



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DE LA MATERIA ORGANICA EN LA FORMACION DE UNA
BIOPELICULA NITRIFICANTE EN UN REACTOR DE LECHO
FLUIDIFICADO**

TESIS

**Para Obtener el Grado de
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
Presenta**



Guadalupe Hernandez Eugenio

7 de noviembre de 1996



222255

Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DE LA MATERIA ORGANICA EN LA FORMACION DE UNA
BIOPELICULA NITRIFICANTE EN UN REACTOR DE LECHO
FLUIDIFICADO**

Presentada por

Guadalupe Hernández Eugenio

Jurado Formado por

Dr. Mariano Gutierrez Rojas, Presidente
Dr. Ernesto Favela Torres, Secretario
Dr. Hervé Macarie, Vocal
Dr. Jorge Gomez Hernandez, Vocal

Prólogo.

En la presente revisión, sobre la formación de biopelículas, se hará un análisis y observaciones sobre la información existente en el desarrollo de biopelículas. En primer término y de forma general, y de forma general, se presentarán los aspectos más relevantes de los microorganismos nitrificantes. Asimismo, se hará una descripción de los diferentes reactores nitrificantes, especialmente del reactor de lecho fluidificado, así como del proceso de formación de una biopelícula. El propósito del presente trabajo es enmarcar, como posibles elementos responsables para la formación de la biopelícula el tipo de soporte, así como compuestos coadyuvantes involucrados en el proceso.

La nitrificación es un proceso lento, debido a la baja de tasa de crecimiento específico de las bacterias nitrificantes, razón por la cual se deben encaminar esfuerzos para superar estas limitaciones. Se han planteado principalmente dos alternativas para lograr este propósito, una de ellas es mediante el cultivo en suspensión de lodos activados; o bien la otra alternativa es empleando sistemas de retención celular sobre un soporte sólido, mediante la formación de biopelículas.

Entre los más importantes problemas de los sistemas de lodos activados es la inestabilidad que pueden desarrollar, ocasionando, la pérdida del reactor, lo que limita la operación de grandes caudales, a fin de evitar la pérdida de la actividad biológica. Estas limitaciones no suelen presentarse en los reactores con biopelículas, teniendo así mejor capacidad volumétrica nitrificante, es decir, mejores velocidades de carga..

Se han desarrollado diferentes tipos de reactores con biopelículas, entre los que se encuentra el reactor de lecho fluidificado, éste presenta mayor capacidad volumétrica

nitrificante. Sin embargo, la operación de los sistemas fluidificados requiere de prolongados periodos para su puesta en marcha, causado principalmente por el tiempo de inducción, necesario para la formación inicial de la biopelícula.

Es necesario entender cada una de las etapas durante la adhesión y algunos factores que intervienen en el tiempo de formación de una biopelícula en sus diferentes etapas. En consecuencia, durante la revisión de la información existente, se dan algunos datos que pretenden aportar ideas o criterios que pueden ser útiles para disminuir el tiempo de formación de la biopelícula.

Dentro de las variables que se describen, se ha encontrado que el tiempo de inducción para la formación de la biopelícula nitrificante se encuentra asociado a la fase de retardo, debido a condiciones cinéticas, dinámicas, fisicoquímicas y fisiológicas del sistema entre otras. Algunos de estos factores se abordan de manera crítica a la vez que se hacen comentarios de algunos trabajos que se han desarrollado al respecto.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. UNA RETROSPECTIVA	2
2.1 CONTAMINACION POR NITROGENO	2
2.2 CICLO DEL NITROGENO	4
2.3 DEPURACION DE NITROGENO	5
2.3.1 Tratamiento Fisicoquímico	6
2.3.2 Tratamiento Biológico.	9
2.3.2.1 Desnitrificación.	10
2.3.2.2 Nitrificación.	12
2.3.2.2.1 Bacterias amonio Oxidantes	13
2.3.2.2.2 Bacterias nitrito oxidantes.	14
2.3.2.2.3 Bioquímica del proceso nitrificante.	15
2.4 TIPOS DE REACTORES NITRIFICANTES.	17
2.4.1 Reactor de Tanque Agitado.	18
2.4.2 Filtro Percolador	22
2.4.3 Filtro Sumergido.	23
2.4.4 Discos Biológicos Rotatorios.	25
2.4.5 Reactor de Lecho Fluidificado	27

2.5 FORMACION DE BIOPELICULA	30
2.6 FLUIDIFICACION	33
3. BIBLIOGRAFIA	39
4. ANEXO	44

1. RESUMEN

La intensa actividad humana e industrial ha acentuado los problemas ambientales del aire, suelo y agua, ocasionando un severo desequilibrio ecológico. Este desajuste tiene que ser reparado, para evitar problemas de mayor envergadura.

Entre los elementos contaminantes que se encuentran en mayor concentración están el carbono, nitrógeno, y en menor proporción fósforo y azufre. Existen una gran variedad de técnicas fisicoquímicas, para la depuración de nitrógeno de las aguas residuales. También existe una vía biológica para depurar el nitrógeno amoniacal, la cual consiste en la oxidación a nitrato, (proceso de nitrificación y la posterior reducción del nitrato producido a nitrógeno molecular (desnitrificación). La nitrificación representa la etapa más lenta del proceso global, debido a la baja tasa de crecimiento específico de las bacterias involucradas. Cabe señalar que la tasa de crecimiento de las bacterias nitrificantes es aproximadamente de la mitad de la tasa de crecimiento específico de las bacterias desnitrificantes, razón por la cual se deben encaminar esfuerzos para mejorar el proceso. Se han planteado principalmente dos alternativas para lograr este propósito, una de ellas es mediante el cultivo en suspensión de microorganismos en suspensión, bajo la forma de lodos activados, y la otra alternativa es concentrar una gran cantidad de biomasa nitrificante sobre un soporte sólido, mediante la formación de biopelículas.

Se han desarrollado, además de los reactores de tanque agitado diferentes tipos de reactores con biopelículas, entre los que se encuentra el reactor de lecho fluidificado. La operación de los sistemas fluidificados requiere de prolongados de arranque, causado por el tiempo de inducción necesario para la formación inicial de la biopelícula.

2. UNA RETROSPECTIVA

2.1 CONTAMINACION POR NITROGENO

El estudio de la contaminación del agua ocupa un lugar destacado en la actualidad. El nitrógeno se encuentra entre los elementos contaminantes de mayor concentración en las aguas residuales. Pudiéndose presentar en los efluentes en cualquiera de sus formas oxidadas como nitrito, nitrato, o bien como ion amonio, así como amoniaco. Cualquiera de estos compuestos, en concentraciones superiores a las permisibles, provocan un desequilibrio ecológico en ambientes marinos (Halling y Jorgensen, 1993).

El nitrógeno es usado por todos los seres vivos para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados, pero en aguas residuales puede convertirse en un factor contaminante. Una fracción importante de los compuestos nitrogenados presentes en aguas residuales provienen de la descomposición de materia orgánica, o bien de procesos en donde se utiliza o genera el amoniaco, urea o nitrato, tal es el caso de fertilizantes industriales o naturales.

El nitrógeno en grandes concentraciones puede provocar efectos nocivos, como la eutroficación en ecosistemas acuáticos (Halling-Sörensen y Jorgensen, 1993). Este fenómeno consiste en el enriquecimiento artificial de nutrientes como fósforo y nitrógeno, propiciando así una sobrepoblación de fitoplancton, que al degradarse puede llevar a la transformación del lago a un pantano (Ramalho, 1983).

En el proceso de descomposición de proteínas (Figura 1) se obtienen finalmente grandes concentraciones amonio compuesto que es tóxico para la vida animal y humana, las altas concentraciones de este compuesto químico ocasiona metahemoglobinemia, la cual es una enfermedad que afecta a infantes menores de tres meses, ocasionándoles la muerte por asfixia (Garrido, 1995).

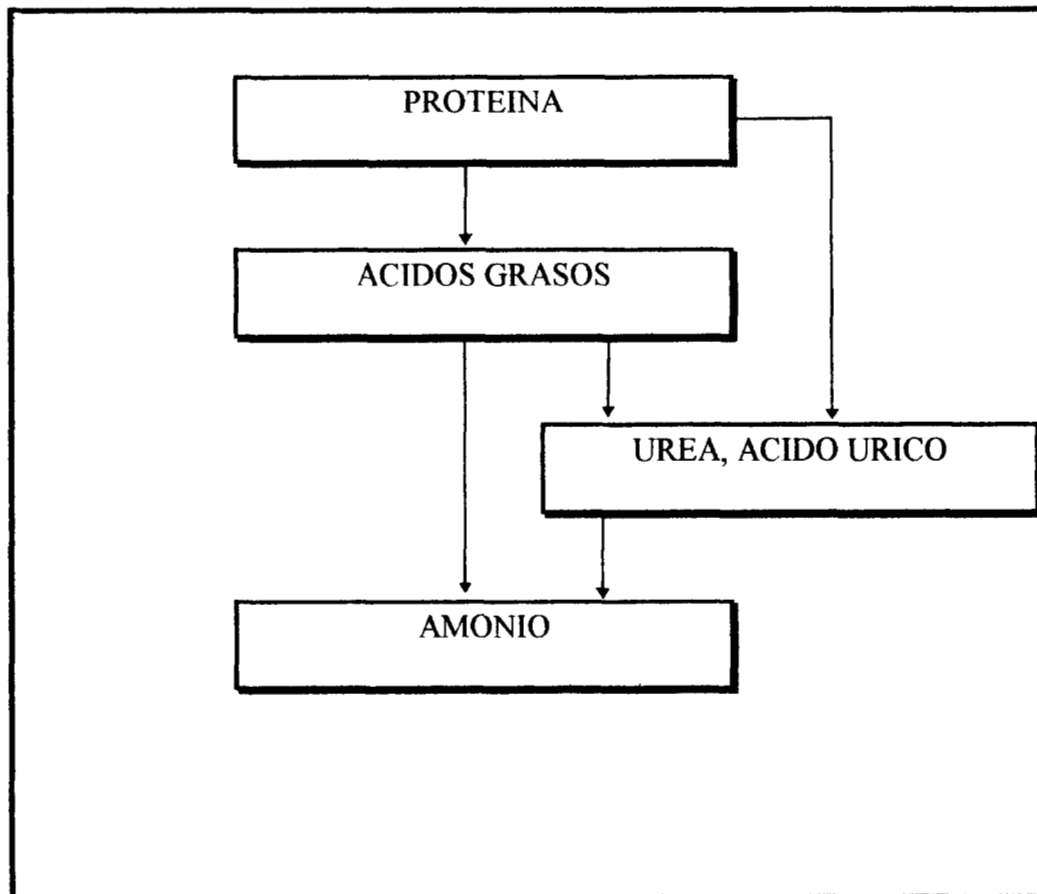


Figura 1. Cadena de descomposición de proteínas hasta amonio

Otro problema que se presenta con los compuestos nitrogenados, es cuando el amonio se encuentra en pH básico, debido a la formación de amoniaco, ocasionado por el

equilibrio químico entre estos dos compuestos. Cabe resaltar que el amoníaco es un gas con propiedades altamente tóxicas (Halling-Sørensen and Jorgensen 1993).

Los compuestos nitrogenados inorgánicos se encuentran presentes en el ciclo del nitrógeno y desempeñan un papel muy importante para el adecuado desarrollo de todas las formas de vida, razón por la cual se deben mantener en concentraciones adecuadas, para evitar sufrir desequilibrios.

2.2 CICLO DEL NITROGENO

Aun cuando el nitrógeno molecular (N_2) es uno de los elementos más abundantes en la atmósfera, ningún eucariote es capaz de usarlo directamente. Sólo unos cuantos géneros de bacterias simbióticas (*Rhizobium*, *Azotobacter*, etc.) y no simbióticas (por ejemplo, *Klebsiella*) pueden convertir el gas nitrógeno en amonio, por un proceso llamado fijación del nitrógeno. Este amonio puede ser usado por los heterótrofos para la síntesis de aminoácidos (bloques constructores de las proteínas), o por algunos microorganismos que lo oxidan hasta nitrato (NO_3^-) para obtener energía (nitrificación).

Otros dos procesos importantes en el ciclo del nitrógeno son la amonificación, que es la producción de amonio como consecuencia de la biodegradación de la materia orgánica, y la desnitrificación, donde el nitrógeno de los nitratos es convertido en nitrógeno molecular, que regresa a la atmósfera. Las etapas del ciclo de nitrógeno están esquematizadas en la Figura 2 (Garrido, 1995).

Para no afectar el ciclo del nitrógeno en corrientes acuáticas con aguas residuales conteniendo altas cargas de compuestos nitrogenados, es necesario someterlas a un tratamiento previo.

