



# **TECNOLOGÍAS ELECTROQUÍMICAS MICROBIANAS: REDUCCIÓN DE NITRATOS EN AGUAS RESIDUALES CON CÁTODO DE LECHO FLUIDIZADO**

## **MICROBIAL ELECTROCHEMICAL TECHNOLOGIES: REDUCING NITRATES IN WASTEWATER BY USING A FLUIDIZED BED AS CATHODE**

### **MÁSTER UNIVERSITARIO EN HIDROLOGÍA Y GESTIÓN DE RECURSOS HÍDRICOS**

**Presentado por:**

**D<sup>a</sup>. Karina Mishel Luna Lema**

**Dirigido por:**

**Dr. Pedro Letón García**

**D<sup>a</sup>. María Llorente Remartínez**

**Alcalá de Henares, a 8 de junio de 2020**

## **Agradecimientos**

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a mis tutores el Dr. Pedro Letón García y D<sup>a</sup> María Llorente Remartínez por todo su tiempo dedicado en el desarrollo de este trabajo de fin de máster. En especial a María por toda su atención, paciencia y ayuda durante la etapa de investigación, así como todos sus consejos y explicaciones en la elaboración de esta memoria.

A todos los compañeros que desarrollan sus trabajos en el laboratorio de investigación de Ingeniería Química (UAH), gracias por los consejos, explicaciones, anécdotas y sobre todo la compañía que hicieron mucho más amenas las horas de investigación.

Gracias a mis amigos del máster, que me ayudaron a estudiar y afrontar las múltiples ramas de estudio desarrolladas en este máster (biología, geología, etc...) algunas de ellas desconocidas hasta entonces para mí.

Por último, quiero agradecer al pilar fundamental de mi vida, mi familia. A mis padres, Carlos y Flor, agradezco su infinito cariño, apoyo y esfuerzo para poder completar esta etapa. Su confianza depositada en mí ha guiado este camino desde que iniciase la etapa universitaria, por ello resultan para mí un orgullo y ejemplo de humildad a seguir en todo momento.

A mi hermana Kerly gracias, por animarme a seguir cuando estaba a punto de tirar la toalla y aguantar mis múltiples quejas por elegir esta rama de estudio, tus abrazos siempre son capaces de recargarme mental y espiritualmente. Por último, gracias a ti pequeño Juanca, por todo tu amor y las múltiples ocurrencias por intentar animarme, sé que con el transcurso de los años comprenderás mejor la importancia de este máster.

*“Yaku kawsay”*

Proverbio quechua: *El agua es vida*

# INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1. La situación del agua .....	2
1.2. Contaminación por nitratos .....	3
1.3. Marco legal de los nitratos.....	5
1.4. Tratamientos para la eliminación de nitratos .....	6
1.4.1. Tratamientos fisicoquímicos .....	8
1.4.2. Tratamientos químicos .....	10
1.4.3. Tratamientos biológicos. Desnitrificación .....	11
1.5. Reactores de lecho fluidizado (FBR) para la eliminación de nitratos .....	16
1.5.1 Aplicación de MET en el tratamiento de aguas residuales y en la reducción de nitratos.....	22
<b>2. OBEJTIVOS</b> .....	24
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	25
3.2. Sistema electroquímico microbiano.....	27
3.2.1. Reactor de lecho fluidizado electroquímico microbiano .....	27
3.2.2. Sistema de tres electrodos .....	28
3.3. Métodos analíticos .....	30
3.4. Medidas electroquímicas .....	30
3.5. Procedimiento experimental .....	31
<b>4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	32
4.1. Optimización del medio mínimo basal .....	32
4.2. Interacción de los microorganismos con el cátodo .....	38
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	39
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo del nitrógeno .	4
<b>Figura 2.</b> Ciclo del nitrógeno en el tratamiento de agua	7
<b>Figura 3.</b> Esquema del proyecto Life-ANSWER.	10
<b>Figura 4.</b> Esquema del Proceso Modificado Ludzack Ettinger.	13
<b>Figura 5.</b> Eficiencia energética en una EDAR	15
<b>Figura 6.</b> Esquema de FBR en la aplicación de aguas residuales	17
<b>Figura 7.</b> Pila de combustible microbiana MFC	20
<b>Figura 8.</b> (a) Generación de hidrógeno con fuente de alimentación externa en células de electrólisis microbiana (MEC); (b) Producción química por electrosíntesis microbiana (MES)	21
<b>Figura 9.</b> Esquema de un ME-FBR de ánodo fluidizado para la degradación bioelectroquímica de la materia orgánica de aguas residuales	24
<b>Figura 10.</b> Bote pequeño donde se realizan los cultivos, sellado con septum de butilo.	26
<b>Figura 11.</b> Esquema del Reactor utilizando como electrodo de trabajo el rod de grafito.	29
<b>Figura 12.</b> a) Concentración de iones (nitrato y nitrito) en el cultivo con medio. b) Concentración de iones (nitrato y nitrito) y acetato en el cultivo con acetato	33
<b>Figura 13.</b> Concentración de los iones (nitrato y nitrito) y acetato en el cultivo con acetato durante 25 horas.	35
<b>Figura 14.</b> a) Concentración de nitrato y acetato en el cultivo fosfatado. b) Concentración de iones (nitrato y nitrito) y acetato en el cultivo carbonatado.	36
<b>Figura 15.</b> Concentración de iones (nitrato y nitrito) en el cultivo con acetato durante 96 horas (aproximadamente 4 días).	37
<b>Figura 16.</b> Representación de las voltametrías cíclicas en los tres sistemas de estudio: reactor rod (verde), reactor papel (azul), reactor control con cátodo rod (rojo) y reactor control con cátodo de papel grafito (negro).	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Valores máximos permitidos para el agua de consumo humano (RD 1744/2003)	6
<b>Tabla 2.</b> Comparación de las distintas tecnologías para la eliminación de nitratos de aguas residuales.	14
<b>Tabla 3.</b> Composición de medio mínimo basal de 1 L.	25
<b>Tabla 4.</b> Características y materiales utilizados en los tres reactores de estudio.	29
<b>Tabla 5.</b> Resultados de la concentración de nitrato y nitrito medidos en el cromatógrafo iónico para las tres fuentes de carbono	33

## **ABREVIATURAS**

AnAOB: bacterias autótrofas anammox

DQO: demanda química de oxígeno

EDAR: Estación depuradora de aguas residuales

EPA: Agencia de Protección Ambiental (United States Environmental Protection)

FAO: Organización de Comida y Agricultura

FBR: Reactor de lecho fluidizado

Heq: habitante equivalente

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

MDC: célula de desalinización microbiana

MEC: célula de electrolisis microbiana

ME-FBR: reactor fluidizado electroquímico microbiano

MES: célula de electrosíntesis microbiana

MET: Tecnologías electroquímicas microbianas

MFC: pila microbiana de combustible

MRC: célula de remediación microbiana

MSC: célula solar microbiana

PN: nitrificación parcial

UAH: Universidad de Alcalá de Henares

UNESCO: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura

## RESUMEN

La escasez de agua es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la sociedad actual, el progresivo aumento en la demanda de agua por parte de la industria, agricultura y población y la disminución de recursos hídricos de calidad destinados al consumo humano fomentan el desarrollo e investigación de las tecnologías de tratamiento de aguas.

Uno de los contaminantes presentes tanto en aguas subterráneas como superficiales es el ión nitrato  $\text{NO}_3^-$ , cuyo origen está ligado principalmente al uso indebido de grandes cantidades de fertilizantes en la agricultura y desechos municipales. Su presencia en elevadas concentraciones puede provocar eutrofización en las aguas superficiales como ríos o lagos, además tiene graves consecuencias en la salud humana, ya que un consumo elevado repercute en el desarrollo de enfermedades cancerígenas e inclusive provoca la muerte en lactantes y niños, por la formación de metahemoglobina o también conocida como “sangre azul”.

Los procesos actuales de eliminación de nitratos en aguas residuales pueden dividirse en tres grupos: fisicoquímicos, químicos y biológicos, siendo estos últimos los más efectivos, debido a que consiguen un elevado rendimiento de eliminación de nitratos cumpliendo con los límites máximos establecidos por la legislación. Sin embargo, la aplicación de un proceso biológico conlleva la generación de grandes cantidades de lodo que deben ser tratadas posteriormente, y un gasto energético elevado debido al uso de grandes equipos de aireación y control, repercutiendo en mayores costes de tratamiento.

Como alternativa se estudia en este proyecto la aplicación de la tecnología electroquímica microbiana (MET) para el proceso de desnitrificación. Este proceso lleva a cabo la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a nitrito  $\text{NO}_2^-$  pasando finalmente a  $\text{N}_2$  (g), a partir de los electrones cedidos por un cátodo y mediados por microorganismos. Se combina el uso de MET con un reactor de lecho fluidizado (FBR) facilitando la transferencia de masa entre la solución del electrolito y los microorganismos electroactivos.

