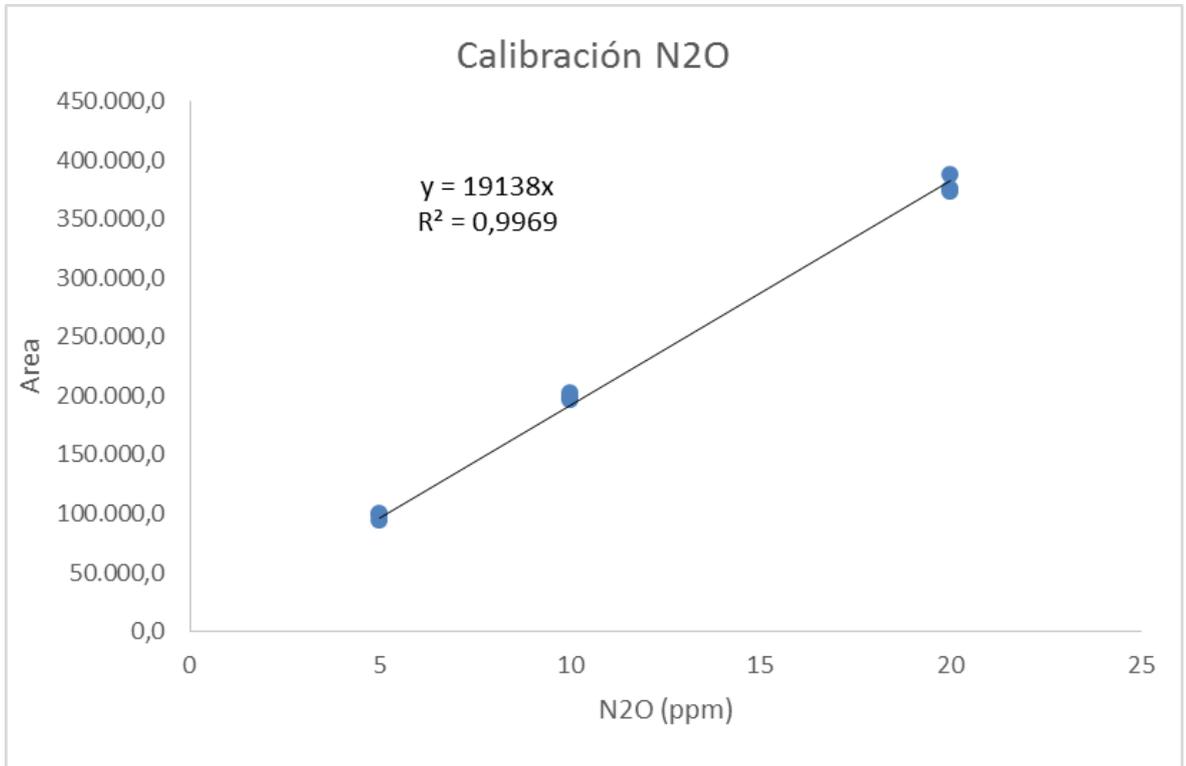


Figura A4. Curva de Calibrado N₂O. De 0 ppm a 20 ppm (volumen de inyección 500 µl)

EFFECTOS DEL O₂ SOBRE EL CONSUMO DE N₂O

Botellas	CO ₂ (g/m ³)	O ₂ (g/m ³)	O ₂ (%)	N ₂ O (ppm)	N ₂ (g/m ³)
1	1.11	2.88	0.22	233	30.88
2	1.26	13.95	1.07	248	29.64
3	1.38	24.22	1.85	160	31.71
4	1.52	61.65	4.71	217	29.60
5	2.29	278.77	21.29	229	899.88

Tabla A1. Concentración de gases. Día 1

Botellas	CO ₂ (g/m ³)	O ₂ (g/m ³)	O ₂ (%)	N ₂ O (ppm)	N ₂ (g/m ³)
1	5.32	2.42	0.18	0	30.05
2	12.13	0.33	0.03	0	25.15
3	17.25	1.27	0.10	0	27.50
4	23.41	27.40	2.09	80	24.86
5	25.71	249.51	19.05	218	922.98