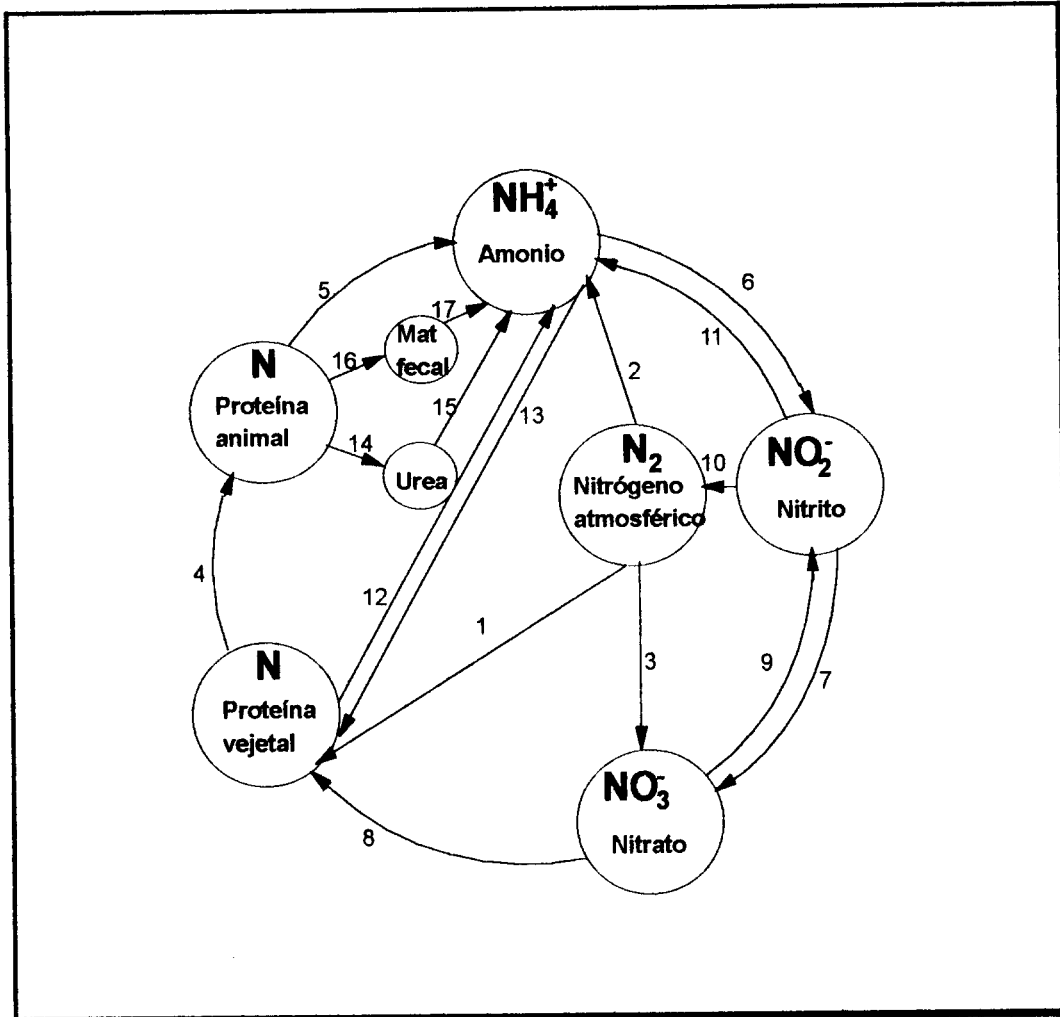


Figura 2. Representación del ciclo de nitrógeno. 1. Fijación biológica (bacterias o algas), 2. Fijación química, 3. Fijación, 4. Alimentación animal, 5. Muerte o descomposición biológica, amonificación, 6. Nitrificación, 7. Nitrificación, 8. Asimilación, 9. Desnitrificación, 10. Desnitrificación, 11. Reducción biológica (reducción asimilación y desasimilación), 12. Muerte o descomposición biológica, amonificación, 13. Asimilación, 14. Excreción (orina). 15. Hidrólisis de urea, 16. Defecación; 17. descomposición biológica, amonificación

2.3 DEPURACION DE NITROGENO

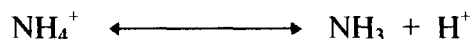
Dentro de los tratamientos para aguas residuales existe una gama de posibilidades se encuentran los fisicoquímicos y los biológicos, ambos empleados actualmente, dependiendo de los requerimientos de calidad del agua tratada, concentración de los compuestos nitrogenados y rentabilidad del proceso, entre otras. Cabe destacar, que aún cuando se tienen diversas alternativas para la depuración de compuestos nitrogenados en aguas residuales, cada una de ellas presentando limitaciones para su aplicación que pueden ser importantes. físicas y químicas para remover compuestos nitrogenados, entre las que se encuentra la desorción, intercambio iónico, oxidación química y membranas semipermeables, pero en algunos de los casos se caracterizar por transferir los compuestos contaminantes de un medio a otro, dependiendo de cada uno de ellos, y en otros casos los insumos que requieren son de gran valor agregado, lo cual los hace incosteables.

2.3.1 Tratamiento Fisicoquímico

Desorción

Este proceso de transferencia de masa se emplea para extraer gases volátiles disueltos en algún líquido y así trasladarlos a una corriente gaseosa. El proceso se lleva a cabo en una torre de desorción, en la cual se hace circular a contraflujo una corriente de gas contra una de líquido, en este caso el gas puede ser aire y el líquido corresponde al agua residual conteniendo amoníaco disuelto. La velocidad del proceso dependerá del pH, y la

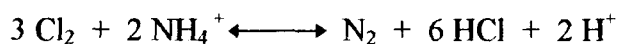
temperatura. Este proceso se basa en el equilibrio químico del ion amonio con el gas amoníaco.



La constante de equilibrio de esta ecuación es de $10^{-9.25}$ a 18 °C, a un pH de 11.25 el 100% del nitrógeno amoniacal está en forma de amoníaco, que puede ser fácilmente transferido a una corriente gaseosa. Al proceso de arrastre se le conoce, en inglés, con el nombre de “striping” (van Steenber *et al.* 1992; Halling-Sørensen y Jorgensen, 1993) . Debido a la toxicidad del amoníaco, este proceso es empleado solo para desorber bajas concentraciones de amonio del agua.

Oxidación Química.

Este es un proceso que se basa fundamentalmente en la reacción de óxido reducción del nitrógeno amoniacal, en presencia de cloro, obteniendo nitrógeno molecular y cloruro de hidrógeno (van Steenber *et al.*, 1992). La reacción química se presenta con la siguiente estequiometría.



Este tipo de tratamiento presenta la desventaja de requerir un postratamiento del efluente para neutralizarlo. Además, este método es de aplicación limitada al tratamiento de

aguas contaminadas con amonio, ya que no puede remover nitrito o nitrato en las aguas residuales, lo que implica el uso constante de productos químicos, provocando que los costos de operación sean elevados.

Intercambio Ionico.

Los intercambiadores ionicos son una alternativa para el tratamiento de aguas nitrogenadas. Permiten adsorber iones del agua residual, sobre un sólido (Langevin *et al*, 1984). Existen intercambiadores ionicos sintéticos y naturales, siendo ambos útiles para la adsorción del amonio, nitrato y nitrito. Sin embargo, este proceso está limitado al tratamiento de aguas con bajas cargas ionicas, de lo contrario, la velocidad de regeneración debe ser muy elevada y aumentando los costos de operación. Otra limitación que presenta el proceso es que el agua debe ser sometida a un pretratamiento, para evitar la entrada de materia suspendida, lo que podría disminuir la eficiencia del intercambiador. La presencia de otros iones como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} en altas concentraciones abaten igualmente la eficiencia del intercambiador..

Membranas Semipermeables.

La depuración de compuestos nitrogenados también se puede lograr mediante el empleo de membranas semipermeables de osmosis inversa, electrodiálisis o ultrafiltración (Langevin *et al*, 1984). Mediante este método se pueden depurar amonio, o nitrato. Sin embargo, la aplicación de esta técnica es limitada a aguas con bajas concentraciones de

compuestos nitrogenados y libre de materia suspendida, es muy costosa y la eficiencia es solo del 40 al 80 % , es poco eficiente para eliminar altas concentraciones.

Floculación

Esta técnica se lleva a cabo mediante la adición de compuestos químicos, que puedan provocar la formación de flóculos, en los cuales quedan embebidos los compuestos nitrogenados y posteriormente se lleva a cabo la separación de fases mediante precipitación. El costo de operación es generalmente elevado y proporcional con la concentración de compuestos nitrogenados disueltos (Garrido, 1995).

2.3.2 Tratamiento Biológico.

El tratamiento biológico es una alternativa diferente a la fisicoquímica, en la cual se emplean a los microorganismos que intervienen en el ciclo del nitrógeno para la depuración de nitrógeno amoniacal hasta nitrógeno molecular. El tratamiento se lleva a cabo en dos etapas, la primera de ellas es la nitrificación , éste es un proceso aerobio, y la última, la desnitrificación, que se realiza en condiciones anóxicas. En la Figura 3 se muestra la representación esquemática de estos procesos. Ambas etapas se llevan a cabo por consorcios bacterianos diferentes.

La nitrificación consiste en la oxidación del nitrógeno amoniacal hasta nitrato (Tanaka *et al*, 1981; Halling-Sørensen y Jorgensen, 1993), en tanto que la desnitrificación consiste en la transformación del nitrato hasta nitrógeno molecular (Andreadakis, 1993). Una vía alterna a la desnitrificación es la desasimilación reductiva (amonificación), que es la transformación

del nitrito hasta amonio, esta vía es indeseable en el proceso de tratamiento de agua. La desnitrificación tiene como productos intermediarios al NO y N₂O. En cuanto a la depuración de nitrógeno por vía biológica, cabe mencionar que la nitrificación, es la que controla el proceso, debido a las bajas tasas de crecimiento específico y velocidades respiratorias de los microorganismos involucrados. Representando así un factor limitante para llevar a cabo los dos procesos de forma coordinada. Sin embargo se podrían superar estas limitaciones inherentes a la nitrificación, utilizando factores coadyuvantes de la nitrificación, o bien, estableciendo las condiciones hidrodinámicas adecuadas para su desempeño.

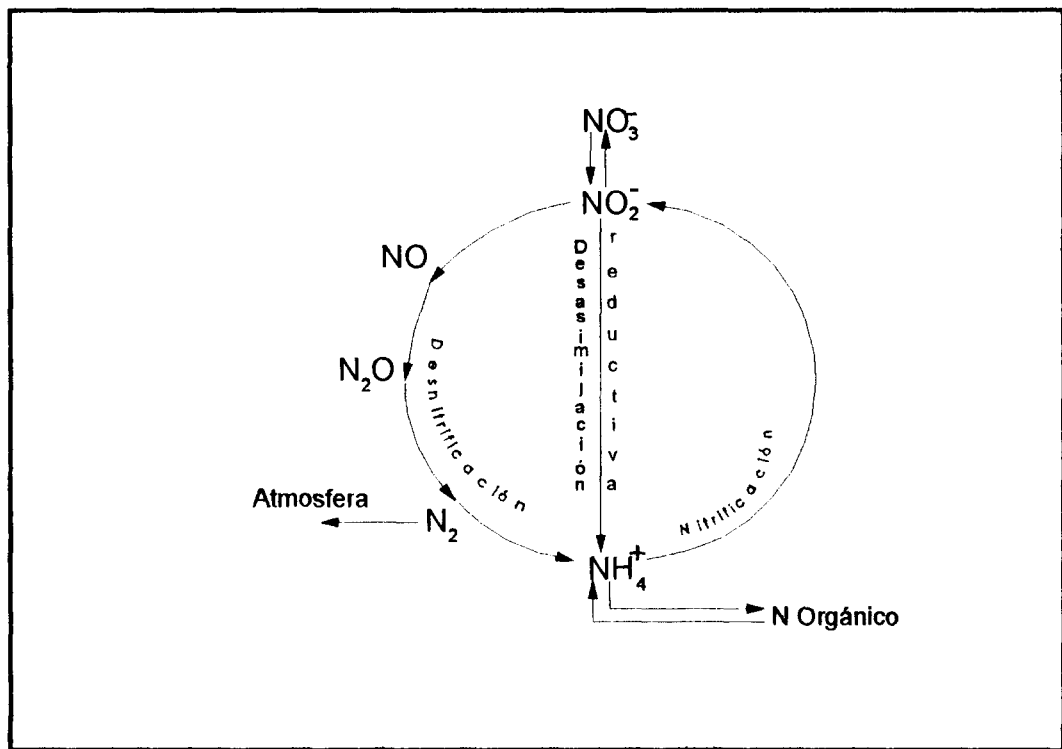
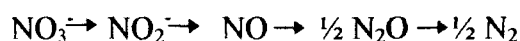


Figura 3. Eliminación del nitrógeno. La nitrificación es un proceso litoautotrófico aireado, y la desnitrificación es un proceso heterotrófico anóxico

2.3.2.1 Desnitrificación.

La desnitrificación es un proceso muy importante, siendo el mecanismo principal que balancea el ciclo global del nitrógeno. Algunos de los géneros desnitrificantes son *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Thiobacillus*, *Alcaligenes* y *Bacillus*. Estas bacterias son tanto, bioquímicamente, como taxonómicamente diversas. Entre los géneros más comunes están *Pseudomonas* y *Alcaligenes*.

La desnitrificación es un proceso respiratorio donde la reducción del óxido de nitrógeno está acoplada a la fosforilación oxidativa. Involucra varias reacciones, cada una de ellas catalizada por una enzima diferente:



En la primer etapa el nitrato es reducido por la enzima nitrato reductasa hasta nitrito, en la segunda etapa este es reducido a óxido nítrico por la nitrito reductasa, el que se reduce a óxido nitroso, por la óxido nítrico reductasa y finalmente, el óxido nitroso se reduce a nitrógeno molecular por la óxido nitroso reductasa.

Para que se pueda llevar a cabo la desnitrificación es necesario tener una fuente orgánica de electrones, que puede ser diferente dependiendo del caso. Entre las fuentes de electrones más comunes se encuentran los ácidos grasos volátiles, metanol, alanina, ácido succínico, etanol y lactato. La mayoría de los estudios de este proceso, utilizan metanol como fuente de electrones. Existen otros compuestos que pueden ser donadores de

electrones, pero podrían reducir el nitrato a amoníaco, vía que no es deseada, ya que se regresaría al punto de partida a amoníaco. Entre este tipo de fuente se pueden mencionar a la glucosa y glicerol (Akunna *et al*, 1994).

De numerosos estudios se ha encontrado que el pH tiene un efecto notable en el proceso de la desnitrificación, debido a la competencia que se genera para reducir el nitrato. El nitrato y el nitrito posiblemente compiten entre sí por la oxidación de los mismos donadores de electrones. Además se ha encontrado que la temperatura más adecuada para la desnitrificación es de 35°C (Akunna *et al*, 1994, Fass *et al*, 1994).

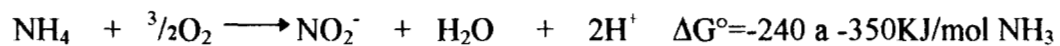
Otro de los factores que pueden afectar la desnitrificación es la concentración de oxígeno disuelto, pensándose que existe una represión de la síntesis de las enzimas de la desnitrificación o en la inhibición de las enzimas, debido probablemente a una competencia por electrones entre la nitrito reductasa con el oxígeno (Fass *et al*, 1994).

Muchas bacterias que reducen nitrato muestran desnitrificación y reducción asimilativa. Desde un punto de vista práctico, es mejor producir gas nitrógeno que producir nitrógeno orgánico ligado a biomasa, para no tener una elevada producción de lodo.