El estudio se llevó a cabo mediante la optimización del medio mínimo basal para

potenciar el crecimiento de los microorganismos reductores de nitratos presentes en el agua residual de un reactor biológico de una EDAR. Para ello se realizó un estudio con distintos compuestos como fuente de carbono, resultando el acetato de sodio el más idóneo para utilizar en el medio mínimo basal. Se realizó el seguimiento de las concentraciones de nitrato y nitrito por cromatografía iónica y del acetato como fuente de carbono en el HPLC en diferentes intervalos de tiempo.

Además, se llevó a cabo el diseño de un reactor de lecho fluidizado bioelectroquímico (ME-FBR) cuyo lecho fluidizado actuaba como cátodo conformado por una única cámara en la que se mantuvieron las condiciones anóxicas para potenciar la reducción de nitratos. Se estudió la configuración de tres reactores usando diferentes materiales como electrodos de trabajo y contraelectrodos, realizando voltamperometría cíclica y cronoamperometría como medidas electroquímicas.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. La situación del agua**

En los últimos años se calcula que la cantidad de agua en el mundo ronda los 1400 millones de km<sup>3</sup>, de los cuales apenas el 0,003 % (45000 km<sup>3</sup>) constituyen los llamados “recursos de agua dulce” aprovechables para la higiene, bebida, la agricultura e industria. Sin embargo, no toda el agua es accesible, puesto que gran parte de ella se pierde en crecidas estacionales que dificultan su retención antes de llegar a ríos remotos (FAOWater, 2008).

El uso del agua se reparte en tres sectores: la agricultura (incluyendo actividades de riego, ganadería y apicultura) que tiene un peso muy importante, siendo el mayor consumidor de agua, supone el 69 % de las extracciones anuales a nivel mundial, y el porcentaje es mucho mayor en países en vía de desarrollo alcanzando el 90 %; la industria (se incluye la producción de energía) ocupa el segundo lugar con el 19% y por último el uso doméstico con el 12%. Su demanda se ha visto incrementada en un 1% al año en todo el mundo durante las últimas décadas, debido al aumento de población, desarrollo socioeconómico y cambios en el modelo de consumo (WWAP

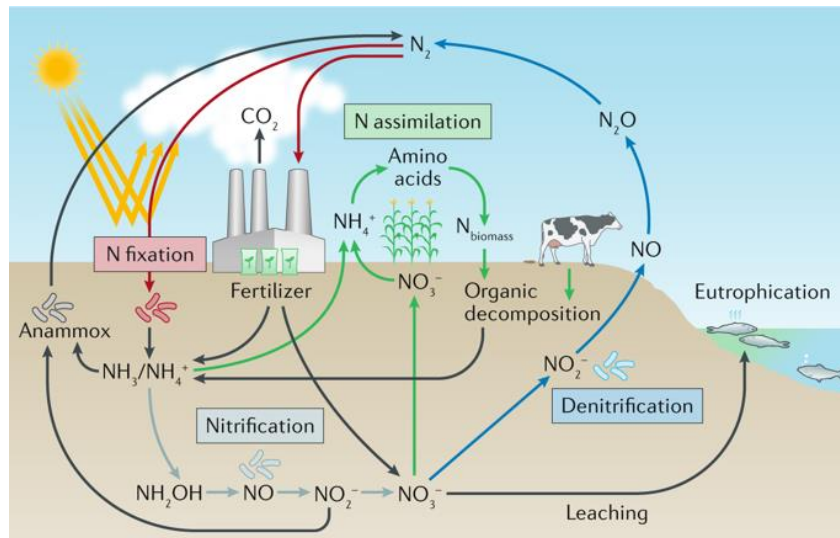


(UNESCO World Water Assessment), 2019). Actualmente la escasez de agua es uno de los mayores retos a los que se enfrenta la sociedad puesto que se prevé un incremento del 20-30 % hasta el 2050 frente al uso del nivel actual. No solo es importante la cantidad de agua si no también la calidad, se estima que más del 80% de todas las aguas residuales generadas se devuelven al medio ambiente sin ser tratadas (WWAP (UNESCO World Water Assessment), 2017), esta cifra repercute en el desarrollo de numerosas enfermedades relacionadas con el agua, como son la diarrea, esquistosomiasis, paludismo, dengue y legionelosis entre otras muchas, debido a la deficiencia en los servicios de saneamiento e higiene del agua (Clasen et al., 2014)

En Europa, la Directiva Marco del agua 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del consejo (DOCE, 2000) define el agua como un bien no comercial como los demás, sino como un patrimonio que hay que conservar, defender y tratar como tal.

## **1.2. Contaminación por nitratos**

Uno de los contaminantes más presentes en las aguas residuales son los nitratos. La contaminación de nitratos en agua superficiales se debe principalmente al nitrógeno de origen antropogénico procedente de las actividades agrícolas, industriales y de residuos urbanos. Se estima que la agricultura, debido al uso de fertilizantes agrícolas y la presencia de grandes explotaciones ganaderas, genera casi el 50% de las descargas totales de nitrógeno en aguas superficiales, el cual acaba interfiriendo de forma negativa en el ciclo del nitrógeno (Garzon-Vidueira et al., 2020) representado en la Figura 1.



**Figura 1.** Ciclo del nitrógeno (Tomado de Lehnert et al., 2018).

Dentro de la actividad agrícola la contaminación de nitrógeno en aguas puede ser de dos tipos: de forma puntual ocasionada por las ganaderías, en su mayoría, viviendas intensivas y enfocada en áreas pequeñas; o por el contrario ser de carácter difuso como ocurre con la agricultura que abarca grandes áreas de tierra (Velthof et al., 2014)

En los últimos años se ha incrementado el uso de fertilizantes sintéticos debido a que contienen grandes cantidades de productos químicos altamente procesados entre ellos los nitratos, los cuales favorecen un rápido crecimiento a las plantas, sin embargo, la cantidad sobrante de nitratos que no absorbe la planta pueden sufrir un proceso de lixiviación, fenómeno por el cual hay excedencia de nutrientes, en este caso el nitrato, acaba siendo arrastrado a las aguas del suelo, o subterráneas, debido a la lluvia o riego. (Arevalo et al., 2007)

No obstante, el uso de los fertilizantes en la agricultura ya sean de carácter orgánico o sintético no suponen el factor principal de la pérdida de calidad del agua, sino que más bien se produce por las malas prácticas de explotación de las tierras de cultivos agrícolas.

Respecto a sus efectos ecológicos una elevada cantidad de nitratos provoca la eutrofización antropogénica de las aguas superficiales, este fenómeno se da cuando el exceso de nutrientes es aprovechado por las plantas y algunos organismos como son algas y lirios para crecer en grandes cantidades,

consumiendo todo el oxígeno e impidiendo que llegue a capas más profundas, provocando así un desequilibrio biológico en la fauna y flora, como por ejemplo la mortandad de peces. La eutrofización se da en aguas continentales, como son los ríos, lagos, acequias y también en zonas costeras (FAO & Ongley, 1997).

Otra actividad que produce descargas de nitrógeno de forma puntual en aguas superficiales son los desechos municipales, se estima que cada persona genera aproximadamente 5 kg de residuos de nitrógeno /año (Garzon-Vidueira et al., 2020).

La presencia de nitratos en agua es un proceso irreversible que genera múltiples problemas económicos y ecológicos, a pesar de que el nitrato en sí no resulta tóxico su posterior transformación a nitrito en el metabolismo humano puede generar nitrosaminas que resultan cancerígenas en el sistema digestivo de los adultos, mientras que en los niños provoca efectos mortales por la formación de metahemoglobina, también conocido como “síndrome del bebé azul”, que produce una reducción del transporte de oxígeno a la sangre. Se estima que la cantidad máxima recomendable que una persona puede ingerir está entre 0- 3,7 mg de nitratos / kg de peso corporal. (Donoso & Cortés, 2018)

### **1.3. Marco legal de los nitratos**

Ya que los nitratos son parte de los desechos humanos, agrícolas y ganaderos comunes que se encuentran en todas las aguas residuales tanto la Unión Europea como España tienen legislaciones específicas. Con el fin de proteger y reducir la contaminación de nitratos agrícolas en el agua, la Unión Europea establece dos directivas:

- Directiva 91/676/CEE, la cual, entre muchas otras medidas limita la aplicación de fertilizantes (minerales y orgánicos), teniendo en cuenta las necesidades de los cultivos, se establece que la cantidad máxima de estiércol aplicada es de 170 kg N/ ha/ año. Además, establece códigos de buenas prácticas agrícolas, limitando la aplicación de fertilizantes en terrenos que muestren una elevada pendiente, zonas congeladas o cercanía de cursos de agua, para evitar pérdidas de nitratos por escorrentía o lixiviación (DOCE, 1991).

- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (DOCE, 2000).

En España se recogen los criterios sanitarios para el consumo de la calidad de agua para el consumo humano en el RD 140/2003, aplicables a todas las aguas independientemente de su origen y el tratamiento de potabilización que reciban, para uso de industria alimentaria o suministradas a través de redes de distribución públicas o privadas, depósitos o cisternas. El RD 1744/2003 fija los valores de los parámetros que debe presentar el agua en el punto donde se pone el agua a disposición del consumidor recogidos en la **Tabla 1** (BOE, 2003).

**Tabla 1.** Valores máximos permitidos para el agua de consumo humano (RD 1744/2003) (Tomados de (BOE, 2003))

Parámetro	Cantidad máx permitida (mg/L)
Amonio	0,50
Nitrato	50
Nitrito	0,1

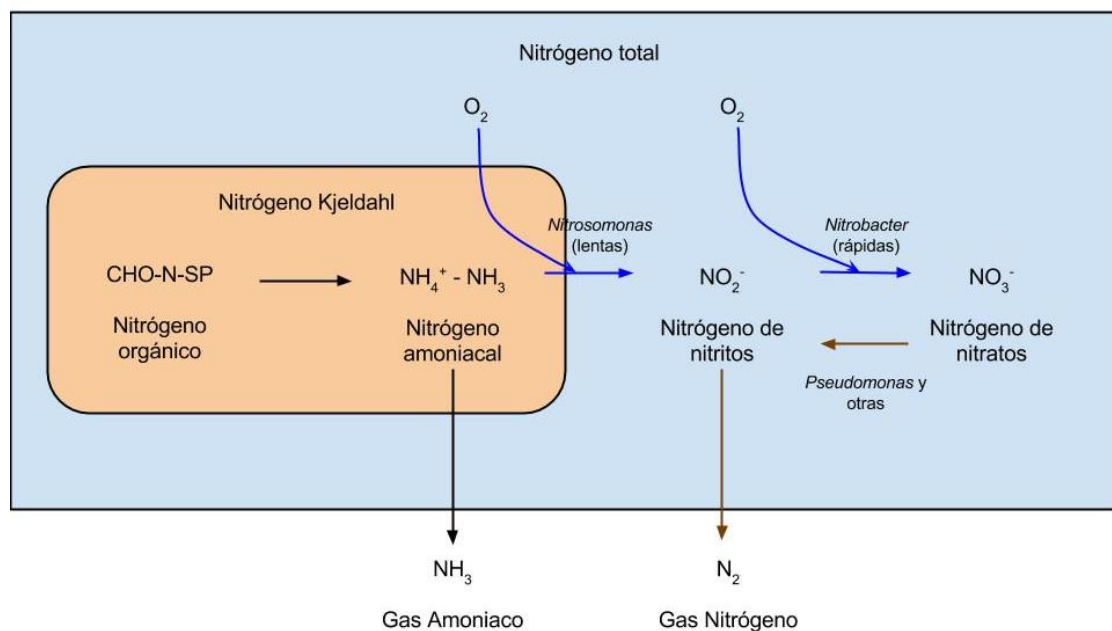
Estos límites se sitúan dentro de los máximos establecidos por la Unión Europea de 50 mg/L para nitratos y también es una cantidad aceptable por recomendación de la OMS, pero son superiores a los límites recomendados por la Agencia de protección ambiental (EPA) que sitúa un valor de 10 mg/L.

Con el objetivo de garantizar un tratamiento adecuado de las aguas residuales antes de su vertido, la Directiva 91/271/CEE (DOCE, 1991) establece que los vertidos procedentes de una instalación depuradora de aguas residuales urbanas (EDAR) no pueden tener una concentración superior a los 15 mg/L Nitrógeno total para una capacidad de 10.000-100.000 habitantes equivalentes (heq), reduciéndose a 10 mg/L si es >100.000 heq.

#### **1.4. Tratamientos para la eliminación de nitratos**

El Nitrógeno puede presentarse en diferentes especies químicas durante el tratamiento de un agua residual tal y como se muestra en la figura 2. Al iniciarse la

descarga del agua residual bruta o los desechos orgánicos, el nitrógeno presente se encuentra incorporado en su mayoría como nitrógeno orgánico presente en moléculas orgánicas como son las proteínas o los ac. nucleicos. Posteriormente los microorganismos presentes consumen esa materia orgánica dando lugar a otra forma, el nitrógeno amoniacal  $\text{NH}_4^+$ , el cual resulta letal e irritante cuando se ve sometido a grandes cambios de pH, generando gas amoniaco  $\text{NH}_3$  a pH alcalino. A continuación, mediante la acción de bacterias nitrosomas el nitrógeno amoniacal se oxida a nitrito  $\text{NO}_2^-$ , es un proceso lento que puede verse afectado por cualquier cambio en sus condiciones de operación, generando grandes concentraciones de nitrógeno amoniacal que pueden ser altamente perjudiciales. Por último, el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) se oxida por acción microbiológica a nitrato  $\text{NO}_3^-$ , el cual puede ser asimilado por las plantas o algas y regresar así a la cadena trófica, o mediante reducción ser convertido a nitrógeno gas  $\text{N}_2$  y volatilizarse a la atmósfera (www.aguasresiduales.info, 2017)



**Figura 2.** Ciclo del nitrógeno en el tratamiento de agua (Tomado de www.aguasresiduales.info, 2017)

El nitrato  $\text{NO}_3^-$  es un anión procedente del ácido nítrico  $\text{HNO}_3$ , en el cual el nitrógeno tiene un estado de oxidación +5 y forma una estructura triangular, se combina con cationes para formar sales, entre los que destaca: nitrato de amonio  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de gran uso como fertilizante agrícola por su elevada solubilidad en agua y presente en la fabricación de explosivos; nitrato de sodio  $\text{NaNO}_3$  cuyo uso principal se da

como preservante de alimentos; nitrato potásico  $\text{KNO}_3$  caracterizado por ser un agente oxidante fuerte que se usa en alimentación, fertilizantes e industria.

Debido a su elevada solubilidad en agua, el  $\text{NO}_3^-$  es un compuesto muy estable que no se puede eliminar fácilmente con tratamientos convencionales como filtración o ablandamiento. (Ware, 1989)

Los métodos actuales existentes para la eliminación de nitratos pueden dividirse en tres grandes grupos: tratamientos físico-químicos que consiguen una gran eliminación de nitratos, pero generan una segunda corriente concentrada del mismo, tratamientos biológicos entre los que destaca la desnitrificación biológica que resulta sin duda el método más efectivo y más utilizado en la actualidad en el tratamiento tanto de aguas industriales como urbanas, y por último los tratamientos químicos basados en la reducción catalítica de nitratos a nitrógeno.

#### **1.4.1. Tratamientos fisicoquímicos**

Este tipo de tratamientos permite la eliminación efectiva de iones nitrato de aguas contaminadas al concentrarlos en una segunda corriente de desechos, por tanto, estos métodos no eliminan en sí la cantidad de contaminante, sino que lo transfieren a una segunda corriente que a su vez debe ser tratada de nuevo, a continuación, se recogen algunos métodos.

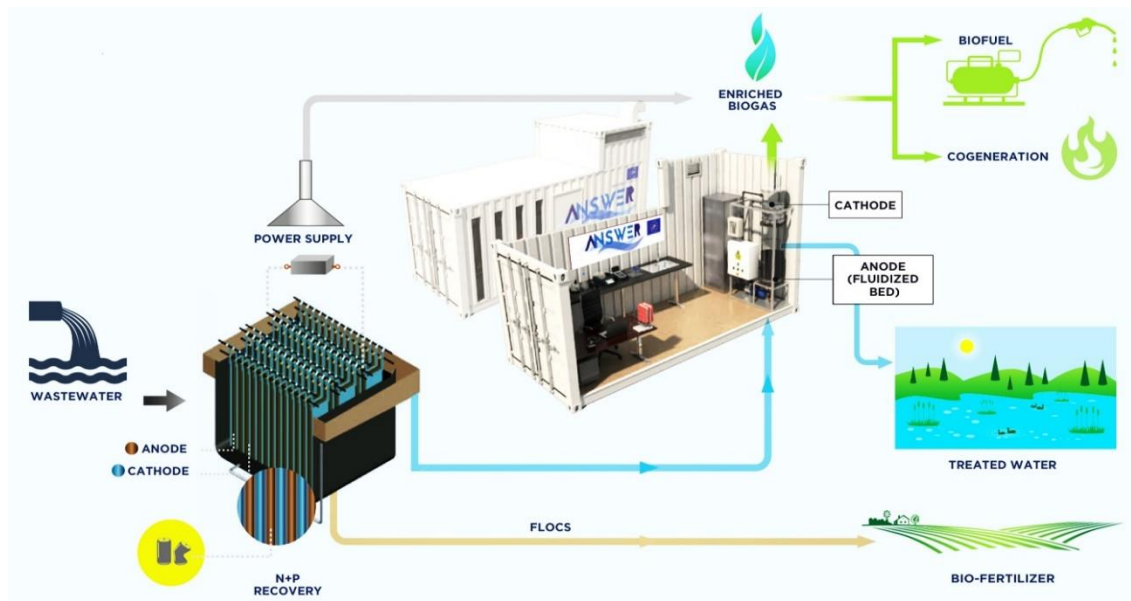
**Intercambio iónico:** ha resultado ser de los más adecuados para tratar corrientes de agua de pequeños proveedores, este tratamiento consiste en pasar la corriente contaminada por un lecho que contiene fuertes resinas de intercambio aniónico base en las cuales los iones nitrato se intercambian por aniones cloruro hasta agotar la capacidad de intercambio de la resina, posteriormente se lleva a cabo la regeneración de la resina usando una solución concentrada de cloruro de sodio. Una de las desventajas de este método es el sobrecoste de la regeneración de resinas para su nuevo uso, y la falta de selectividad por el ion nitrato, así pues, la presencia de otro contaminante como son sulfatos, cloratos o carbonatos disminuye la eliminación de nitratos. Los últimos estudios realizados se centran en modificar la estructura de las resinas para aumentar su selectividad por los nitratos sobre los sulfatos (Samatya et al., 2006).