Tabla A2. Concentración de gases. Día 9

SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES MÁS ÓPTIMAS

Botellas CO2	Día 1	Día 8 (sin gas)	Día 8 (con gas)	Día 15	Día 22 (sin gas)	Día 22 (con gas)
B1	0.282	5.578	6.010	1.647	5.140	4.964
B2	0.457	11.791	11.767	3.877	15.040	14.516
B3	0.640	18.642	17.356	5.543	16.240	16.274

Tabla A3. Evolución del CO₂

Botellas O2	Día 1	Día 8 (sin gas)	Día 8 (con gas)	Día 15	Día 22 (sin gas)	Día 22 (con gas)
B1	1.99	1.171	2.949	2.866	1.259	3.215
B2	11.284	1.522	13.138	12.552	1.050	15.523
B3	25.152	4.147	24.541	24.036	15.997	23.932

Tabla A4. Evolución del O₂

Botellas N2O	Día 1	Día 8 (sin gas)	Día 8 (con gas)	Día 15	Día 22 (sin gas)	Día 22 (con gas)
B1	199.764	0.000	241.411	237.51	0.000	208.039
B2	208.235	0.000	276.837	229.135	0.981	219.860
B3	231.071	0.000	255.386	220.195	201.923	201.923

Tabla A5. Evolución del N₂O

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS TASA INICIAL DE CONSUMO DE N₂O

Botella B1 (0% O₂)

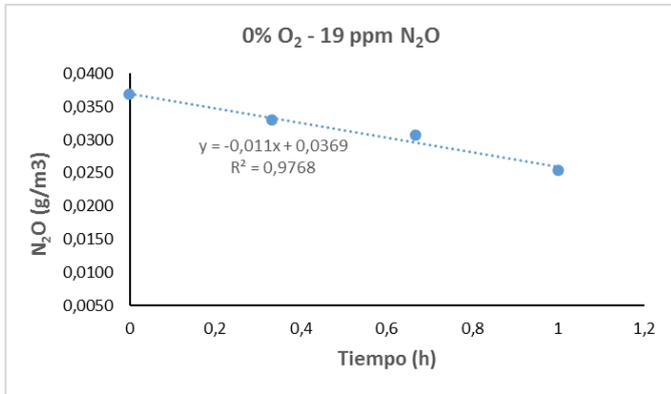


Figura A5. Velocidad de consumo de N₂O. (0% O₂ y 20 ppm de N₂O)

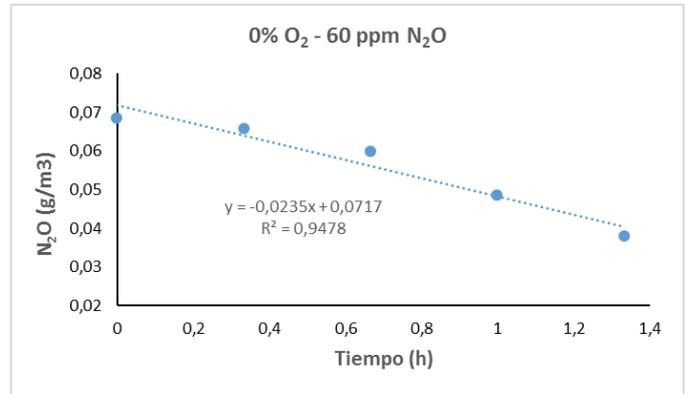


Figura A6. Velocidad de consumo de N₂O. (0% O₂ y 50 ppm N₂O)

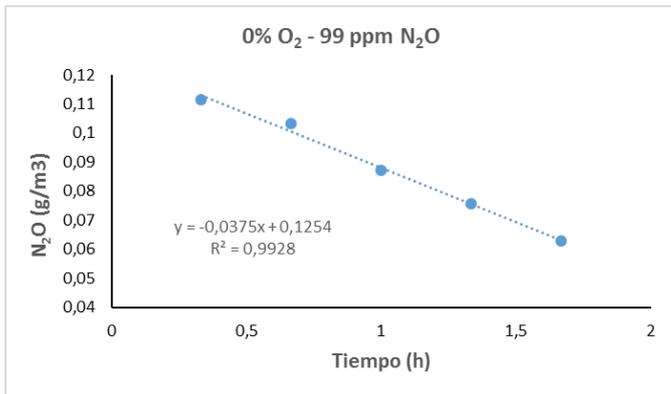


Figura A7. Velocidad de consumo de N₂O. (0% O₂ y 100 ppm N₂O)