Se han trabajado numerosas relaciones C/N en la desnitrificación y los resultados han tenido cierta variación en cuanto a la tasa de desnitrificación y acumulación de intermediarios como el nitrito. Esto podría deberse a la gran variación de condiciones de cultivo usadas, así como a las características inherentes a cada consorcio microbiano del lodo desnitrificante utilizado (Mâteju *et al*. 1992).

2.3.2.2 Nitrificación.

La nitrificación es un proceso de gran importancia, llevado a cabo por la familia bacteriana *Nitrobacteraceae* (Watson *et al.*, 1989). Consiste en la oxidación biológica del nitrógeno amoniacal hasta nitrógeno de nitrato, en dos etapas. La primera de ellas es la amonio oxidación, en tanto que la segunda etapa se conoce como la nitrito oxidación. Ambas etapas la estequiometría de ambas etapas es la siguiente:



La familia de las *Nitrobacteraceae* se divide en dos grupos, las amonio oxidantes y las nitrito oxidantes. Entre sus principales características está la baja velocidad de crecimiento y la tendencia natural a formar flóculos mediante la excreción extracelular de materiales exopoliméricos (Freitas y Livingston, 1995). Esta familia se conoce como el grupo nitrificante principal, aunque existen organismos heterotróficos que también nitrificante, tal es el caso de las bacterias metanótrofas y algunos hongos.

Los microorganismos nitrificantes son quimiolitotrofos, de respiración aerobia, estricta, es decir que obtienen la energía para el crecimiento de la oxidación de compuestos químicos inorgánicos (Watson *et al.*, 1989). Otra característica es que son autotróficos, esto es, que el grupo utiliza al CO₂ como fuente de C, fijándolo por la vía reductiva de

Benson Calvin o ciclo de las pentosas (Bock *et al*, 1991). Hasta ahora se han identificado al grupo de las bacterias nitrificantes como Gram negativas.

2.3.2.2.1 Bacterias amonio Oxidantes

Se conocen cinco géneros de bacterias amonio oxidantes *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, y *Nitrosovibrio* (Watson *et al*, 1989). Estos géneros son los responsables de la oxidación del amonio a nitrito. Entre los factores que afectan el crecimiento y la actividad de las bacterias amonio oxidantes se pueden mencionar al pH, concentración de NO_2^- , temperatura e incluso la intensidad de luz, (Bock *et al*, 1991). Se ha encontrado (Antoniou *et al*, 1990) que el intervalo mas adecuado de pH al cual crecen las bacterias amonio oxidantes es de 7.5 a 8. En el caso de la temperatura se ha encontrado que dentro de la región de 25 a 30°C se puede observar el mejor crecimiento.

Cabe destacar que el grupo de las bacterias amonio oxidantes, son autótrofas obligadas, pero algunos géneros, como *Nitrosomonas* presentan cierta tolerancia a la materia orgánica. En general este grupo es sensible a la presencia de materia orgánica (Eilersen *et al*, 1994).

2.3.2.2.2 Bacterias nitrito oxidantes.

Las bacterias nitrito oxidantes son las responsables de llevar a cabo la etapa final de la nitrificación. Los géneros más estudiados son, *Nitrosospira* y *Nitrospira* y *Nitrobacter*. A diferencia de la amonio oxidantes, las nitrito oxidantes, en general, son más tolerantes a la

presencia de la materia orgánica (Watson, *et al*, 1989), e incluso pueden presentar mixotrofia. En el género de la *Nitrobacter*, se ha observado crecimiento en ambientes heterotróficos, pero el crecimiento es más lento que en condiciones autótroficas. Se reporta que la fase de retardo es prolongada en condiciones heterotróficas (Bock *et al*, 1991). Este fenómeno se asocia al tiempo necesario para la asimilación de nuevas fuentes de carbono, y se indica que puede ser irreversible el cambio de metabolismo, litóautotrófico a organotrófico.

Se han estudiado las condiciones mesofílicas de temperatura y pH más favorable para la nitrato oxidación. Los intervalos más adecuados para este proceso son de 28 a 30°C y con un pH de 7.6 a 7.8.

2.3.2.2.3 Bioquímica del proceso nitrificante.

A nivel bioquímico la nitrificación es más complicada que la simple oxidación de amonio a nitrato, estando implicadas en este proceso varias enzimas y productos intermediarios.

Las bacterias litoautotróficas responsables de la oxidación biológica del amonio, obtienen su energía a partir del amoníaco. Se estima que cerca del 80% de la energía generada es utilizada en el proceso de fijación del carbono, lo cual podría explicar porque el crecimiento es tan lento.

La oxidación del amonio comienza por la transformación a hidroxilamina (NH₂OH), utilizando oxígeno disuelto, mediante la enzima monooxigenasa (Suzuki *et al*, 1974).



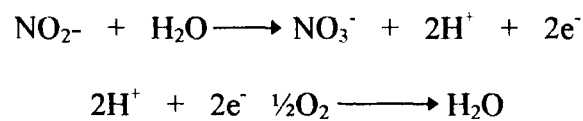
se sabe que esta enzima se localiza en la membrana, en *N. europaea*. Esta reacción es termodinámicamente endergónica. La enzima monooxigenasa, se ha encontrado también en otras bacterias, como las metanótrofas, razón por la cual estas bacterias pueden oxidar el amoníaco, pero utilizan otras fuentes alternas de energía. La monooxigenasa presenta cierta afinidad por el metano, y por el amoníaco, e incluso durante la nitrificación en presencia de ambos sustratos se suele presentar inhibición competitiva (Gómez 1994).

Después de la obtención de la hidroxilamina, ésta es oxidada utilizando el oxígeno del agua, mediante el complejo hidroxilamina oxidoreductasa para obtener NO_2^- .



La formación de hidroxilamina es un proceso endergónico, en el cual está involucrada la transferencia de cuatro electrones, pero dos de ellos son requeridos por la amonio- monooxigenasa en la producción de hidroxilamina. En consecuencia en el proceso global de la amonio oxidación quedan dos electrones libres disponibles para la obtención de energía mediante la cadena respiratoria. Se ha observado que no es posible utilizar a la hidroxilamina como fuente de energía, en lugar del amoníaco (Prosser 1989, Bock *et al*, 1991).

Después de la amonio oxidación se lleva a cabo la nitrito oxidación, mediante el grupo de bacterias nitrito oxidantes a través del complejo nitrito oxido reductasa. Entre los componentes que se han detectado de este complejo se encuentran los citocromos *c* y *a*₁, la quinina y una deshidrogenasa. Cabe mencionar que los citocromos *a* y *c* no se encuentran siempre en las bacterias nitrito oxidantes. La oxidación del nitrito se realiza a partir del oxígeno del agua.



Se ha estimado que durante la nitrito oxidación se utiliza cerca del 10% de la energía libre de Gibbs para el crecimiento celular. Esta podría ser la razón por la que este tipo de microorganismos presentan una baja tasa de crecimiento.

Cabe destacar que los géneros más estudiados son *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Una gran parte de los resultados obtenidos a partir de ambos géneros se han generalizado a las bacterias amonio oxidantes y nitrito oxidantes.

Cabe señalar, que las limitaciones para llevar a cabo la nitrificación son principalmente debido a que la microflora nitrificante es inhibida por amonio, pH, temperatura, materia orgánica y bajas tensiones de oxígeno disuelto. (Hanaki *et al*, 1990 Eilersen *et al*, 1994, Antonisen *et al*, 1976).. Sin embargo para la eliminación de compuestos nitrogenados es necesario garantizar el adecuado funcionamiento de la etapa

nitrificante. La solución podría surgir de un estudio más detallado de la fisiología del sistema, aunado al empleo de sistemas de cultivo idóneos.

2.4 TIPOS DE REACTORES NITRIFICANTES.

Se ha buscado el acoplamiento de reactores nitrificante y desnitrificantes en serie (Argaman y Miller, 1979) pero, ha sido muy difícil para influentes con altas concentraciones, debido a que el segundo asimila preferentemente sustratos orgánicos, y el primero sustratos inorgánicos. Las condiciones de entrada y salida de cada uno de los reactores debe ser perfectamente controlada para lograr una mejor eficiencia del proceso. Además, cabe subrayar, que la velocidad de nitrificación es aproximadamente la mitad de la velocidad de desnitrificación. Para acoplar estos dos procesos en forma eficiente, se han planteado principalmente dos alternativas (Bishop y Kinner 1984). Una de ellas consiste en utilizar reactores con biomasa suspendida y aumentar la velocidad de sedimentación de la microflora nitrificante. Sin embargo, todavía no se han tenido avances destacados en esta línea. La otra alternativa es concentrar una gran cantidad de biomasa nitrificante en poco espacio, mediante el empleo de biopelículas (Tanaka *et al*, 1982). Para este fin se han desarrollado diferentes tipos de reactores (Bishop y Kinner 1984), entre los que se pueden mencionar el filtro percolador (reactor de película descendente), el reactor de discos rotatorios, el filtro sumergido y el reactor de lecho fluidificado. Cada uno de estos sistemas tiene características particulares.

2.4.1 Reactor de Tanque Agitado.

Este tipo de reactor se usa tradicionalmente en nitrificación. Su funcionamiento está basado en la capacidad de la microflora nitrificante de asociarse en flóculos lo que le permite sedimentar, siempre que este acoplado un sedimentador con el reactor. Sin embargo, los índices de sedimentabilidad de las bacterias nitrificantes no son aún altos. Esto implica condiciones de operación con tiempos de residencia hidráulica prolongados (entre 4 y 7 días), para evitar que el efluente arrastre a los microorganismos. Este fenómeno es conocido como lavado del reactor.

Una de las alternativas estudiadas para operar un reactor de tanque agitado con grandes caudales del influente y bajos tiempos de residencia hidráulica, sin ocasionar lavado del reactor, es aumentar la densidad del flóculo y propiciar su estabilidad. Sin embargo, este problema no es trivial, ya que intervienen en la floculación del lodo factores bioquímicos y fisicoquímicos del cultivo, así como elementos de carácter hidrodinámico del reactor.

A nivel bioquímico, todo parece indicar que la estructura y compactación del flóculo esta determinada principalmente por los componentes exopoliméricos extracelulares (lípidos, proteínas, carbohidratos, principalmente) del agregado, pero aún no se determina con precisión cuales de estos componentes exopoliméricos son los responsables de la estabilidad y sedimentabilidad del flóculo (Novak *et al*, 1993). Cabe señalar que cuando se pierden la compactación o densidad del flóculo suele presentarse el fenómeno de esponjamiento (“bulking”, en inglés), el cual consiste en la disgregación del flóculo con la subsecuente pérdida de biomasa por lavado del reactor.

Respecto a la influencia que tienen las condiciones de agitación en la compactación del flóculo, se pueden distinguir dos factores fundamentales. El primero son los esfuerzos de corte producidos por la transferencia de momentum en la agitación, los cuales bajo determinadas condiciones hidrodinámicas pueden inducir la compactación del flóculo conocida como sinéresis, pero en contraste, bajo fuertes condiciones de fricción pueden desfavorecer la estructura flocular. El segundo factor inherente a la agitación es la frecuencia de colisión entre las bacterias y/o flóculos, la cual influirá en la estructura y volumen del agregado. La frecuencia de colisión podría ser calculada utilizando la teoría de colisiones (teoría de Smoluchowski) bajo movimiento Browniano en regímenes laminar y turbulento. Cabe señalar que la estructura del flóculo se puede estudiar mediante estructuras fractales bajo los límites difusivo o reactivo.

Pese a las visibles desventajas que presentan los reactores de tanque agitado, también presentan características atractivas para su uso. La actividad específica es alta en comparación con los reactores que emplean biopelículas (Tabla 1); también presentan buenas características de transferencia de masa y pueden tratar caudales con altas cargas de nitrógeno amoniacal.

En la Figura 4 se presenta un esquema del sistema en el que se está acoplado a un sedimentador con dos salidas, una para el recirculación de biomasa con agua y la otra para la salida del efluente. Existen diferentes diseños que funcionan bajo el mismo principio, como el tipo Husmann o el reactor tipo quimiostato modificado (Rudlings y Solyom, 1973).

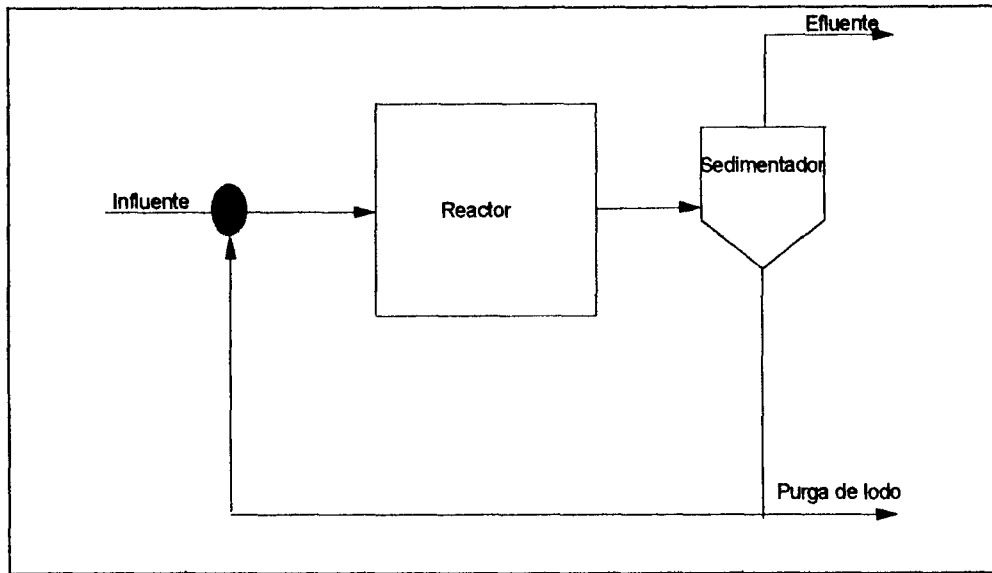


Figura 4. Esquema del reactor de tanque agitado, acoplado a un sedimentador con recirculación.