**Ósmosis inversa:** consiste en forzar la circulación de la corriente contaminada a través de una membrana semipermeable que retiene los nitratos y otros contaminantes, su principal problema es el aumento de la presión osmótica que se puede generar en el sistema y una saturación de la membrana por que alguno de los componentes presentes alcance elevadas concentraciones (Bohdziewicz et al., 1999). Se ha aplicado esta técnica en la eliminación de nitratos en aguas mineras, consiguiendo retenciones del 89% para el nitrato y un 82% para el amonio, sin enriquecer de metales la corriente de rechazo disminuyendo así el riesgo por toxicidad (Häyrynen et al., 2009).

**Electrodiálisis:** el agua contaminada fluye a través de unas membranas semipermeables aniónicas alternadas que forman una especie de batería, se induce una corriente continua que aporta la energía necesaria para la migración de iones disueltos a través de las membranas, de forma que se eliminan los iones al paso de agua a través de las membranas, hasta conseguir una corriente limpia. El principal inconveniente de este método consiste en la precipitación de sales distintas del nitrato en el compartimento del concentrado que limita el rendimiento de la operación al disminuir la velocidad de recuperación del agua y el rechazo general de los iones al causar incrustaciones y ensuciamiento de las membranas (El Midaoui et al., 2002). Se ha aplicado esta técnica como tratamiento terciario en las aguas residuales de una universidad alcanzando una eliminación de hasta el 90% de nitratos en los que se estudia además la optimización de parámetros como la corriente aplicada, el área necesaria de trabajo o la variación de pH (Albornoz et al., 2019).

**Electrocoagulación:** consiste en la aplicación de corriente eléctrica entre dos electrodos de una solución electrolítica para generar un agente desestabilizante que neutralice las cargas de los contaminantes para su eliminación del agua. Destaca el proyecto Life-ANSWER (soluciones avanzadas de nutrientes con recuperación electroquímica, en sus siglas en inglés) desarrollado conjuntamente por la empresa Mahou-San Miguel, Aqualia y la Universidad de Alcalá de Henares (UAH), figura 3, en el cual el ánodo está polarizado positivamente. Consiste en unas cestas de acero inoxidable que contienen aluminio proveniente de las latas de cerveza, reutilizadas, quedando como ion  $Al^{3+}$  que neutraliza los nitratos y fosfatos

del agua residual. El fango obtenido de este tratamiento se utiliza como fertilizante en el jardín botánico de la UAH con un alto contenido en fósforo y nitrógeno ([www.iagua.es](http://www.iagua.es)).



**Figura 3.** Esquema del proyecto Life-ANSWER ( Tomado de [www.life-answer.eu.es](http://www.life-answer.eu.es)).

#### 1.4.2. Tratamientos químicos

**Reducción Catalítica:** en este proceso los nitratos se reducen selectivamente a nitrógeno  $N_2$  mediante el uso de catalizadores metálicos y utilizando  $H_2$  como agente reductor. Esta tecnología no genera residuos y puede ser escalable de pequeñas aplicaciones a grandes, además sus requisitos de energía son relativamente bajos.

Los catalizadores más utilizados son Pd-Me, donde Me hace referencia a metales como el cobre (Cu) o estaño (Sn), entre otros, que están soportados en partículas de carbón activo CA de tipo comercial o activados químicamente. Se usa en forma de polvo suspendido, por lo que su recuperación y regeneración tras el tratamiento resulta complejo.

Es una tecnología que no se encuentra a nivel comercial debido a ciertos inconvenientes que presenta: la formación de iones amonio como posibles subproductos de la reducción de grandes cantidades de nitratos, la posible contaminación del agua por partículas suspendidas del catalizador que contienen metales nobles y la seguridad de sus operaciones (Centi & Perathoner, 2003).

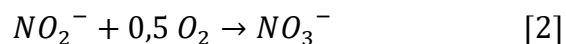
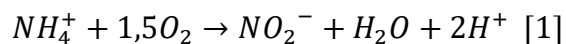


### 1.4.3. Tratamientos biológicos. Desnitrificación

Sin duda es uno de los métodos más usados en las plantas de tratamiento de aguas residuales e industriales, ya que asegura una buena eliminación de la materia orgánica y de los nitratos para cumplir con los límites establecidos

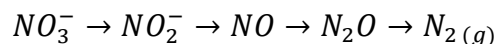
La desnitrificación biológica se lleva a cabo en las EDAR como parte del tratamiento secundario para eliminar la materia orgánica y nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo. No es un proceso aislado, sino que se combina con la nitrificación para conseguir la eficacia requerida.

*Nitrificación:* es un proceso que se ejecuta en dos pasos, primero se oxida el amonio  $NH_4^+$  a nitrito  $NO_2^-$  por medio de bacterias amonio-oxidantes, y posteriormente el nitrito  $NO_2^-$  se oxida a nitrato  $NO_3^-$  por bacterias nitritoxidantes. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



El consumo de oxígeno se estima como 3,5-4 kg  $O_2$  / kg de N transformado.

*Desnitrificación:* consiste en la conversión de nitratos  $NO_3^-$  a nitrógeno gas  $N_2$  de manera biológica en condiciones anóxicas, las reacciones que se llevan a cabo en la reducción del nitrato son:



Una amplia gama de bacterias, incluidas de los géneros *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Anchromobacter*, *Thiobacillus* y *Bacillus*, pueden llevar acabo la reducción de nitrato a nitrógeno gas ya sea en condiciones anaeróbicas o aeróbicas causando la desnitrificación (Lakshmi, 2010). Estas bacterias tienen una necesidad esencial de alguna fuente de alimento y energía que obtienen de sustancias orgánicas en el caso de ser heterótrofas o por el contrario de sustancias inorgánicas en las bacterias autótrofas.

La desnitrificación heterotrófica se ha aplicado en sistemas de recirculación y plantas de tratamiento de aguas residuales tradicionales, mientras que la desnitrificación autotrófica se ha notificado durante las dos últimas décadas. Los sustratos orgánicos necesarios para el crecimiento de bacterias heterótrofas no

siempre están presentes en el agua o lo están en muy bajas concentraciones, esto implica una dificultad para llevar a cabo la eliminación biológica de nitrógeno sobre todo si son aguas con alto contenido en nitratos, haciendo necesaria la adición de fuentes de carbono como metanol, etanol o ácido acético entre otros. Esto supone una solución a la limitación de carbono necesario, sin embargo, también existe cierta preocupación por la posible toxicidad y los excesos que permanecen en el agua. Además, se han desarrollado múltiples subproductos acumulados a partir de fuentes de carbono orgánico, lo que genera la adición de tratamientos posteriores para su eliminación y desinfección del agua (Ghafari et al., 2008).

Así pues, se establece en varios estudios la relación de C/N como un parámetro de operación en el proceso de desnitrificación: una baja relación de C/N conduce a una desnitrificación inadecuada, mientras que una elevada relación C/N produce la formación adicional de ácido nitroso en lugar de nitrógeno gaseoso. Se obtiene una máxima eficiencia de eliminación para una relación C/N de 2,58, correspondiente a 4,3 g de almidón soluble por 1 g de  $\text{NO}_3^-$  (Kim et al., 2002).

Por otra parte, la desnitrificación autótrofa utiliza sustratos de carbono inorgánico como fuente de alimento, y depende de donantes de electrones como hidrógeno o compuesto de azufre reducido para obtener energía.