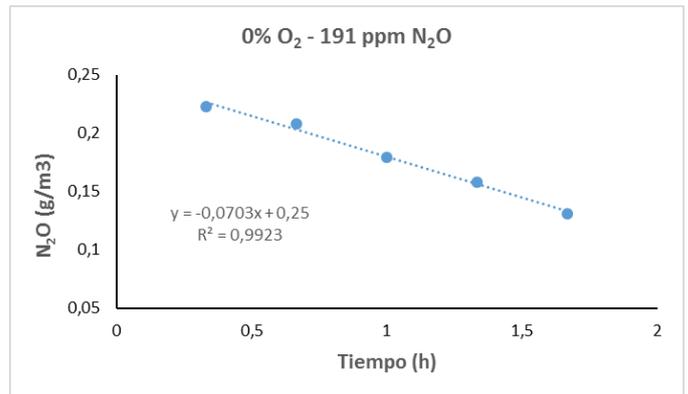


Figura A8. Velocidad de consumo de N₂O. (0% O₂ y 200 ppm N₂O)

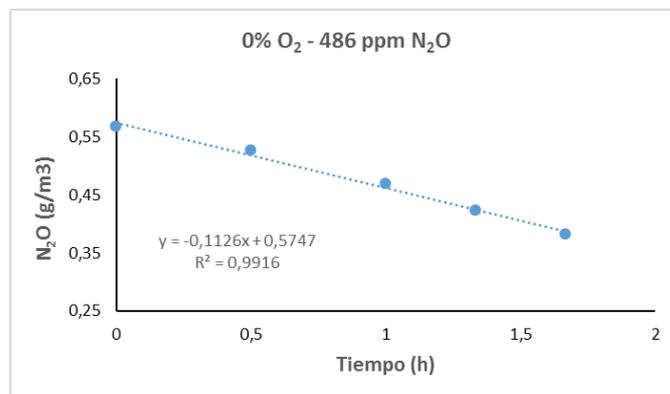


Figura A9. Velocidad de consumo de N₂O. (0% O₂ y 500 ppm de N₂O)

Botella B2 (1% O₂)

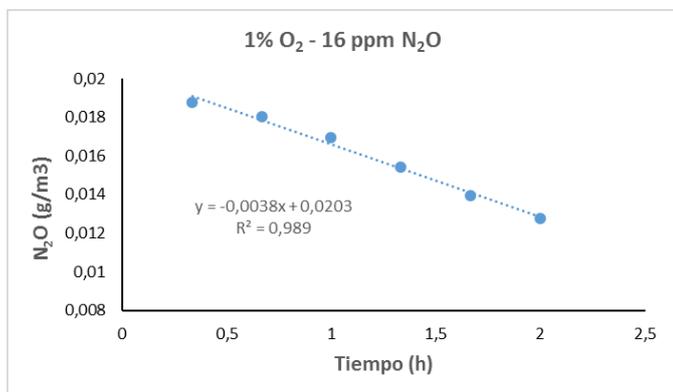


Figura A10. Velocidad de consumo de N₂O (1% O₂ y 20 ppm N₂O)

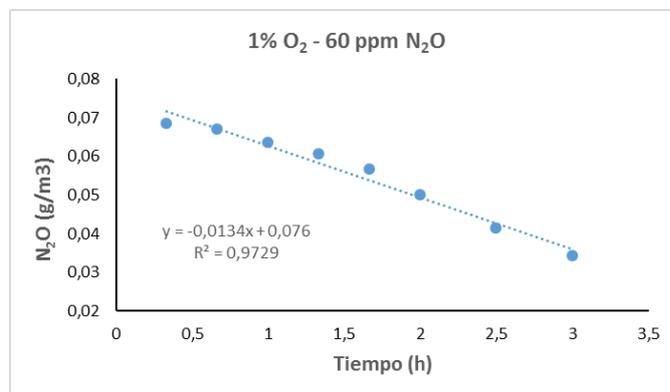


Figura A11. Velocidad de consumo de N₂O (1% O₂ y 50 ppm N₂O)