Para manejar grandes caudales de aguas residuales se han ideado sistemas que emplean biopelículas, las cuales pueden estar adheridas sobre diversos materiales naturales o sintéticos. La inmovilización de microorganismos puede lograrse mediante métodos artificiales o empleando técnicas naturales. La primera consiste en la formación de una matriz de material sintético, en la cual quedan embebidas las bacterias. Por otro lado, la inmovilización natural consiste en permitir las interacciones de carácter electrostático o fisicoquímico entre las bacterias y la superficie del soporte. Posteriormente a esta atracción comienza la colonización del soporte, fortalecida por la excreción bacteriana de materiales exopoliméricos (Bryers y Characklis, 1982).

Tabla 1. Comparación de los reactores nitrificantes

Proceso	Superficie específica [m ² /m ³]	Concentración g SSV/l	Velocidad de nitrificación [Kg N (m ³ *d)]	Velocidad de nitrificación [Kg N/ (g SSV *d)]	Limitaciones operacionales
Lodo activado	-	3-5	0.2-7	66-1400	Bajas conc microbianas
Filtro percolador	300	20	0.8	40	Superficie específica baja
Filtro sumergido	500	20	1.5	75	Superficie específica baja
Discos Biológicos	200	20	0.8	40	Superficie específica baja
Lecho fluidificado	2000-3000	20	9.6	480	Problemas hidráulicos

(Méndez *et al.*, 1996)

En la nitrificación, generalmente uno de los principales problemas suele ser la transferencia de oxígeno en la interfase biopelícula-agua. El flux másico del oxígeno está asociado con la superficie específica del soporte, por lo que es necesario contar con una gran área específica para asegurar una máxima transferencia de oxígeno. Cabe destacar que en sistemas con biopelículas la concentración microbiana suele estar comprendida entre 20 y 30 gSSV/l, sin embargo la diferencia en la velocidad de nitrificación está más asociada al área específica de cada uno de sistemas, que a la misma concentración microbiana (Méndez *et al.*, 1996).

2.4.2 Filtro Percolador

Entre los sistemas que utilizan las biopelículas se encuentra el filtro percolador o biofiltro (Figura 5), sistema que se emplea desde fines del siglo XIX. En la actualidad es uno de los sistemas más usados para el tratamiento de aguas residuales por su simplicidad de manejo (Bishop y Kinner 1986).

Este sistema consiste de un lecho que puede ser de materiales granulares sintéticos o naturales, en el que se adhiere la biomasa formando biopelículas y a través de este lecho fluye agua. El área activa se indica en la Tabla 1. Los filtros percoladores primitivos empleaban soporte natural de piedras con baja superficie específica de 40 a 70 m²/m³, siendo principalmente utilizados para la eliminación de materia orgánica de agua residual urbana. Posteriormente fueron empleados soportes plásticos con mayor superficie específica de hasta 300 m²/m³ (Bishop y Kinner 1986). La velocidad de nitrificación esta limitada normalmente por la transferencia de oxígeno, por otro lado, se ha buscado la forma de aumentar la eficiencia de este tipo de reactor, aumentando el área superficial activa mediante la disminución del tamaño del soporte, pero no se ha tenido aún éxito, ya que esto propicia la formación de zonas anóxicas, o bien, da lugar a la pronta saturación de los espacios intersticiales provocando una disminución en la eficiencia del reactor. Entre los problemas más frecuentes que surgen durante la operación de este tipo de reactores, está la disminución del área efectiva y taponamiento, causado principalmente por la presencia de material insoluble suspendido en el agua residual. Además, frecuentemente se presenta inhibición de la nitrificación debido a la presencia de materia orgánica (Andersson *et al*, 1994).

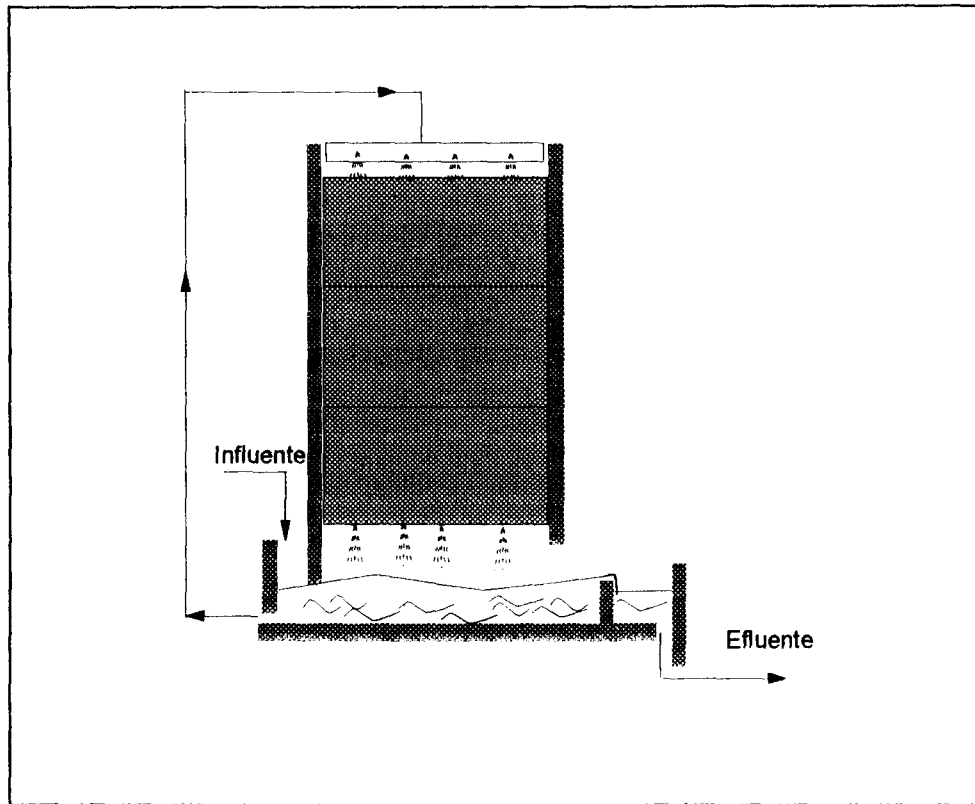


Figura 5. Esquema de un filtro percolador con alimentación y salida en la parte inferior y con recirculación.

2.4.3 Filtro Sumergido.

Otro de los reactores que tiene como principio la utilización de biopelícula, es el filtro sumergido o filtro biológico aireado (Figura 6). Este modelo es una modificación de filtro percolador (Méndez-Pampín *et al*, 1996), pero la diferencia básica con este, es que el soporte se encuentra totalmente inmerso en líquido. Al reactor se le puede dar mantenimiento mediante un retrolavado con una corriente de aire y agua, a contraflujo, que servirá para lavado. En la parte superior se localiza la purga de lodos, y es también por

donde se suministra el influente. Como soportes se pueden emplear materiales naturales o sintéticos. Cuando el soporte ocupa una altura de 2 a 3 m, con un diámetro de partícula de 5 mm la superficie específica puede ser de 300 a 500 m^2/m^3 (Capdeville, 1992).

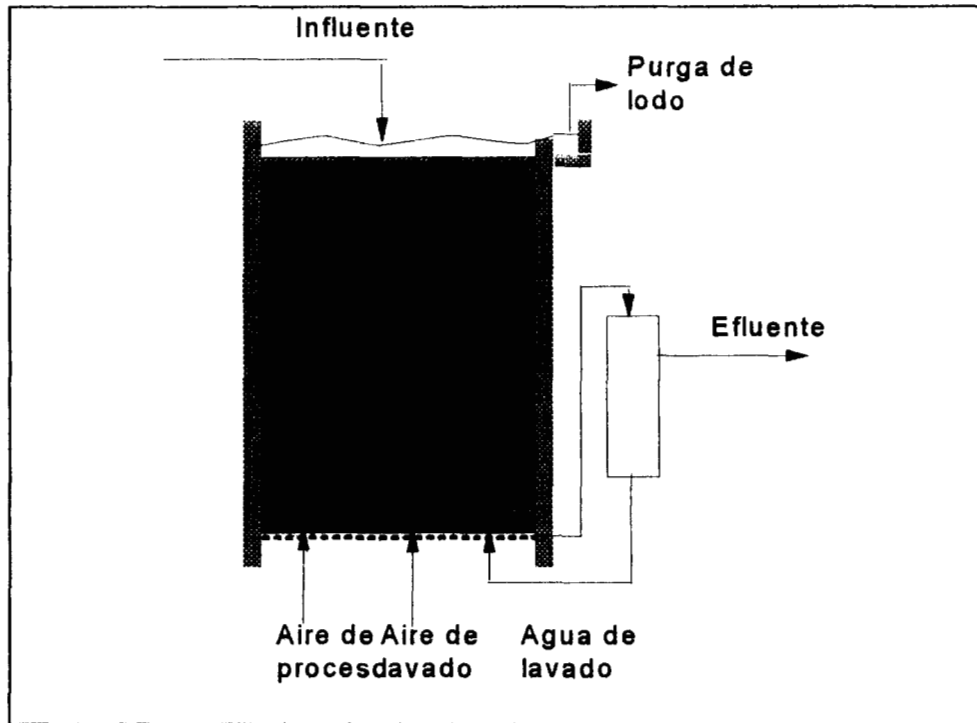


Figura 6. reactor de filtro sumergido

La depuración de amonio en estas unidades depende de la buena distribución del aire. Uno de los principales inconvenientes encontrados también en este sistema es la insuficiente transferencia de oxígeno, como consecuencia la velocidad de nitrificación se abate. La velocidad de nitrificación para este sistema puede ser hasta de $1.5 \text{ kg N}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$. En este tipo de reactores el tiempo de residencia hidráulica es superior a 1 día (Andreadakis *et al*, 1993). En reactores de filtro sumergido una de las limitaciones visibles del sistema es que

se debe someter a mantenimiento constante para evitar taponamiento de los intersticios debido al crecimiento de biomasa.

2.4.4 Discos Biológicos Rotatorios.

Otro de los sistemas que se usa para el tratamiento de aguas es el reactor de discos biológicos rotatorios representado esquemáticamente en la Figura 7, que consiste de una serie de discos que rotan sobre su eje, impulsados mediante una flecha mecánica y manteniendo sumergido 40% del disco (Andreadakis *et al*, 1993; Bishop y Kinner 1986). La velocidad angular a la que rotan los discos suele ser entre 1 y 3 r.p.m, lo que implica bajos costos de operación. En cuanto al tiempo de residencia hidráulica suele ser de varias horas, e incluso días. El área específica que tiene este tipo de reactor es baja, comparado con otros sistemas de biopelícula (Tabla 1), siendo sólo $200 \text{ m}^2/\text{m}^3$. Para mejorar la eficiencia del reactor se ha ideado aumentar la rugosidad de los discos y así elevar la superficie disponible para la fijación de la biomasa, alcanzando hasta 20 g SSV/l. Este método ha resultado ser eficiente en las primeras etapas de la formación de la biopelícula, pero la rugosidad se va perdiendo a medida que aumenta el grosor de la biopelícula, y por lo tanto la eficiencia. La velocidad específica de nitrificación en los reactores de discos rotatorios reportada llega a $0.8 \text{ KgN}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$. Para aumentar el rendimiento del reactor se suele cambiar de dirección la rotación de los discos. La puesta en marcha del reactor es de una a cuatro semanas. Los problemas más frecuentes de este tipo de reactores son de carácter mecánico, debido a la gran fuerza que se tiene que impartir a la flecha para hacer rotar los

discos. Además presenta problemas de taponamiento en el espacio interdiscal de los discos. Sin embargo por su simplicidad de manejo, son actualmente muy empleados en la industria.

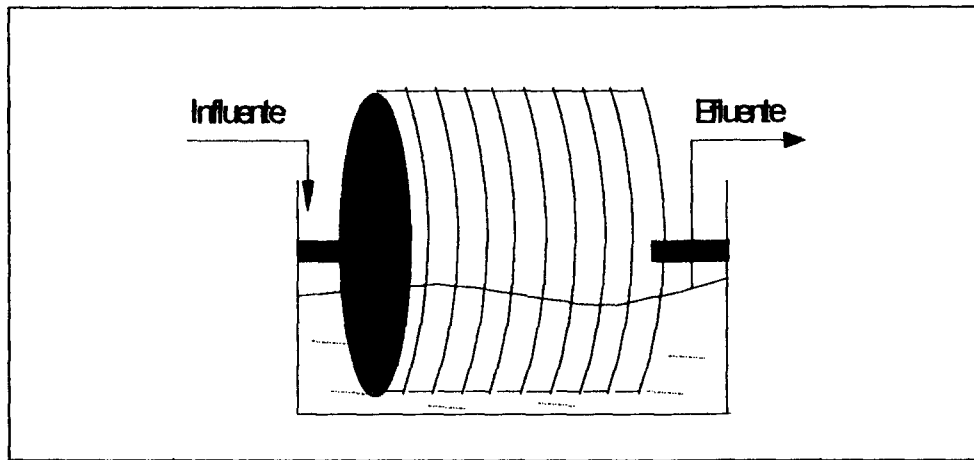


Figura 7. Reactor de discos biológicos rotatorios.

Tanto los sistemas de biofiltros, como los sistemas de biodiscos tienen una superficie específica que no excede de $300 \text{ m}^2/\text{m}^3$ (Tabla 1), lo cual limita la capacidad global de oxidación del amoníaco, pero en general, son sistemas fáciles de operar.

En términos generales, no es fácil aumentar mucho más el área superficial efectiva de los reactores de discos biológicos rotatorios, percoladores o del filtro sumergido, debido a las características de cada uno de ellos. Algunos de los intentos que se han realizado para tal efecto han provocado problemas operacionales que disminuye la eficiencia del reactor. Sin embargo, todos estos reactores tienen una gran cantidad de biomasa anclada, aunque toda esta biomasa no tenga actividad nitrificante debido a problemas de transferencia de masa.

2.4.5 Reactor de Lecho Fluidificado

Después de 1940 se propuso emplear a los reactores de lecho fluidificado para el tratamiento de aguas residuales, debido a que operan con gránulos de soporte muy pequeños. Es hasta 1970 que esta tecnología comienza a ser desarrollada para tal efecto (Sutton y Mishra 1990). En cuanto a los problemas de transferencia de masa que suelen presentarse, cuando se emplean biopelículas para el tratamiento de aguas residuales, pueden ser poco apreciables dada a la gran área superficial expuesta con la que cuenta este tipo de reactores.