La principal ventaja de usar bacterias heterótrofas radica en que su velocidad de crecimiento es mayor, por tanto, las bacterias autótrofas necesitan mayor tiempo espacial, incrementando los volúmenes de reacción y por tanto también los costes de operación (Vijay et al., 2019).

Se han desarrollado múltiples esquemas de tratamiento que combinan etapas aerobias/anóxicas, cuya estructura dependerá principalmente de las características del agua residual (tipo de compuestos nitrogenados, biodegradabilidad de la materia orgánica y relación de DQO/  $\text{N-NH}_4$ ), requisitos de vertido y caudal a tratar. Uno de los principales procesos en los que se utiliza la desnitrificación como método de eliminación de nitrógeno en el tratamiento de aguas residuales es el conocido como "Proceso Modificado Ludzack-Ettinger"

**Proceso Modificado Ludzack-Ettinger:** es un proceso biológico que aplica una modificación al proceso convencional de lodos activos, mediante una secuencia de operación anóxico-aerobia. El proceso consiste en un introducir una zona anóxica

previa a una zona aerobia en el reactor, en la cual, se recircula una corriente de agua rica en nitratos procedente del final del reactor. La zona anóxica mantiene las condiciones necesarias para que los microorganismos en ausencia de oxígeno rompan las moléculas de nitrato y así satisfagan sus necesidades de oxígeno, mientras el gas nitrógeno formado en el proceso se escapa a la atmósfera. La zona aerobia del reactor biológico mantiene una velocidad de aireación suficiente para convertir el nitrógeno amoniacal en nitrato. Posteriormente la mezcla pasa a un sedimentador que separa el efluente clarificado de los lodos, donde parte de la corriente de lodos activos se recircula a la zona anóxica para satisfacer las necesidades de los microorganismos, mientras otra parte se purga, figura 4 (Environmental Protection Agency, 1993).



**Figura 4.**Esquema del Proceso Modificado Ludzack Ettinger (Tomado de Rodríguez, 2016).

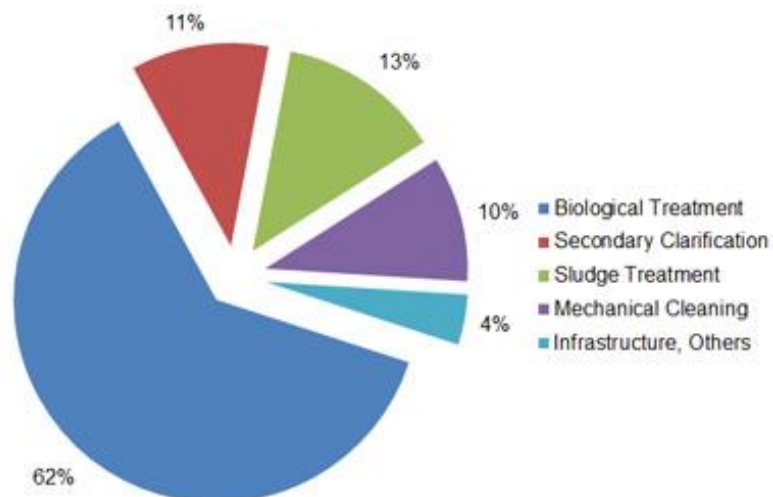
Este tratamiento consigue porcentajes de eliminación del 98% de nitratos, muy efectivo en comparación al resto de tratamientos, sin embargo, hay que tener en cuenta que genera una gran cantidad de lodos, los cuales deben ser sometidos a un tratamiento posterior, además de la necesidad de utilizar grandes equipos de aireación para satisfacer la necesidad de los microorganismos en la etapa aerobia, lo que supone un incremento en el coste total del tratamiento. (G. Liu & Wang, 2017)

A continuación, a modo de resumen se presenta en la Tabla 2, una descripción general de las ventajas y características comparativas de las diferentes tecnologías más utilizadas en la actualidad para la eliminación de nitratos en aguas residuales.

**Tabla 2.** Comparación de las distintas tecnologías para la eliminación de nitratos de aguas residuales. (Adaptado de Centi & Perathoner, 2003)

<b>Tecnología</b>	<b>Intercambio iónico</b>	<b>Ósmosis inversa</b>	<b>Desnitrificación biológica</b>	<b>Reducción catalítica</b>
Estado final del nitrato	Intercambiado y concentrado	Concentrado en desecho	Transformado a N <sub>2</sub>	Transformado a N <sub>2</sub>
Residuo	Salmuera	Salmuera	Lodos bacterianos	Ninguno
Aditivos químicos	NaCl	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + base	EtOH+H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>
% Eficiencia en la purificación de agua	85-98	75-80	98	98-100
Flexibilidad en las variables de operación	Media	Media	Baja	Alta
Energía usada	Baja	Alta	Media	Alta
Requerimientos de espacio	Limitada	Limitada	Media	Alta
Movilidad	Si	Si	No	Si
Manejabilidad	Buena	Buena	Mala	Buena
Tipo de operación	Regeneraciones periódicas	Continuo	Continuo	Continuo
Sensibilidad a la desactivación	Media	Alta	Alta	Media
Control automático	Simple	Simple	Complejo	Simple
Tiempo de puesta en marcha	Inmediato	Inmediato	Más de 1 mes	Inmediata
Requerimiento de monitorización	Bajo	Bajo	Intensivo	Medio
Selectividad del proceso	Baja	Baja	Alta	Alta
Olores	No	No	Si	No
Ruido	Alguno	Alto	Ninguno	Ninguno
Coste indicativo (€/m <sup>3</sup> )	0,15-0,25	0,4-0,6	0,2-0,3	0,25-0,55

El tratamiento biológico es un proceso esencial en la gran mayoría de las EDAR y representa la mayor fracción de los costes de energía de la planta, como se observa en la Figura 4, abarca más del 60 % de los gastos de energía. Es un tratamiento condicionado principalmente por su etapa de aireación y debido a las entradas variables de las aguas residuales, la adición de oxígeno es un proceso que se debe controlar y ajustar con retroalimentaciones de las mediciones en línea, por lo que es necesario tener un sistema de aireación eficiente y marcar estrategias de control del proceso (Gandiglio et al., 2017).



**Figura 5.** Eficiencia energética en una EDAR (Tomado de [www.rmu.es](http://www.rmu.es)).

Además, la generación de lodos activos supone un aumento en los residuos a tratar. Numerosos estudios revelan que la cantidad de lodos generados aumentó en un 5% anualmente durante la década 1990, lo que incrementó la dificultad y los gastos para reducir su volumen. Surgió así la necesidad de modificar el proceso convencional de lodos activos mediante un sistema que recircula una parte de los lodos con previo tratamiento de ozonización, esto facilita la degradación biológica ya que el ozono evita el crecimiento de las bacterias filamentosas, aumentando así el volumen de lodos y mejorando su sedimentación. Esta modificación supuso un ahorro del 47% de los costes de operación frente al tratamiento convencional (Yasui et al., 1996).

El proceso de nitrificación-desnitrificación biológica conlleva una eliminación efectiva de nitrógeno, sin embargo, genera problemas por su elevado consumo de energía, generación de grandes cantidades de lodo y necesidad de un aporte de carbono orgánico externo. Un proceso alternativo que contrarresta estos inconvenientes es el denominado proceso annamox.

### **Proceso Annamox**

Desarrollado en la década de 1990, es un proceso bioquímico que describe la oxidación anaeróbica de amoníaco ( $\text{NH}_4^+$ ), llevado a cabo por bacterias autótrofas *anammox* (AnAOB) capaces de oxidar  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{N}_2$ , utilizando  $\text{NO}_2^-$  como aceptor de

electrones bajo condiciones anaeróbicas. Dado que AnAOB requieren de  $\text{NO}_2^-$  como receptor de electrones y las aguas residuales contienen principalmente el nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4^+$ , es necesario combinar este proceso con un paso previo de nitrificación parcial (PN). El proceso PN-anammox reduce la demanda de oxígeno aproximadamente en un 60 %, sin agregar carbono orgánico y produce baja cantidades de lodo en contraste con el proceso biológico convencional (Chen et al., 2020).

Este proceso supuso una evolución en el ciclo biológico del nitrógeno, que no había considerado antes la oxidación del amoníaco en condiciones anóxicas y además resultó muy atractivo para el tratamiento de aguas residuales, en particular aquellas con elevadas concentraciones de nitrógeno y una deficiencia en carbono orgánico. La disminución de los costes operativos en un 60% constituye una de las ventajas más significativas de este proceso, sin embargo, su implementación sigue siendo difícil debido a ciertas limitaciones como son: la elevada temperatura óptima, su lenta tasa de crecimiento y alta sensibilidad a los cambios de pH o temperatura, dificultando así su mantenimiento en los biorreactores (Tomaszewski et al., 2017).