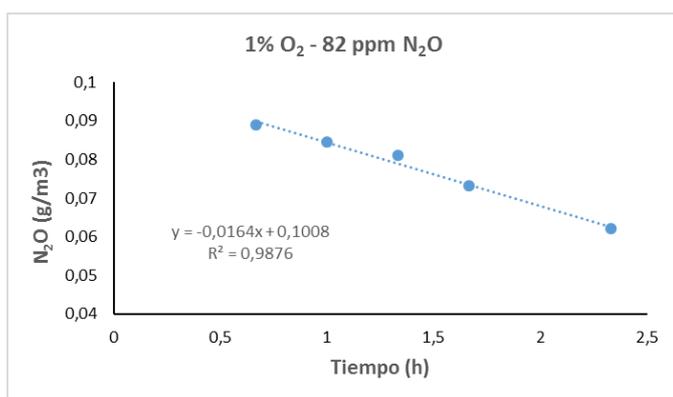


Figura A12. Velocidad de consumo de N₂O (1% O₂ y 100 ppm N₂O)

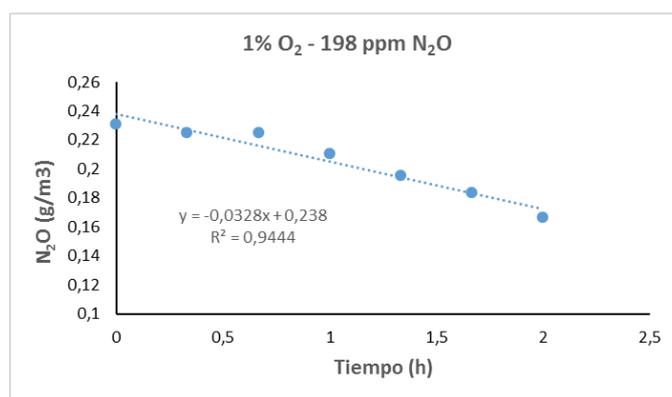


Figura A13. Velocidad de Consumo de N₂O (1% O₂ y 200 ppm N₂O)

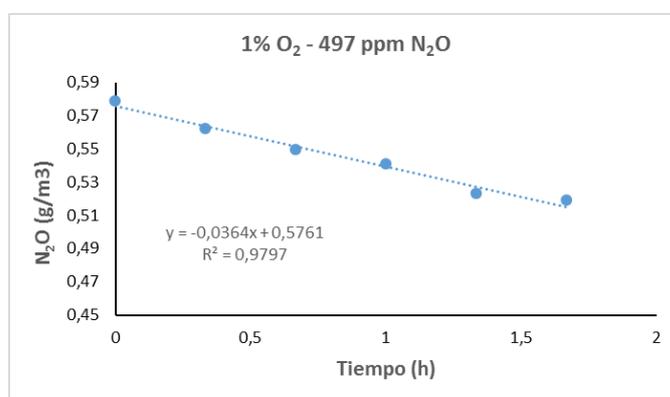


Figura A14. Velocidad de consumo de N₂O (1% O₂ y 500 ppm N₂O)

Botella B3 (2% O₂)

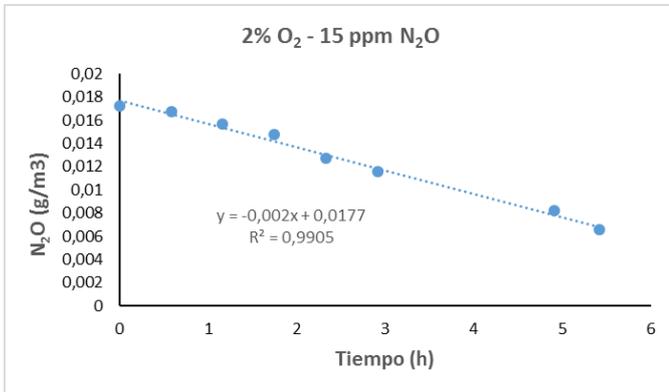


Figura A15. Velocidad de consumo de N₂O (2% O₂ y 20 ppm N₂O)