Los biorreactores de lecho fluidificado (Figura 8) consisten en torres que contienen un soporte granular de tamaño pequeño (menor a 500 micras) que puede ser de origen natural o sintético. El agua residual pasa a través del lecho con una velocidad ascensional suficiente para provocar, además de la expansión del lecho, la misma fluidificación (Gjaltema *et al*, 1995; Lazarova *et al*, 1994).

La biopelícula se forma, comenzando por poblar los intersticios presentes en el soporte hasta llegar a formar la primer capa de bacterias. Cabe destacar que la parte inicial de este proceso, suele ser muy lenta, llegando a ser hasta varios meses (Tijhuis. *et al*, 1995a). La velocidad de formación de la biopelícula dependerá en gran medida de las condiciones fluidodinámicas del reactor. Sin embargo, entre los sistemas de biopelículas, este es el que concentra la mayor cantidad de biomasa por unidad de volumen del reactor, dado que tienen la superficie específica de hasta $3000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ (Gjaltema *et al*, 1995), de esta forma la concentración bacteriana alcanza valores de 8 a 20 g SSV/m². Lo anterior trae

como consecuencia que la productividad del reactor sea mayor que la de otros reactores de biopelícula. La velocidad volumétrica puede llegar hasta $9.6 \text{ Kg N/m}^3\cdot\text{d}$ empleando oxígeno puro (Tabla 1). El mayor inconveniente que tiene este reactor son los altos costos de operación por el constante consumo de energía para el bombeo del influente y la recirculación. Además, es frecuente que se presenten problemas de tipo hidráulico.

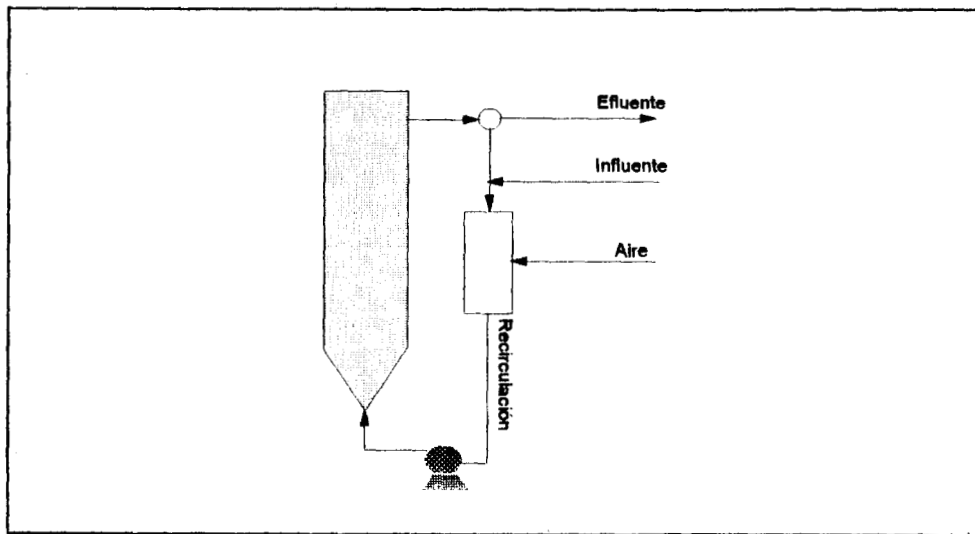


Figura 8. Reactor de lecho fluidificado con recirculación.

Los sistemas biológicos de tratamiento de aguas que emplean biopelículas, tienen características diferentes que dependen del diseño. En la Tabla 1 se resumen algunas características esenciales de los reactores de biopelícula y se contrastan con el sistema de lodos activados. Los reactores que utilizan biopelículas tienen altas concentraciones de

biomasa, en relación los reactores de biomasa suspendida, pero de todos los reactores con biopelícula el reactor de lecho fluidificado es el que tiene más superficie activa, por lo tanto podría ser el más eficiente.

Siendo la nitrificación un proceso controlado fisiológicamente y por las condiciones hidrodinámicas del sistema nitrificante, la mejoría del proceso se podría lograr mediante el estudio de la manipulación adecuada de los factores limitantes del proceso nitrificante, como podría ser la concentración de oxígeno disuelto en el líquido, así como la manipulación adecuada de las variables que determinan las características del lodo o bien en el caso del empleo de las biopelículas, las condiciones que favorezcan una rápida formación de la biopelícula, así como de los factores que pueden influir en la estabilidad o actividad biológica de la ella.

2.5 FORMACION DE BIOPELICULA

En general la adhesión de biopelículas sigue un comportamiento sigmoide, y este es el resultado del equilibrio de una serie de fenómenos de transporte y biológicos (Bryers, y Characklis, 1982; Tijhuis *et al*, 1994, Tijhuis *et al*, 1995b, Vanner y Cunningham, 1995). En la Figura 9 se muestra una representación típica de la cinética de adhesión de biopelícula sobre un soporte (Beefink and Staugaard 1986).

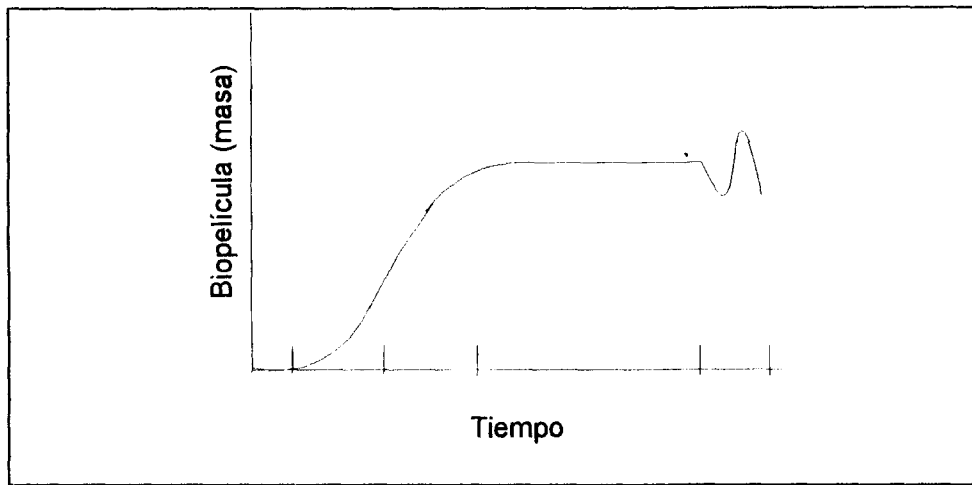


Figura 9. Cinética de formación de biopelícula en cinco etapas. Fase de retardo, crecimiento exponencial, disminución de la tasa de crecimiento, fase estacionaria y desorción.

La dinámica de formación de biopelículas sobre un soporte ocurre en varias etapas, la primera de ellas es la fase de retardo, corresponde al tiempo necesario para que los microorganismos empiecen a poblar el soporte. En esta etapa las primeras células pobladoras se aproximan al soporte mediante diferentes mecanismos de transporte de masa: convección, sedimentación o difusión. Posteriormente, actúan entre el soporte y los microorganismos, fuerzas de carácter fisicoquímicas tales como electrostáticas o de van der Waals (Rouxhet y Mozes, 1990). La segunda etapa es la de crecimiento dinámico, posiblemente asociada con la secreción de exopolímeros que permiten a los microorganismos anclarse mediante la formación de matrices poliméricas. Esto propicia el crecimiento de colonias a partir de los microorganismos inicialmente adheridos, aunado a la adhesión en aumento de los microorganismos que aún se encuentran en suspensión. La siguiente fase se caracteriza por presentar una disminución de la tasa de adhesión. En esta fase se observa un crecimiento de la biopelícula proporcional a la concentración de

microorganismos en suspensión. Posteriormente se observa un estado estacionario en la adhesión. Finalmente cuando queda completamente cubierta la superficie se presentan desequilibrios, debido principalmente a fenómenos de transferencia de materia y, entonces, es cuando empieza la desadhesión (Beefink y Staugaard, 1986; Okabe *et al*, 1996). Lo anterior podría quedar esquemáticamente representado en la Figura 10.

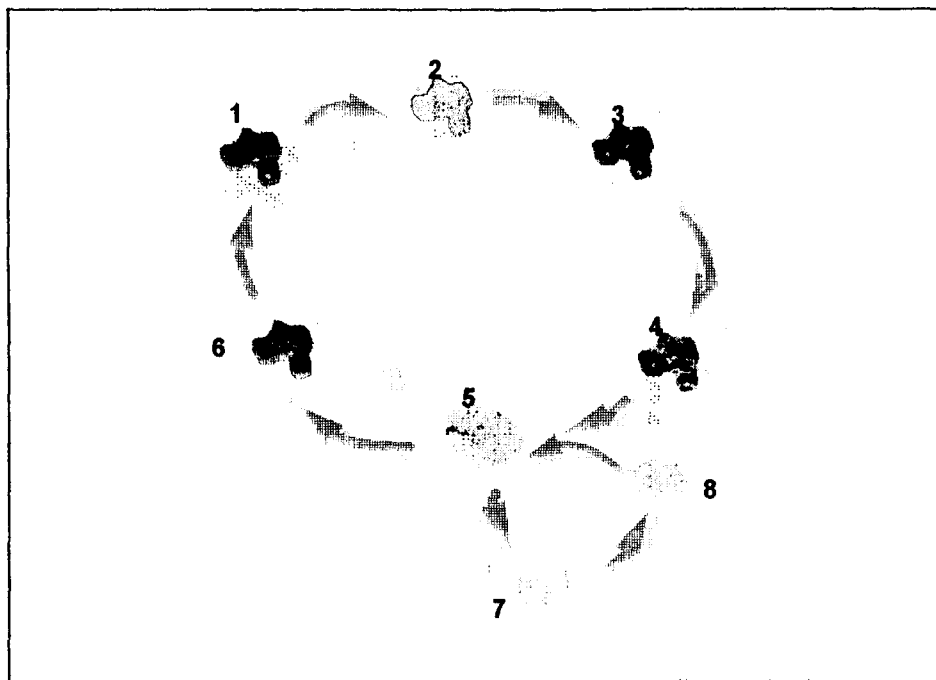


Figura 10. Dinámica de formación de biopelículas sobre un soporte granular. 1. Atracción de las bacterias al soporte. 2. Fijación de las bacterias en el soporte. 3. Colonización del soporte. 4. Excreción de exopolímeros extracelulares para asegurar el anclaje. 5. Completa colonización. 6. Expulsión del soporte liso, para nueva colonización. 7. Fragmentación de la biopelícula. 8. Nueva colonización de la biopelícula.

En general, en el desarrollo dinámico de la biopelícula, el balance de masa esta dado por

$$dB/dt = R_g + R_d - R_i$$

en donde dB/dt es el gradiente de concentración de biomasa en la biopelícula con respecto al tiempo, R_g es la tasa de crecimiento bacteriano en la biopelícula; R_d es la tasa de adhesión de bacterias en suspensión y; R_i es la tasa de desadhesión. En las primeras etapas de colonización la tasa de crecimiento bacteriano en la biopelícula es poco significativa comparativamente con la tasa de adhesión, cabe hacer notar que R_i es inversamente proporcional con la concentración de biomasa en suspensión. En las últimas etapas de la formación de la biopelícula, la tasa de desadhesión de la biopelícula se convierte en un factor poco importante, a diferencia de la tasa de crecimiento y desadhesión que en estas últimas etapas estos dos factores alcanzan sus mayores valores.

En general los términos de la ecuación de balance que pueden estar más afectados por las condiciones hidrodinámicas del reactor de lecho fluidificado, son R_d y R_i , por la cual se debe tener presente el comportamiento hidrodinámico del reactor.

2.6 FLUIDIFICACION

Existen numerosos trabajos de sistemas fluidificados, sin embargo el fenómeno de la fluidificación es complejo y más aún cuando se aplica a sistemas biológicos. Por el gran número de variables que en él intervienen, e incluso, a la modificación que pueden tener las propiedades de los fluidos, así como a la fisiología del mismo cultivo.

Davidson (1959), Kuni y Levenspiel (1969), entre otros han realizado valiosos aportes en el modelamiento de sistemas fluidificados para sistemas ideales. Sin embargo, para sistemas reales, solo se cuenta con diversas relaciones empíricas para corregir el comportamiento de estos sistemas y ajustarlos a los modelos existentes. Existen una gran

gama de relaciones empíricas que pueden ser útiles para estimar el valor de algunos parámetros necesarios en el fenómeno de la fluidificación. Cabe destacar que para sistemas complejos son escasos los aportes que se han hecho para el estudio de los principios que controlan el proceso.