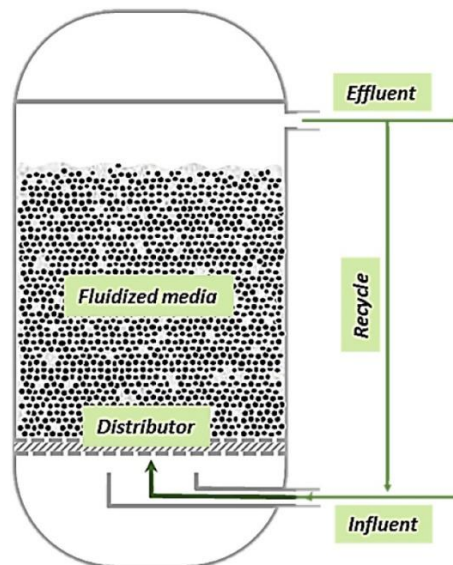
Tanto la desnitrificación de lodos activos, como el proceso anammox son procesos biológicos que operan la biomasa en forma suspendida alcanzando elevadas tasas de eliminación del nitrógeno, sin embargo, también presentan numerosos inconvenientes, por lo que se están estudiando tecnologías alternativas como la aplicación de reactores de lecho fluidizados.

### **1.5 Reactores de lecho fluidizado (FBR) para la eliminación de nitratos**

Los reactores de lecho fluidizado FBR (Fluidized bed bioreactors, siglas en inglés) se caracterizan por incorporar una mezcla bifásica sólido-líquido, en la cual las partículas sólidas, también llamadas portador, se suspenden usando elevadas tasas de flujo líquido o gas que permiten que el portador se fluidice y se comporte como si fuera un fluido. Las partículas utilizadas para el lecho tienen un tamaño uniforme y suele ser arcilla expandida, carbón activo, antracita, arena o perlas de plástico (Özkaya et al., 2019).

Esta tecnología impulsa las aguas residuales en sentido ascendente a través un lecho sólido a elevada velocidad para provocar la fluidización de esas partículas

dentro del reactor. De esta manera, se forma un crecimiento intenso de los microorganismos en el interior del sistema, sin que sean arrastrados por la corriente de agua. El distribuidor (separador, si hay aire) se emplea para repartir uniformemente el efluente a través del lecho del reactor. En función del tipo de sistema, se puede o no incluir la recirculación de una parte del efluente (Bello et al., 2017).



**Figura 6.** Esquema de FBR en la aplicación de aguas residuales (Tomado de Bello et al., 2017).

El elevado rendimiento de los FBR para la eliminación de nitratos se debe principalmente a los siguientes factores:

- 1- Ofrecen una mayor productividad en comparación a los reactores de tanque agitado, ya que la fluidización del líquido lo aproxima a un comportamiento de un reactor de flujo pistón.
- 2- Debido a la inmovilización de las células en la superficie de las partículas sólidas, el área disponible para la fijación de la biomasa es muy grande y por tanto el sistema permite asimilar elevadas tasas de carga de sustrato para enriquecer la biomasa de crecimiento lento.
- 3- Se logra un contacto íntimo entre la fase líquida y la sólida como resultado de la fluidización.
- 4- El tiempo de residencia hidráulico es mucho más corto para el mismo volumen en comparación con los procesos convencionales como los procesos de lodos activos
- 5- La expansión del lecho para acomodar las células producidas evita los

problemas de obstrucción que se dan a menudo en un reactor de lecho empaquetado.

- 6- Dado que el tamaño de las partículas sólidas utilizadas es menor que el de un lecho empaquetado, el volumen de la mezcla de reacción es mayor que en otros reactores biológicos. (Lakshmi, 2010)

Los FBR son de gran interés para la eliminación de nitratos en aguas residuales, la desnitrificación realizada en un FBR es capaz de operar con una concentración de nitratos elevada de hasta 1000 mg N/L con una eficacia de eliminación muy alta, hasta 99,8 % y baja producción de lodo. Las tasas de desnitrificación están condicionadas principalmente por la velocidad superficial aplicada, consiguiendo mayores tasas con velocidades superficiales más bajas, manteniendo siempre una velocidad mínima que permita fluidizar las partículas del lecho y el funcionamiento del proceso (Fahid & Dahab, 2004).

Con el objetivo de mejorar su rendimiento los FBR se han utilizado junto con la electroquímica microbiana.

### **Electroquímica microbiana**

La electroquímica microbiana estudia la capacidad de ciertos microorganismos para intercambiar electrones con un material conductor, como electrodos físicos (hechos de metal, grafito, sólidos granulares, etc..) o de carácter natural como los óxidos metálicos (Schröder et al., 2015). Los microorganismos capaces de transferir electrones fuera de la célula tienen un papel fundamental en la naturaleza, estando presentes en el ciclo de carbono, la oxidación o reducción de metales, eliminación de residuos orgánicos y la descomposición de compuestos aromáticos entre otros (Varanasi & Das, 2017).

El desarrollo de tecnología en esta área, denominada “tecnología electroquímica microbiana” (MET, Microbial Electrochemical Technology por sus siglas en inglés), implica que el metabolismo microbiano está deliberadamente vinculado a un donante o receptor de electrones en estado sólido, que puede ser una partícula mineral o un electrodo (X. Wang et al., 2020). Esta tecnología se ha estudiado e investigado con intensidad en la última década, en un campo multidisciplinario que integra microbiología, electroquímica, ciencias de los materiales, ingeniería y



muchas otras áreas relacionadas (H. Wang & Ren, 2013).

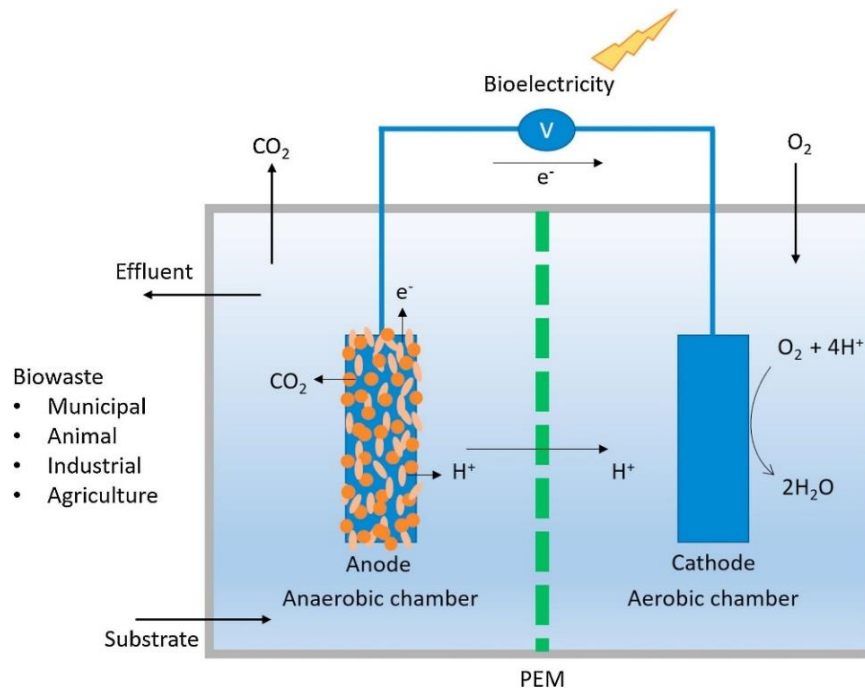
Se puede establecer una clasificación de los diferentes sistemas en función del modo de operación del sistema electroquímico y de sus aplicaciones.

### **Pilas de combustible microbiana (MFC)**

El primero de estos sistemas lo demostró Mc Potter en 1911, generando un voltaje máximo de 0,3-0,5 V en un sistema que utilizaba glucosa como sustrato y un electrodo de Pt, con la implicación de microorganismos de la familia de *S. cerevisiae*. A lo largo de estos años la investigación de los MFC ha continuado avanzando con el objetivo de aprovechar la oxidación de la materia orgánica para producir energía eléctrica, proporcionando un gran alcance hacia la energía alternativa (Ramanjaneyulu Golla, 2019).

Los MFC son sistemas que utilizan microorganismos electroactivos como catalizadores para oxidar sustratos, como ácidos orgánicos o hidrocarburos, utilizando el ánodo como aceptor de electrones a través de diversos metabolismos. Los electrones fluyen desde el ánodo al cátodo donde, en presencia de un catalizador adecuado, se reducen los aceptores de electrones de mayor potencial. Dado que este sistema implica una diferencia de potencial positiva, se genera energía eléctrica neta (Logan et al., 2006).