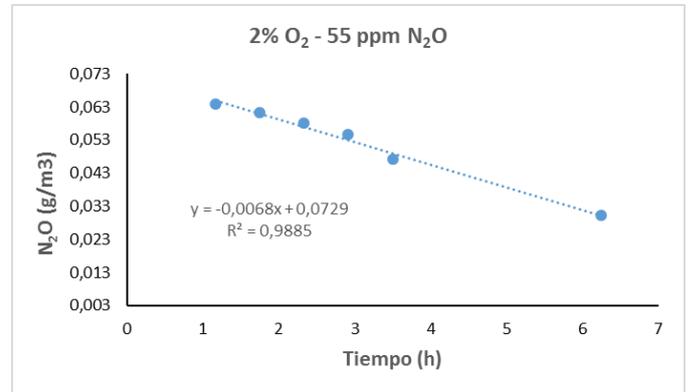


Figura A16. Velocidad de consumo de N₂O (2% O₂ y 50 ppm N₂O)

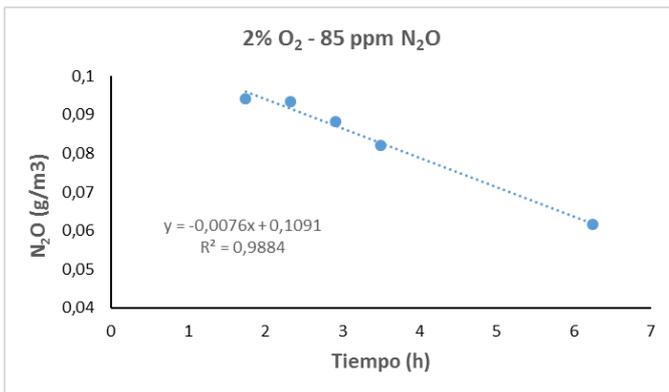


Figura A17. Velocidad de consumo de N₂O (2% O₂ y 100 ppm N₂O)

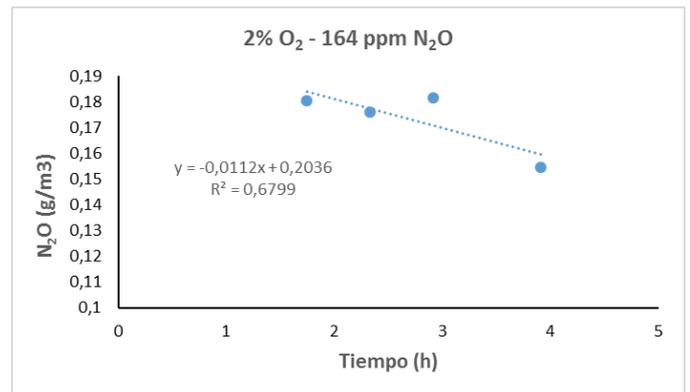


Figura A18. Velocidad de consumo de N₂O (2% O₂ y 200 ppm N₂O)

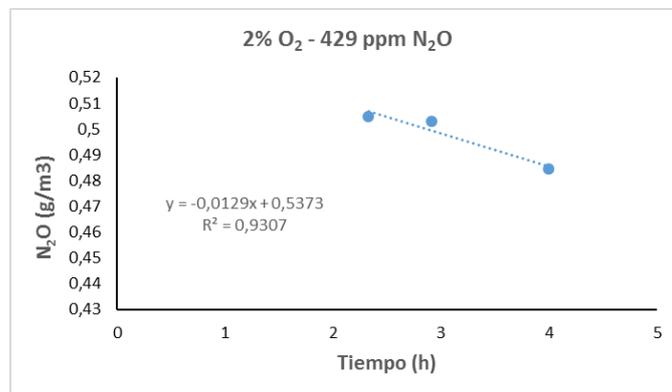


Figura A19. Velocidad de consumo de N₂O (2% O₂ y 500 ppm N₂O)