El fenómeno ideal de la fluidificación consiste en suspender mediante el flujo de un fluido a una velocidad V_f a una partícula de diámetro d_p . Las fuerzas (F) que actúan sobre la partícula son la presión cinética y las fuerzas de fricción (Ecuación 1), durante la fluidificación estas fuerzas se encuentran en equilibrio.

$$F = \pi(d_p/2)^2 C_D \rho_f V_f^2/2g \quad (1)$$

donde C_D es el coeficiente de fricción, ρ_f es la densidad del fluido y g es la gravedad

De la Ecuación 1 es necesario evaluar el coeficiente de fricción, esto se puede lograr tomando en cuenta el número de Reynolds (Ecuación 2).

$$Re_p = V_{su} d_p \rho_f / \eta \quad (2)$$

Donde Re_p es el número de Reynolds de la partícula, V_{su} es la velocidad superficial de la partícula y η es la viscosidad del fluido. Teniendo presente que el número de Reynolds es una relación adimensional de las fuerzas cinéticas respecto a las fuerzas viscosas, y si se considera que la partícula es una esfera, el coeficiente de fricción C_D se puede estimar en función del número de Reynolds, mediante las relaciones obtenidas por Brown (1950). Para números de Reynolds pequeños, en donde las fuerzas viscosas predominan sobre las cinéticas, el coeficiente de fricción se puede evaluar acorde con la ecuación (3).

$$C_D = 24/Re \quad (3)$$

Para números de Reynolds grandes, las fuerzas cinéticas predominan, donde el coeficiente de fricción es un valor constante.

$$C_D = 0.43 \quad (4)$$

Se han definido algunos términos útiles para tratar de explicar el sistema ideal de fluidificación. Este se presenta cuando una sola esfera está suspendida debido a la fuerza F del flujo ascendente del fluido, la fuerza está balanceada por el peso de la esfera y por la velocidad terminal V_t , siendo V_t la velocidad a la cual cae la partícula en el fluido estático.

$$\text{FUERZAS DE ARRASTRE POR EL MOVIMIENTO ASCENDENTE DEL FLUIDO} = \text{PESO DE LAS PARTICULAS} \quad (5)$$

El peso de la partícula esta determinado por la ec. 6

$$P = 4/3 \pi (d_p/2)^3 (\rho_s - \rho_f) \quad (6)$$

En donde P es el peso de la partícula y ρ_s es la densidad del soporte

Sustituyendo las ecuaciones 1 y 6 en la ec. 5 se obtiene:

$$4/3 \pi (d_p/2)^3 (\rho_s - \rho_f) = \pi (d_p/2)^2 C_D \rho_f V_t^2 / 2g \quad (7)$$

donde V_t es la velocidad terminal de la partícula. Organizando términos queda:

$$4/3 d_p (\rho_s - \rho_f) = C_D \rho_f V_t^2 / 2g \quad (8)$$

Sustituyendo las dos diferentes expresiones de C_D de las ecuaciones 2 y 3 y organizando términos se obtiene para números de Reynolds pequeños

$$V_t = d_p^2 (\rho_s - \rho_f) g / (18\eta) \quad \text{Re}_p < 20 \quad (9)$$

en tanto que para números de Reynolds grandes se obtiene

$$V_t = \sqrt{8/3 d_p (\rho_s - \rho_f) / (0.43 \rho_g)} \quad 500 < \text{Re}_p \quad (10)$$

Es importante señalar que la velocidad terminal para regímenes con bajos números de Reynolds es una función de la viscosidad y del cuadrado del diámetro de la partícula. En contraste para grandes números de Reynolds la velocidad terminal no es función de la viscosidad, sino de la raíz cuadrada del diámetro de la partícula, lo cual implica una fuerte dependencia de las condiciones de fluidificación respecto a las condiciones fluidodinámicas.

Por otro lado cabe destacar que la velocidad mínima de fluidificación V_{mf} se da cuando la velocidad del fluido V_f alcanza la velocidad necesaria para expandir el lecho. Se ha visto que cuando la velocidad es superior a V_{mf} la porosidad de fluidificación ϵ_f está determinada por la velocidad de fluidificación, en estas relaciones también se involucra la caída de presión en el lecho Δp y la relación se representa por la ecuación (11)

$$\Delta p = \rho L_{mf} (1 - \epsilon_{mf}) (V_t / V_{mf})^m \quad (11)$$

en donde m es un exponente que se ha correlacionado mediante una función empírica del número de Reynolds terminal y la porosidad (Kwauk, 1992)

La fluidificación puede ocurrir con partículas de tamaño monodispersos o polidisperso, el caso más sencillo es llevar el seguimiento matemático para el caso de monodispersidad y se puede aplicar a sistemas reales, cuando la concentración de soporte sea muy baja, debido a que las fuerzas de fricción entre las partículas se hace despreciable.

En general, el seguimiento matemático es menos complicado cuando se toman diferentes simplificaciones respecto a la morfología, dispersidad del tamaño y concentración del soporte así como propiedades físicas entre otras. Sin embargo al tomar estas simplificaciones puede resultar un modelo alejado de la realidad, pero para salvar estas desviaciones existen correcciones empíricas que se pueden aplicar llegado el caso.

Además de aplicar las condiciones apropiadas para la fluidificación, en sistemas biológicos también es necesario tener en cuenta las características inherentes al sistema biológico, que intervienen en el metabolismo, así como los materiales de construcción entre los que se puede resaltar el soporte, del que, en general, se debe hacer una evaluación de las características fisico-químicas del soporte, para evaluar la posibilidad de utilizarlos en un lecho fluidificado y determinar la compatibilidad del soporte con los microorganismos.

Las condiciones de fluidificación son dinámicas y sin duda pueden influir en el tiempo de formación de la biopelícula. Además de estos factores existen otras condiciones que contribuyen a regular la velocidad de formación de la biopelícula. Entre los que se encuentran las probabilidad de colisiones y el esfuerzo de corte que podrían afectar también a la formación de la biopelícula. Existen algunos trabajos en los que se ha estudiado las concentraciones de soporte adecuadas para disminuir las colisiones de estas.

Asimismo parece que son de peculiar importancia el tipo de microorganismo presente, por lo que su estudio debe ser sistemático. Se han utilizados materiales como soporte que podrían no ser los más adecuados para el tipo de microflora que se desea adherir. Podría ser el caso de soportes con características fuertemente iónicas que propician interacciones tanto con los microorganismos como con el medio de cultivo, ocasionando resultados diferentes a los esperados, llevando así a una elección errónea de soporte.

Finalmente, a la fecha se ha realizado escaso trabajo de investigación sobre el efecto de las condiciones fisiológicas del cultivo en la adhesión. Por ejemplo es necesario medir y evaluar el efecto de la composición química del medio de cultivo sobre el tiempo de retardo de adhesión o bien sobre la velocidad de adhesión. Son pocos los trabajos que se han desarrollado sobre los factores nutricionales como coadyuvantes en el proceso de formación de la biopelícula, para reducir el tiempo de arranque y estabilización de un reactor. La obtención de más evidencias seguramente podría contribuir a mejorar los reactores fluidificados nitrificantes.

3. BIBLIOGRAFIA

- Akunna J.C., Bizeau C. and Moletta R. (1994). Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations ammonification, denitrification and methanogenic activities. *Environ Technol.* **15**, 41-49.
- Anderson B., Aspegren H., Parker D. S. and Lutz M. P. (1994). High rate nitrifying trickling filters. *Wat. Sci. Tech.* **29**, 47-52.
- Andreadakis A. D. (1993). Nitrification-denitrification and activated sludge settlement. *Environ. Technol.* **14**, 615-627
- Andreadakis A. D., Hatzikonstantinou G. and Christoulas D. G. (1993). Carbon removal and nitrification by rotating biological contactor. *Environ. Technol.* **14**, 479-485
- Anthonisen A. R., Loehr R. C., Prakasam T. B. S. and Srinath E. G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Poll. Con. Fed.* **48** 835-852
- Antoniou P., Hamilton J., Koopman B., Jain R. Holloway. B., Lyberatos G. and Svoronos S. A. (1990). Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Wat. Res.* **24**, 97-101.
- Argaman Y. and Miller E. (1979). Modeling recycled systems for biological nitrification and denitrification. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.* **51**. 749-754
- Beeftink H. H. and Staugaard P. (1986). Structure and dynamics of anaerobic bacteria aggregates in a gas lift reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1139-1146.
- Bishop P. L. And Kinner N. E. (1986). Aerobic fixed- film processes. En: *Biotechnology*, Vol 8,. Microbial Degradation, Schöborn Eds, VCH publisher New York USA. 116- 176

- Bock E., Koops H. P., Harms H., and Ahlers B. (1991). The biochemistry of nitrifying microorganism. En: Variations: Autotrophic Life, Academic Press London, pp 171-200.
- Brown G. G. (1950). Unit Operations, John Wiley and Sons, U. S. A., p.p.76.
- Bryers J. D., and Characklis W. G. (1982). Process governing primary biofilm formation. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 2451-2476.
- Capdeville V. J. L. (1992). Introduction to biofilm in waste water treatment. En *Biofilm Science and Technology*. L.F. Melo. Eds. NATO-ASI serie E Vol-223. p.p.13-20
- Davidson J. F. Harrison D., Darson R.C., and La Nauze, R. D. (1977) The two phase theory and its applications to Chemical Reactors, Sección 10.4, *Distribuidor desing. Chemical reactors theory: A Review*, De. Lapidus L. Y Amudson, N. R. Prentice-Hall.
- Eilersen A. M., Henze M. and Kloft L. (1994) Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge. *Wat. Res.* **28**, 1329-1336.
- Fass S., Ganaye V., Urbain V. Manem, J. and Block J.C. (1994). Volatile fatty acids as organic carbon sources in denitrification. *Environ. Technol.* **15**, 459-467.
- Freitas L. M. and Livingston A. G. (1995). Membrane attachment biofilm for VOC waste water treatment in novel *in situ* biofilm technique. *Biotech. Bioeng.*, **47**, 82-89.
- Garrido-Fernandez J. M. (1995). Nitrificación e desnitrificación de aguas residuales con concentraciones elevadas de formaldeído e urea. These de Doutoramento, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Gjaltema A., Tjihuis L., Loosdrecht M. C. M., and Heijnen J. J. (1995). Detachment of biomass from suspended nongrowing spherical biofilms in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 258-269.

222255

Gomez-Hernandez G. J.(1994). Obtención de microfloras nitrificantes:nitrificación en diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Halling-Sørensen and Jorgensen S. E. B. (1993) Nitrogen compounds as pollutants. En The removal of nitrogen compounds from wastewater. B. Halling-Sørensen y Jörgensen S. Eds. Elsevier, Netherlands. 3-25.

Halling-Sørensen and Jorgensen S. E. B. (1993) Process chemistry and biochemistry of denitrification. En The removal of nitrogen compounds from wastewater. B. Halling-Sørensen y Jörgensen S. Eds. Elsevier, Netherlands.25-50.

Hanaki K., Wantawin Ch. and Ohgaki S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**, 297-302.

Kunii D., Levenspiel O. (1969). *Fluidization Engineering*, Krieger. U. S. A. pp. 69-108

Kwauk M. (1992). *Fuidation*. Science press. Hong Kong, China. pp.1-40.

Langevin D., Matayer M., Labbe M., Handkaoui and B. Pollet. (1994). Carrier Facilitated transport and extraction through ion Exchange. En: *Membranes and membranes processes*. E: Drioli and M: Nakagaki Eds., N.Y. USA. 309-318

Lazarova V., Capdeville B. and Nikolov L. (1994). Influence of seeding conditions on nitrite accumulation in a denitrifying fluidized bed reactor. *Wat. Res.* **28**, 1189-1197.

- Máteju V., Cizinská S., Krejčí J. and Janoch T. (1992). Biological water denitrification - a review. *Enzyme Microb. Tech.* **14**, 170-183.
- Méndez-Pampín R., Sánchez M. Garrido J. M. Y Lema M. J. (1996). Evaluación de tecnologías para la eliminación biológica de nitrógeno. III congreso Ibérico de Biotecnología. Eds. Fernández Polanco García Encina, González Benito, Peña Miranda. Valladolid España. pp 39-44.
- Novák L., Larrea L., Wanner J., and Garcia-Heras, J. L. (1993). Non-filamentous activated sludge bulking in a laboratory scale system. *Wat. Res.* **27**, 1339-1346.
- Okabe S., Hiratia K., Ozawa Y. and Watanabe Y. (1996). Spatial microbial distribution biofilm. *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 25-35.
- Prosser J. Y. (1989) Autotrophic nitrification in bacteria. *Advances in microbial Physiology.* **30**, 125-181.
- Ramalho R. S. (1983). Introduction to wastewater treatment processes. 2th Ed. American Press.U.S.A.
- Rouxhet P. G. and Mozes N. (1990). Physical chemistry of the interference between attached micro-organisms and their support. *Wat Sci. Tech.* **22**, 1-6
- Sutton P. M. And Mishra P. N. (1990) Biological Fluidized bead for water and wastewater treatment: a state of the art review. *Wat. Cont. Fed. Conference.* 1-18.
- Suzuki Y., Dulart V. and Kwok S. C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cell and extracts. *J. Bacteriol.* **120**, 556-568.

- Tanaka H., Uzman S. and Dunn I. J. (1981). Kinetics of nitrification using a sand bed reactor with attachment. *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 1683-1702.
- Tanaka H., Uzman S. and Dunn I. J. (1982). Kinetics of biofilm nitrification. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 669-689.
- Tijhuis L., Huisman J. L., Loosdrecht M. C. M. and Heijnen J. J. (1994). Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 595-608.
- Tijhuis L., Huisman J. L., Loosdrecht M. C. M., and Heijnen J. J. (1995a). Formation of nitrifying biofilm on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 485-595.
- Tijhuis L., Loosdrecht M. C. M. and Heijnen J. J. (1995b). Dynamics of biofilm detachment in biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 481-487.
- van Steenber, Feyaert M., Vrients L., and Verachters H. (1992). Microbial and biotechnology aspects of the biological nutrient removal. *Jornadas sobre Biotecnología en el tratamiento de agua.* Gaiker . Bilbo.
- Vanner O. and Cunningham A. B. (1995). Modeling biofilm accumulation and mass transport in porous medium under high substrate loading. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 703-712.
- Watson S. W., BockE., Harms H., Koops H. P., and Hooper A. B. (1989). Nitrifying bacteria. *En* Stanley J. T., Brynt M. Bergey's., Pfennig N., and Holt J. G. eds. *Manual of Systematic Bacteriology Vol 3* , pp 1807-1834. ed. Williams and Wolkins, Baltimore.

Epílogo

La nitrificación en reactores de biopelícula, especialmente en los reactores de lecho fluidificado, permiten tratar grandes cargas volumétricas de agua residual. Sin embargo el tiempo para la puesta en marcha de este tipo de reactores suele ser prolongado, debido principalmente al periodo tan largo requerido de inducción para la formación de la biopelícula. Se han realizado algunos estudios sobre características hidrodinámicas y mecánicas que permiten disminuir el tiempo de formación de la biopelícula, pero el empleo de estas alternativas puede provocar la disminución de la eficiencia volumétrica de los reactores de lecho fluidificado. Además se cuenta con algunos estudios, muy escasos sobre la adición de coadyuvantes para favorecer la adhesión de la biopelícula. Una investigación detallada sobre esta última alternativa permitiría disminuir los tiempos de adhesión y una rápida puesta en marcha de los reactores de biopelícula. Además de las alternativas antes mencionadas, también es necesario indagar más sobre el tipo de soporte, el que está fuertemente involucrado con el tiempo de formación de biopelícula. Existen algunas evidencias con el basalto como soporte, además de otros soportes. Los resultados muestran que pueden ser útiles. Sin embargo, los estudios sobre el soporte no han llevado como propósito esencial evaluarlos sobre la nitrificación.