El sistema está formado por dos compartimentos (ánodo y cátodo) separados por una membrana selectiva de iones, a través de la cual fluyen los protones de la cámara anódica hacia el cátodo por un gradiente de concentración. La reacción de reducción en el cátodo puede ser llevada a cabo por distintos compuestos, destaca la utilización de O<sub>2</sub> como aceptor de electrones, cuya forma reducida se combina con los protones para formar moléculas de agua en la cámara aeróbica del cátodo (Tejedor-Sanz, 2016). (Figura 7)



**Figura 7.** Pila de combustible microbiana MFC (Tomado de Bhatia et al., 2018).

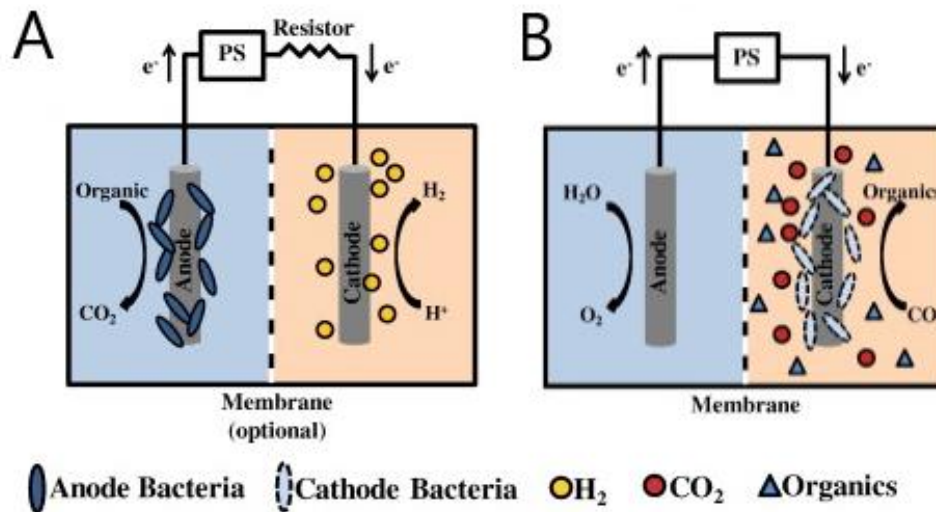
Como se observa en la figura 6, el sistema MFC está formado por un bioánodo (puesto que los microorganismos están en el) y se utiliza como sustrato diferentes residuos orgánicos de distintos orígenes, animal, industrial, agrícola o municipal (Bhatia et al., 2018).

### **Células de electrólisis microbiana (MEC)**

Al contrario de los MFC, los MEC se han desarrollado mucho más tarde. En el 2005, dos grupos de investigadores de universidades en los Países Bajos desarrollaron un sistema MEC capaz de producir hidrógeno a partir de materia orgánica, con un gasto energético relativamente bajo (0,2-0,8V) en comparación con el sistema típico de electrólisis del agua (1,23-1,8 V) (Kadier et al., 2016).

El sistema MEC presenta un esquema similar al MFC, pero incorpora una fuente de energía externa adicional para producir en el cátodo una especie que no sería factible de formar espontáneamente por restricciones termodinámicas o cinéticas. Como por ejemplo la reducción de agua a hidrógeno (electrólisis del agua), dióxido de carbono  $\text{CO}_2$  a metano  $\text{CH}_4$ , o  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ . En la mayoría de estos casos, se necesita agregar una pequeña cantidad de energía eléctrica (0,5-1.0 V) al circuito para impulsar las reacciones catódicas energéticamente desfavorables y /o superar los potenciales de reacción excesivos (X. Wang et al., 2020).

En un MEC, la producción de hidrógeno en el cátodo surge por la combinación de los electrones procedentes del bioánodo y los protones libres en la solución, figura 8.a, al contrario que en el MFC la cámara catódica opera en condiciones anaeróbicas para potenciar la formación de H<sub>2</sub> (Kadier et al., 2016).



**Figura 8.** (a) Generación de hidrógeno con fuente de alimentación externa en células de electrólisis microbiana (MEC); (b) Producción química por electrosíntesis microbiana (MES) (Modificado de H. Wang & Ren, 2013).

### **Células de electrosíntesis microbiana (MES)**

La electrosíntesis microbiana utiliza microorganismos como biocatalizadores para aceptar electrones del sustrato catódico (biocátodo). Estos microorganismos permiten la conversión de la corriente eléctrica en varios productos de valor agregado como acetato, etanol, butirato, a partir de la reducción de CO<sub>2</sub> (Bajracharya et al., 2016), figura 8.b.

Si bien se han realizado numerosas investigaciones sobre los mecanismos de transferencia de electrones en los MFC de bioánodo, se dispone de información limitada sobre los mecanismos de transferencia de electrones en los MFC de biocátodos. Se han establecido dos mecanismos principales: de contacto directo que requiere un contacto físico entre la membrana de la célula bacteriana y la superficie del electrodo, o de contacto indirecto mediante una sustancia intermediaria que excretan los microorganismos (Huang et al., 2011).

### **Otros sistemas electroquímicos**

La aplicación de los MET se ha implementado también en otros campos de estudio

como: la remediación de contaminantes del agua subterránea o suelo con células de remediación microbiana (MRC), la generación de compuestos orgánicos (hidrógeno, metano, etanol, etc...) a través de la fotosíntesis en las células solares microbianas (MSC) y la desalinización de agua a partir de células de desalinización microbiana (MDC). Este último ha despertado gran interés ya que aprovecha el potencial generado a través del ánodo y cátodo para impulsar la desalinización in situ, logrando un 90 % de eliminación de sales a la vez que se producen cantidades útiles de energía (Cao et al., 2009).

### **1.5.1 Aplicación de MET en el tratamiento de aguas residuales y en la reducción de nitratos**

Los MET se han investigado como un prometedor proceso de tratamiento de aguas residuales para la generación simultánea de bioenergía y la eliminación mejorada de la contaminación orgánica y de nutrientes de las aguas residuales (Dong et al., 2019). Entre los desarrollos emergentes de esta área, los MFC son una tecnología de gran interés puesto que utilizan una gran variedad de compuestos orgánicos simples (acetato, glucosa, celulosa, almidón), o compuestos orgánicos más complejos presentes en las aguas residuales urbanas e industriales (cerveceras, textiles, alimentación, papel) (Pant et al., 2010) como donantes de electrones para los microorganismos que usan el ánodo como aceptor terminal de electrones generando electricidad (Ge et al., 2013).

De manera similar se han investigado la reducción de sustratos como sulfatos, nitratos, fosfatos, CO<sub>2</sub> en la cámara catódica mediante el uso de microorganismos electroactivos como aceptores de los electrones procedentes del cátodo (Zhang et al., 2014).

El proceso de desnitrificación en MET a diferencia del proceso convencional de lodos activos que se basa en bacterias nitrificantes heterótrofas, se lleva a cabo mediante bacterias desnitrificantes autótrofas que son capaces de aceptar electrones de un donante sólido (ej. electrodo catódico). La transferencia de estos electrones hace posible usar el nitrato como un aceptor terminal en los MFC generando un potencial eléctrico positivo de 0,98 V usando como compuestos orgánicos (acetato) como donadores de electrones (Kelly & He, 2014).

La configuración de los reactores bioelectroquímicos para la desnitrificación han adoptado numerosas variaciones, como el uso de una sola cámara MFC con

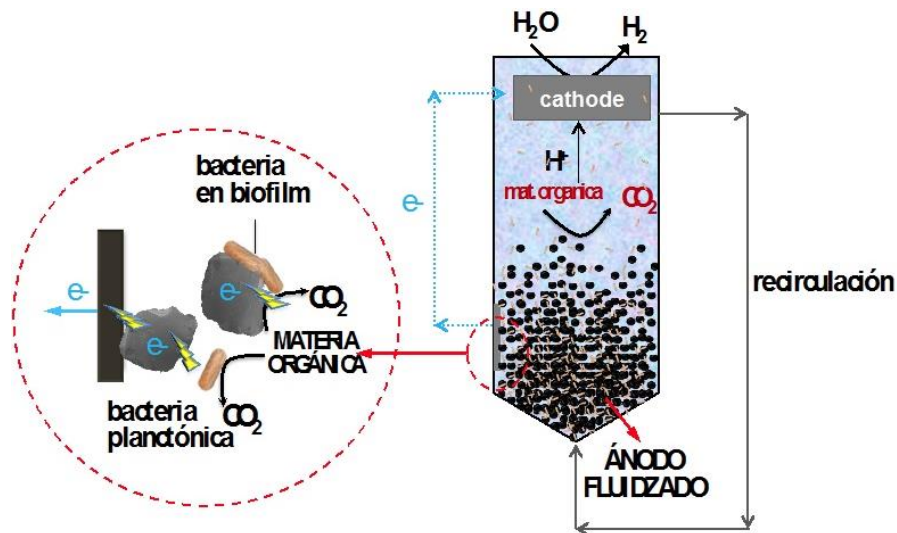
biopelícula nitrificante enriquecida en el cátodo con corrientes de aire, también el uso de dos cámaras para eliminar nitrógeno mediante bacterias nitrificantes-desnitrificantes con un cátodo aireado intermitentemente (Zhu et al., 2017).