ANEXO

Artículo científico.

A continuación se presentan los resultados de investigación para determinar el efecto de la materia orgánica en la formación de una biopelícula nitrificante en un cultivo lote. Además se analiza el efecto de tres soportes en la velocidad adhesión. También se describe con detalle los materiales y métodos empleados en el estudio. De esta sección cabe destacar la técnica de análisis elemental utilizada para determinar con alta sensibilidad la dinámica de la formación de biopelícula, en las primeras etapas. De los resultados obtenidos, se puede destacar que la presencia de la materia orgánica favorece la formación de la biopelícula, presentándose a concentraciones altas de ésta un abatimiento en la formación de nitrato. Se pone en evidencia que el soporte tiene una marcada influencia sobre el tiempo de adhesión. Algunas de las conclusiones escritas en el texto sugieren que la variación en los fenómenos de adhesión es causado posiblemente por cambios en la estructura o composición del material exopolimérico, en el cual se encuentra embebido el consorcio bacteriano.

Effect of volatile fatty acids in the formation of nitrifying biofilm on three different carriers

Hernández-E. G. Gutiérrez, M.(1) Gómez J. *(1)

(1) Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Av. Michoacán y Purísima Col. Vicentina., Iztapalapa, México D.F., México. C.P. 09340

Keywords: Volatile fatty acid, wastewater, biofilm, nitrification

Abstract

The formation of nitrifying biofilms usually takes long time which can be modified by many factors. In this work attempts for decreasing the adhesion time using organic matter was made. The effect of volatile fatty acids (VFA), in batch culture, at two concentration, 200, 400 mg l⁻¹, in the formation of biofilm was evaluated on sand, basalt and volcanic stone, as carrier. VFA were an acetic, propionic and butyric acids mixture with a relation of 4:1:1. In order to follow the nitrifying process the concentration of NO₃⁻ and NH₄⁺ and VFA in the liquid phase was measured. The attachment of biofilm was evaluated by measuring the C, N and H concentration on the carrier. It was observed that the nitrate formation decreased 30% at 400 mg l⁻¹ but the attachment rate was higher. The adhesion rate on the three carriers was also different being the greater on sand (0.09 mg biomass gr⁻¹ carrier·d⁻¹). The results might be related to the changes in the exopolymers of nitrifying sludge.

Introduction

Many wastewater contain high concentrations of nitrogen compounds as ammonium salts which have to be removed. For this porpoise the rate and efficiency of nitrification must be improved (Tijhuis *et al*, 1995a, Okabe *et al*, 1996). Nitrification is the usual biological process employed as first step to remove the nitrogen compounds. The process consists in

the nitrogen oxidation of ammonia into nitrite and nitrate which is carried out by autotrophic bacteria, particularly by *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* (Watson *et al.*, 1989; Bock *et al.* 1991). The specific microbial growth rate of the nitrifying microorganisms range between 0.014 and 0.064 s⁻¹. The microbial yield is about 0.07 g biomass·g⁻¹NH₄⁺-N for ammonia oxidizers and 0.06 g biomass·g⁻¹ NO₂-N for the nitrite oxidizers (Prosser, 1989). Thus, for the wastewater treatment the volume for the reactor must be of a very large size, since as the specific rate as the yield are low. Nevertheless the reactor be very large, the nitrification load rate will be still low. However, biofilm systems are able to transform ammonia at high loads rate in a small volume, therefore they are more attractive for nitrification (Tanaka *et al.*, 1981, Beefink and Staugaard 1986).

Nitrifying bacteria produce exopolysacarides with a gel consistence. It seems that the exopolymers make possible the adhesion of microorganisms to the carrier (Freitas and Livingston 1995; Tijhuis *et al.*, 1995b). The adhesion of biofilm follows a sigmoidal profile with various distinguishable steps. Time course of any step in biofilm formation may affected by the physiological culture condition (Vaner and Cunningham, 1995; Tijhuis *et al.*, 1995a). The behavior is also affected by the thermodynamic aspects and transport phenomena (Gjaltema *et al.*, 1995). In the biofilm development carriers may be involved through adsorption of dissolved organic compounds at the wetted surface, microorganism adhesion to the surface, new biofilm production and biofilm detachment (Bryers and Characklis, 1982). As it can see, the microbial adhesion is a phenomenon dependent of many factor.

In presence of organic matter the nitrification efficiency can be decreased, however low concentration it can stimulate the microbial growth (Böck, 1976; Böck *et al.*, 1991). Likewise, when organic matter is present in the culture, changes in the aggregation way of the floc can be produced (Gomez, 1994). Competition for dissolved oxygen between nitrifying and heterotrophic microflora could be an additional problem when organic matter is present. Nitrifying microorganisms are usually overcome by the heterotrophic bacteria due

to the former have lower specific growth rates (Hanaki *et al*, 1990). Thus, competition leads to a decrease of a nitrification efficiency. Nevertheless, if care are taken controlling the organic matter concentration the microbial adhesion on its carrier could be improved. Thus, the objective of this work was to study using a nitrifying sludge the effect of the volatile fatty acids (VFA) on the adhesion time on basalt, sand and volcanic stone as carriers .

Materials and methods.

Nitrite and nitrate were measured by capillary electrophoresis (Waters Quanta 4000) using a microcapillary tube (fused silica, 60 cm of length and 75 μm of inner diameter). Samples were filtered through a 0.45 μm cellulose membrane. Electrostatic application, at 20 KV, 38 Amp and UV zinc lamp of fixed wavelength of 214 nm were the analytical conditions employed. 10 mM of sodium sulfate solution was employed as the electrolyte. At a 5% final concentration of an osmotic flow modifier CIA PAK™ OFM Anion-BT (Waters) was added. Initial and final concentration of NH_4^+ -N consumption was measured by specific ammonia electrode and compared to a standard curve prepared from ammonium chloride from 10 to 500 mg l^{-1} of NH_4^+ -N. Each sample of culture was diluted with deionized water up to 50 ml and then 0.5 ml of 10 M NaOH was added.

Volatile fatty acids were measured with a VARIAN 3400 gas chromatography equipped with a FID and 1.2 m Poropak-Q column. The temperature range of the column was from 180°C to 215 °C. The temperature rate was 27°C min^{-1} . The injector and detector were maintained at 230 and 220°C respectively. Nitrogen as carrier gas was 35 ml min^{-1} and a mixed of hydrogen/air at 20 and 200 ml min^{-1} for the ionization flame.

The medium employed was for litoautotrophic bacteria, and was added in two. The first was the source of nitrogen, (g/l): $(\text{NH})_2\text{SO}_4$, 5.89; KH_2PO_4 , 7; MgSO_4 , 3; NaCl 5; NH_4Cl , 4.78; FeSO_4 , 0.15. The second medium was the source of carbon (g/l) $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.4

and NaHCO_3 , 40.4. Both media were mixed until the concentration of N-NH_4 reached 150 mg/l and the C/N relation was 1.5. Then 0.15 g/l of FeSO_4 were added.

The size of the inoculum was measured by Lowry (1957) method using a bovine serum albumin standard curve. The nitrifying inoculum was taken from a 2 l continuous aerated reactor operating in steady state conditions at a hydraulic retention time (HRT) of 3.3 days, at pH 7.8, and stirred at 290 rpm. The temperature was kept constant at 26°C and the O_2 concentration was maintained at 70% of the saturation value. Mineral culture medium used was as above described. The same stationary conditions were maintained during 6 months in order to reach a complete stabilization of the nitrifying microflora. The nitrification rate under this condition was 2.91 g $\text{NO}_3\text{-N/g N}_{\text{prot}}\cdot\text{d}$. $\text{NH}_4^+\text{-N}$ removal was above 95% with an inlet concentration of 0.5 g $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$. Nitrite was not observed when operating under steady state conditions.

The system used were aerated flask and stirred (Gómez 1994). The culture was carried in batch (work volume 150 ml.), with a stirring speed at 150 RPM, aeration rate of 100 mlmin⁻¹ at 28°C and pH value of 7.8±0.4. Each flask was inoculated up to reach a final concentration of 0.19 g l⁻¹. At moment of inoculation the VFA were added at the concentration as mentioned in results.

The biofilm formation on carriers was measured with a Perkin Elmer 2400 CHN elemental analyzer. The temperatures of combustion and reduction of the fans were 950 and 640°C respectively. The standard employed was acetanilide. Samples (biofilm and carrier) were drawn from the flask culture and afterwards washed with an isotonic solution followed by drying 48 h at 30 °C. The carriers used were sand, basalt and volcanic stone. The average diameter of the carriers were 0.4±0.1 mm and the concentration of each carrier in the culture was 20 g/l.

Results

The effect of volatile fatty acids (VFA), at two concentration, on the nitrification was studied. At 150 h of culture the nitrate formed, in presence of 200 or 400 mg l⁻¹ of VFA in batch culture, are showed in Figure 1. The nitrate produced at 200 mg l⁻¹ of VFA was similar to control (0 mg l⁻¹), whereas at 400 mg l⁻¹ it there was a decreasing close to 30%.

When no carriers were used, there was no important differences between the nitrifying loading rate of the control respect to 200 mg l⁻¹ (5.2 mg · l⁻¹ · h⁻¹ in both cases) of VFA, but at 400 mg l⁻¹ the loading rate of nitrate was decreased (1.8 mg · l⁻¹ · h⁻¹) which represented a strong diminution of the 65%. In presence of any carrier used no changes in the nitrification rate was seen at the 200 and 400 mg l⁻¹ concentration assayed.

The VFA consumption in absence of carrier are shown in Figure 2. The patterns observed at 200 and 400 mg l⁻¹ were similar where it is seen that the intake of acetate was greater than propionate and butyrate. The VFA were consumed in around 50 h, the half time of the nitrification (Fig. 1). The rate VFA consumption values are shown in Table 1. The acetate was consumed at higher rate (57% greater) than propionate or butyrate. When acetate concentration was increased from 133 to 266 the rate consumption was still greater (83%) than for propionate or butyrate.

The effect of volatile fatty acids VFA in the biomass adhesion on sand, basalt and volcanic stone was studied. Figure 3 show the results obtained with basalt using 0, 200 and 400 mg l⁻¹ of VFA. The adhesion dynamics was studied up to the first 49 days in which it was measured the biomass concentration on the support, through changes in carbon concentration on the carrier. It can be seen that the adhesion was greater in presence of VFA, however at 400 mg l⁻¹ was higher. The results of biomass adhesion on volcanic stone at same VFA concentration are shown in Figure 4. It can be observed that at the same conditions of VFA the lag time was lesser than in basalt. Furthermore, the time needed to reach the same biomass attached at 400 mg l⁻¹ of VFA was also shorter. When the carrier

was sand as 200 as 400 mg l⁻¹ of VFA the adhesion profile was better than the previous carriers, as is showed in Figure 5. It can be seen that 3 mg (sludge-C) mg⁻¹ (carrier) was reached in about 15 d, while it was of 45 and 35 d for basalt and volcanic stone, respectively.

The behavior of adhesion of the nitrifying sludge in the three different carriers was not the same, such as it can be seen in the profile of the controls (without VFA). Using sand as carrier the adhesion started at the 15 d, while it was of 20 and 25 d in volcanic stone and basalt, respectively (Figs. 3, 4 and 5).

The adhesion rate on the three carrier at the concentration of VFA tested it can be seen in the Table 2. The minimum adhesion rate on basalt and it was of 0.02 mg C-biomass g⁻¹ carrier· d⁻¹. On the other hand the maximum adhesion rate was on sand and it was of 0.09 mg C-biomass g⁻¹ carrier· d⁻¹. Anyway, the rate adhesion was always greater on sand when VFA were added.

Discussion

The results shown in Figure 1 indicated that increasing the concentration of VFA, the nitrate rate formation decreased due to the competitive NH₄⁺-N consumption between autotrophic an heterotrophic microflora. Hanaki *et al* (1990) reported that nitrification rate decreased due to a K_s increased for NH₄⁺-N for the nitrifying microorganisms. Regarding the reported by Eilersen *et al* (1994) and Gómez (1994), our results have shown a remarkable sensibility to the VFA, as it had a strong inhibition of the nitrifying process at 400 mg l⁻¹ as compared to the control here used. There are evidences indicating that the nitrification could be affected by the carrier (Prosser, 1989). The values of the nitrification rate obtained when carriers were presents showed a similar nitrification behaviour respect to the control, which indicated that the carriers do not affected the nitrification process.

The nitrification rate was lower when the VFA concentration was increased, on the contrary the organic matter rate consumption was increased. The rates values shown in Table 1 indicate that at a higher concentration of acetate, higher rate consumption was noted, therefore it was the acetate the responsible that the nitrification rate was negatively affected. Nitrate formation was also low due to that a major $\text{NH}_4^+\text{-N}$ fraction was used to heterotrophic biomass formation instead of nitrification.

Besides the biomass increased its rate adhesion to the carrier was also increased when VFA were supplemented to the culture medium as it can be seen in Table 2. The size and concentration of the three carrier used were similar, but the chemical composition is different. The volcanic stone and basalt are mainly composed by silicates and the sand by carbonate. In Figures 3, 4 and 5 is clearly seen that the rate adhesion was proportional to the VFA concentration and the adhesion lag time was related to the type of carrier. It could be said that the sand was the better carrier because the rate adhesion was higher and the adhesion lag time shorter. The floc formation of the nitrifying biomass are dependent of the calcium salt. The sand has a high content of CaCO_3 and this fact could explain why the adhesion was improved. In continuous culture with basal as carrier in a airlift fermentor the adhesion lag time was around 40 d (Tijhuis *et al*, 1995a; Garrido 1996). In our work (in batch culture) using basalt and comparing with respect to the control, the lag time was 30% lower maybe due to lesser strength stress, but with the same carrier and VFA added the was lag time was decreased to 15 d. With sand as carrier the time adhesion was remarkable shorter. Therefore the addition of the VFA can be used as a factor to reduce the time adhesion.

There are evidences suggesting that the mechanism of adhesion is mediated by the exopolymers produced by the nitrifying microflora (Freitas and Livingston, 1995). Okabe *et al*, (1996) reported that increasing the C/N (with acetate as carbon source) of the culture the size of adhesion was greater. However there is no clear why the rate adhesion is increased.

One explanation might be that the VFA consumed by the nitrifying sludge affected the chemical composition of the exopolymers, thus improving the adhesion.

Conclusions

The organic matter can improve biofilm adhesion, specifically the volatile fatty at low concentration. VFA, acetic, propionic and butyric, in a ratio of 4:1:1 increased the biomass adhesion. When 400 mg l⁻¹ of VFA an inhibition of about of 30 %, however under this organic matter concentration the adhesion was greater. The lag time adhesion was significantly reduced when sand was used as carrier, therefore for diminishing the time biofilm formation on the support the selection of the type of carrier is important

References

- Beeftink H. H., and Staugaard P. (1986) Structure and Dynamics of Anaerobic Bacteria Aggregates in a gas lift Reactor. *Appli. Environ. Microbiol.*, **52**, 1139-1146.
- Böck E. (1976). Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic mater. II: Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch. Microbiol.* **108**, 305-312.
- Böck E., Koops H. P., Harms H., and Ahlers B., (1991), The biochemistry of nitrifying microorganism. *In: Variations In: Autotrophic Life, Academic Press London*, pp 171-200.
- Bryers J. D., and Characklis W. G. (1982) Process Governing Primary Biofilm Formation. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2451-2476.
- Eilersen A. M., Henze M., and Klotz L. (1994) Effect of Volatile Fatty Acids and Thrimethiyamine on Nitrification in Activated Sludge. *Wat. Res.*, **28**, 1329-1336.
- Freitas dos Santos L. M., and Livingston A. G. (1995) Membrane Attachment Biofilm for VOC Waste water Treatment I: Novel In Situ Biofilm Technique.

- Garrido-Fernandez J. M. (1995). Nitrificación e desnitrificación de aguas residuales con concentraciones elevadas de formaldehído e urea. Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Gjaltema A., Tijhuis L., Loosdrecht M. C. M., and Heijnen J. J. (1995) , Detachment of Biomass Detachment from Suspended nongrowing Spherical Biofilms in Airlift Reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 258-269.
- Gomez-Hernandez G. J.(1994). Obtención de microfloras nitrificantes:nitrificación en diferentes condiciones de cultivo. Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Hanaki K., Wantawin Ch. and Ohgaki S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* **24**, 297-302.
- Lowry O. H. , Rosenbrough N. J., Farr A. L. And Randall R. J. (1957). Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Bacteriol. Chem.* **193**, 265-271.
- Okabe S., Hiratia K., Ozawa Y., and Watanabe Y. (1996) Spatial microbial Dis Biofilm.*Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 25-35.
- Prosser J . Y. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, **30**, 125-181.
- Tanaka H., Uzman S. and Dunn I. J. (1981) Kinetics of Nitrification using a Sand Bed Reactor with attachment. *Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 1683-1702.
- a.Tijhuis L., Huisman J. L., Loosdrecht M. C. M., and Heijnen J. J. (1995) Formation of Nitrifying Biofilm on Small Suspended Particles in Airlift Reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 485-595.
- bTijhuis L., Loosdrecht M. C. M., and Heijnen J. J. (1995) Dynamics of Biofilm Detachment in Biofilm airlift Suspension Reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 481-487.

Vanner O., and Cunningham A. b. (1995) Modeling Biofilm Accumulation and Mass Transport in Porous Medium Under High Substrate Loading. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 703-712.

Watson S. W., Bock E., Harms H., Koops H. P., and Hooper A. B., (1989) Nitrifying Bacteria. In Stanly J. T., Brynt M. Bergy's., Pfennig N., and Holt J. G. *Manual of Systematic Bacteriology Vol 3*, pp 1807-1834. ed. Williams and Wolkins, Baltimore.

Table 1. VFA rate consumption ($\text{mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$) at the 4:1:1 ratio for acetate, propionate and butyrate respectively

VFA mg l^{-1}	Acetic	Propionic	Butyric
200	3.7	1.6	1.6
400	7.5	1.25	1.25

Table 2. Rate of biofilm formation ($\text{mg biomass-N}\cdot\text{mg}^{-1}\text{carrier}\cdot\text{d}^{-1}$), with two concentration of VFA and without VFA.

Carrier	0 mg l^{-1}	200 mg l^{-1}	400 mg l^{-1}
Basalt	0.02	0.04	0.07
Volcanic stone	0.03	0.06	0.08
sand	0.03	0.07	0.09

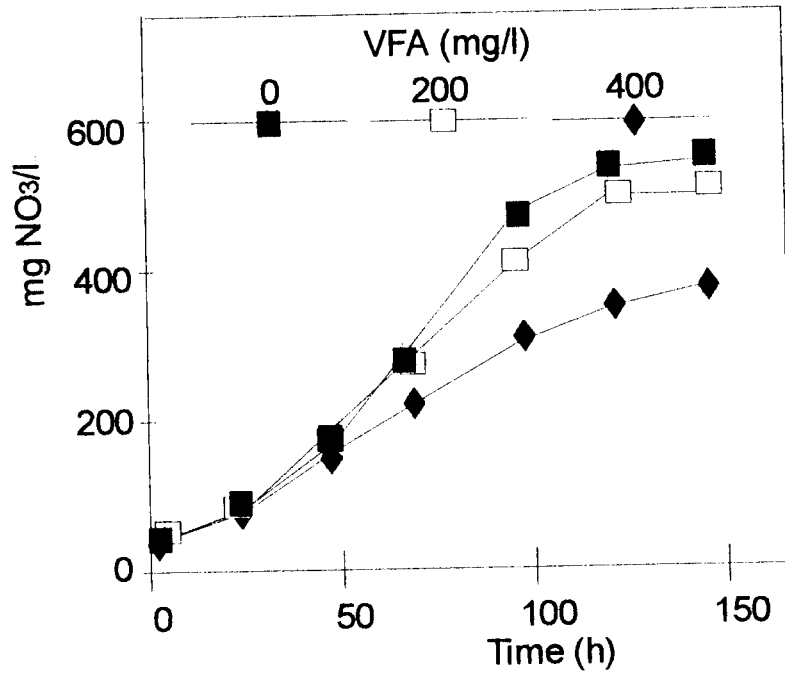


Figure 1. Nitrate formation of nitrifying sludge only in the presence of volatile fatty acids.

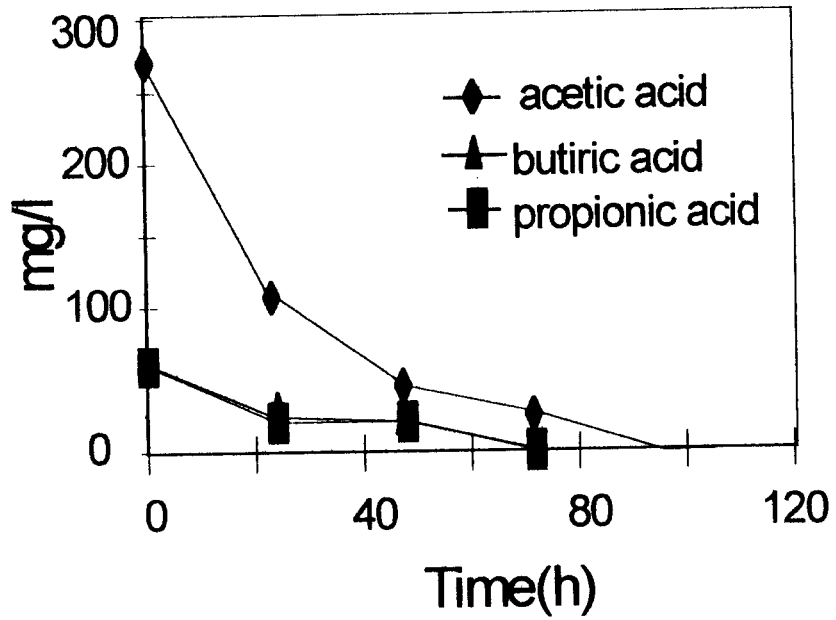


Figure 2. VFA consumption

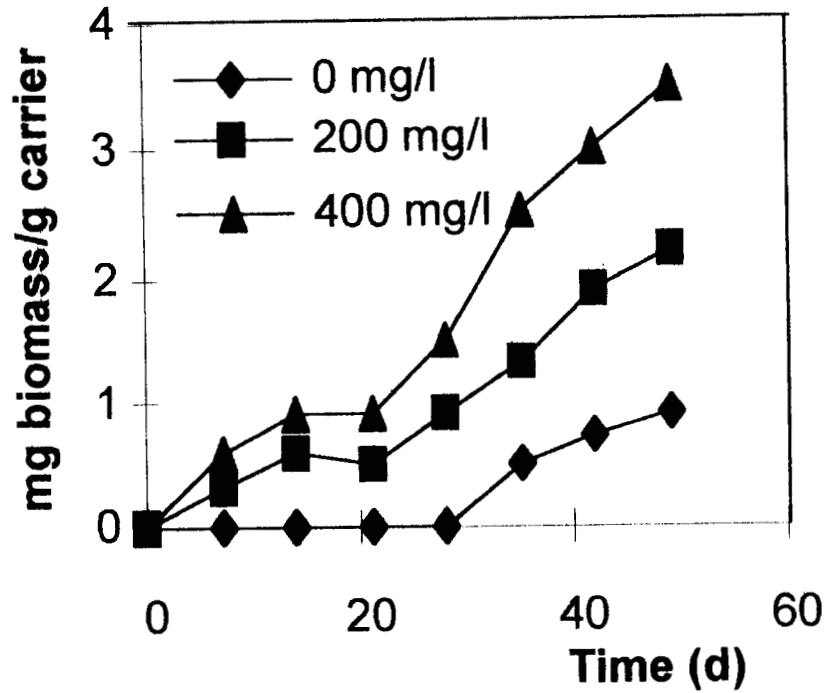


Figure 3. Biofilm attachment aver basalt at different concentration of FVA

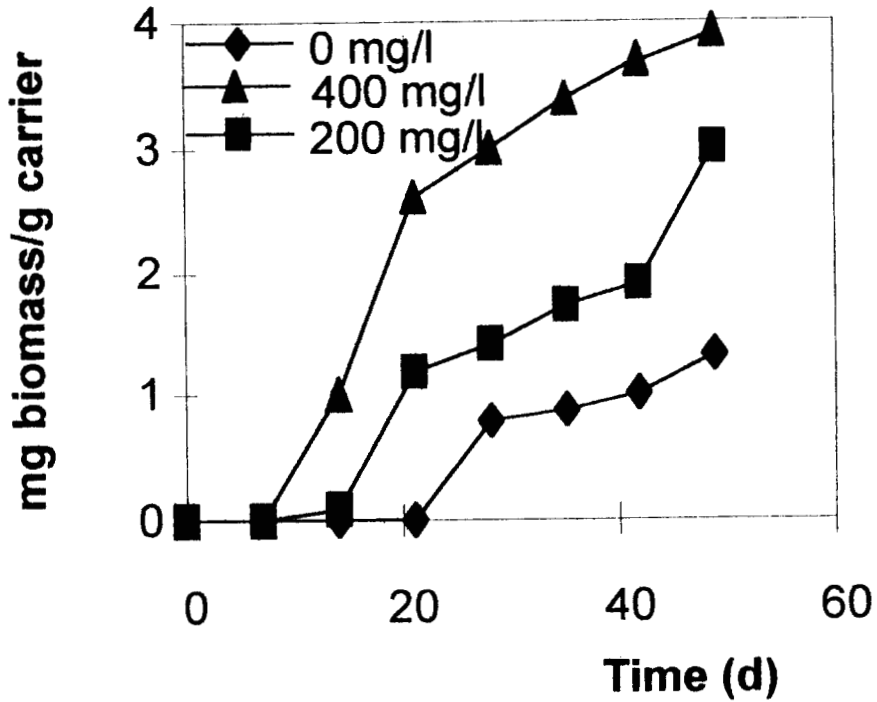


Figure 4. Biofilm attachment on volcanic stone at different concentration of FVA

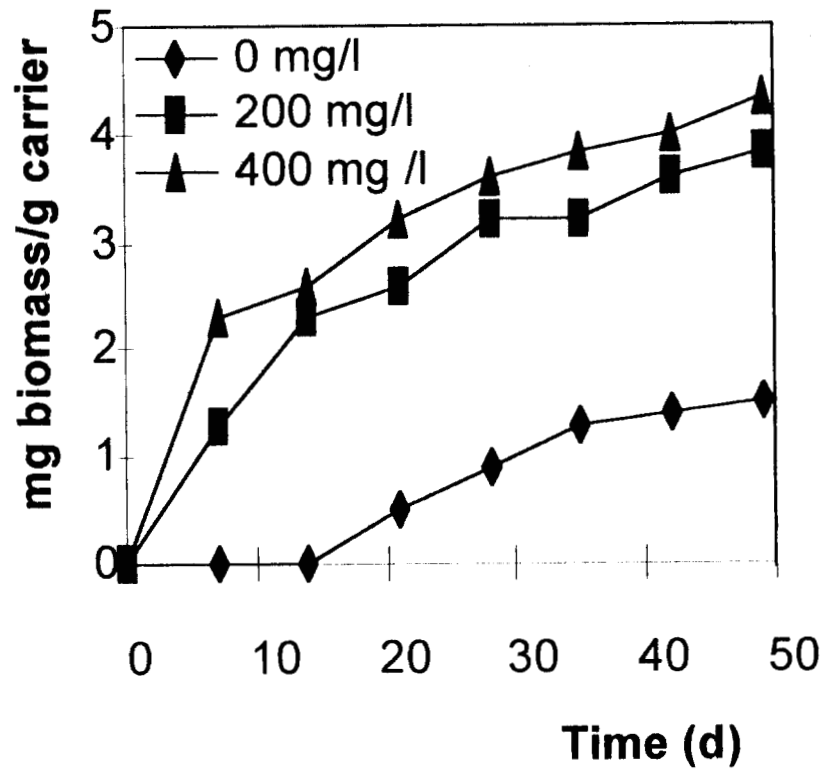


Figure 5. Biofilm adhesion over sand at different concentration of FVA