La ventaja de un MFC desnitrificante es que no solo oxida los compuestos orgánicos de las aguas residuales, sino que también de manera integrada y sostenible, elimina el nitrógeno en el cátodo. Si bien su tasa de desnitrificación es más baja que la de un proceso convencional, a diferencia de este último contempla la recuperación de energía del sustrato. Es un proceso que resulta fácil de monitorear ya que la producción anual y el potencial del electrodo catódico proporcionan un estado detallado de la actividad microbiana, permitiendo controlar dicho proceso (Clauwaert et al., 2007).

### **Reactores de lecho fluidizado electroquímicos microbianos**

Los MFC hasta ahora desarrollados son principalmente reactores de biopelícula fija, donde la biopelícula está en contacto constante con el ánodo y el colector de corriente. Se ha demostrado un rendimiento mejorado con la utilización de partículas fluidizadas en el ánodo aportando mayor densidad de corriente, potenciales más elevados y mayor eficacia que un lecho empaquetado (J. Liu et al., 2014).

El reemplazo de un electrodo estático por un electrodo fluidizado hecho de micropartículas de carbono como parte de un reactor fluidizado electroquímico microbiano (ME-FBR), pone solución a la limitación de transferencia de masa entre la solución y los microorganismos activos, la baja superficie del electrodo y caída del pH en el sistema. El ME-FBR es un reactor de cámara única, relativamente fácil de operar cuya configuración incluye un electrodo 3D que confiere un área de superficie alta a los microorganismos electroactivos. Su aplicación se ha estudiado en el tratamiento de aguas residuales de industria cervecera, mediante la utilización de un ME-FBR de ánodo fluidizado con partículas de carbón activo, figura 9 que oxidó la materia orgánica soluble del agua residual. Se obtuvo una reducción del 87% de materia orgánica, una eliminación del 63% de los sulfatos y una reducción en la concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en el efluente final (Tejedor-Sanz et al., 2017) .



**Figura 9.** Esquema de un ME-FBR de ánodo fluidizado para la degradación bioelectroquímica de la materia orgánica de aguas residuales (Tomado de Tejedor-Sanz, 2017).

## 2. OBEJTIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la reducción de nitratos en un reactor de lecho fluidizado bioelectroquímico microbiano cuyo lecho actúe como cátodo y la utilización de distintos compuestos como fuente de carbono.

Para conseguir este objetivo, se han llevado a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Diseño, construcción y operación de un reactor fluidizado electroquímico microbiano (ME-FBR) de una cámara para albergar el lecho y garantizar las condiciones anaerobias.
- Caracterización y optimización de las partículas del lecho para conseguir una polarización y fluidización adecuadas teniendo en cuenta el tamaño, la cantidad y la composición de estas.
- Estudio de distintos materiales para utilizarlos en el ME-FBR como electrodos contra funcionando dentro del sistema como ánodo.
- Caracterización del sistema mediante técnicas electroquímicas.
- Estudio de compuestos de carbono como fuente dentro del reactor como el más favorable para el correcto funcionamiento del sistema.
- Enriquecimiento de organismos reductores de nitratos presentes en el reactor biológico de una EDAR para inocularlos, posteriormente, en el reactor.

- Estudio de la viabilidad de reducción de nitratos en el electrodo de trabajo, actuando como cátodo, como prueba de concepto.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental consiste en primer lugar en optimizar el medio mínimo basal utilizado para nuestro cultivo, mediante el estudio de la fuente de carbono y la evolución de reducción de nitrato con el tiempo. Posteriormente se caracterizan los reactores utilizados mediante pruebas de fluidización con partículas de carbón y el montaje del sistema electroquímico. Por último, se realizan medidas electroquímicas de cada reactor utilizando el medio como solución de electrolito.

#### 3.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

El cultivo se realiza en modo discontinuo, utilizando como biomasa una muestra de fango rico en bacterias nitrificantes y desnitrificantes, procedente del reactor biológico de la depuradora de aguas de la fábrica de Mahou San Miguel, localizada en Alovera (Guadalajara).

El medio mínimo basal para el cultivo en todos los experimentos se prepara en el laboratorio siguiendo las composiciones de la tabla 3.

**Tabla 3.** Composición de medio mínimo basal de 1 L.

Compuesto	Medio mínimo basal
NaHCO <sub>3</sub>	2,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,24 g
KCl	0,1 g
KNO <sub>3</sub>	0,3 g
Vitaminas y minerales	10 ml

*Preparación inicial del inóculo del cultivo.*

- Se prepara medio mínimo basal en un matraz aforado de 2 L y se reparte el medio en 3 botellas de 500 mL. Se adiciona a cada una de ellas una fuente de carbono distinta, con una concentración 50 mM.
  - Acetato de sodio C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>

- Formiato de sodio HCOONa
  - Ácido butírico C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>.
- ii) A partir de cada una de las botellas anteriores se preparan 6 botes pequeños (figura 10) de 50 mL con medio y se burbujearon con N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (90:10 en volumen) durante 15 min la parte líquida y 10 min el espacio gaseoso. El burbujeo se aplica para fomentar el desarrollo de los microorganismos anaerobios, fomentando que empleen H<sub>2</sub> como donador de electrones y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor. Tras el burbujeo, los botes se cierran herméticamente con septum de butilo y tapón de aluminio. Después, se autoclavan (20 min a 120 °C) para mantener las condiciones de esterilidad.
- iii) A continuación, se realiza el inóculo, con la adición de 5 mL de fango en uno de los botes de medio, mediante la utilización de una jeringuilla y aguja por la que previamente se hace pasar por una corriente de N<sub>2</sub> para eliminar toda traza de O<sub>2</sub> y mantener un ambiente anóxico dentro del cultivo. Los botes de inóculos se mantienen en un cuarto caliente, con una temperatura de 30 °C sobre un agitador magnético.



**Figura 10.** Bote pequeño donde se realizan los cultivos, sellado con septum de butilo.

Tras las primeras medidas de la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en los botes de inóculo en un intercambiador iónico, se elige acetato de sodio como la fuente de carbono en los siguientes pasos de la experimentación.



### **3.2. Sistema electroquímico microbiano**

Se realiza el montaje de tres reactores con diferentes configuraciones, para estudiar el uso de diferentes electrodos y la influencia de la polarización en el sistema ME-FBR.

#### **3.2.1. Reactor de lecho fluidizado electroquímico microbiano**

El cuerpo del reactor en los tres sistemas presenta la misma estructura principal, formado por una columna de vidrio (3 cm de diámetro interior y 30 cm de longitud) y por una placa de vidrio porosa (diámetro de poro 2) situada en la parte inferior, que divide la columna en dos zonas. La placa soporta las partículas de carbón vítreo (0,7 mm) y actúa como distribuidor, a través del cual se fuerza la fluidización del lecho hacia arriba, mediante la recirculación de gas o del propio fluido.

En la zona superior por encima de la placa se sitúa la cámara principal donde se encuentra el lecho fluidizado actuando como cátodo y tiene lugar la reducción de nitratos. El reactor presenta 6 tomas distribuidas al largo de la columna de la siguiente forma:

- Dos tomas (2 mm diámetro) situadas en la parte inferior por debajo de la placa cerámica y enfrentadas entre sí, a las que se conecta una manguera que conduce la recirculación de gas o líquido para forzar la fluidización del lecho.
- Una toma (15 mm) inclinada hacia arriba, situada en la parte inferior izquierda de la cámara principal, en la cual se introduce el electrodo de referencia o bien un tapón para mantener sellada la cámara.
- Una toma (3 mm) en la parte superior izquierda de la cámara principal, a la que se conecta una llave de paso de 3 vías, por la cual se extrae muestra del sistema, efluente.
- Las dos tomas restantes (3 mm) se encuentran en la parte derecha de la cámara principal. Se utiliza la toma superior para conectar la manguera de recirculación (Masterflex norprene), mientras que la toma inferior se mantiene cerrada con una llave de paso de 3 vías.

Para mantener un ambiente anóxico se sella la parte superior del reactor con un tapón de silicona.

Se utiliza una bomba peristáltica (Heidolph 5001) acoplada con 3 rotores con una

capacidad de giro de 0-600 rpm. La calibración de la bomba se lleva a cabo mediante el bombeo de agua en una probeta a una velocidad fija y midiendo el volumen de agua recogido en un tiempo cronometrado. Se obtiene un caudal de  $4,5 \cdot 10^{-3} L/s$  con una velocidad de giro de 50 rpm. La bomba está conectada a unas tuberías de goma de conectadas al reactor para llevar a cabo la recirculación desde la zona superior a la zona más inferior por debajo de la placa porosa.

### 3.2.2. Sistema de tres electrodos

Para estudiar el potencial aplicado en el reactor, se opera con un sistema compuesto por tres electrodos:

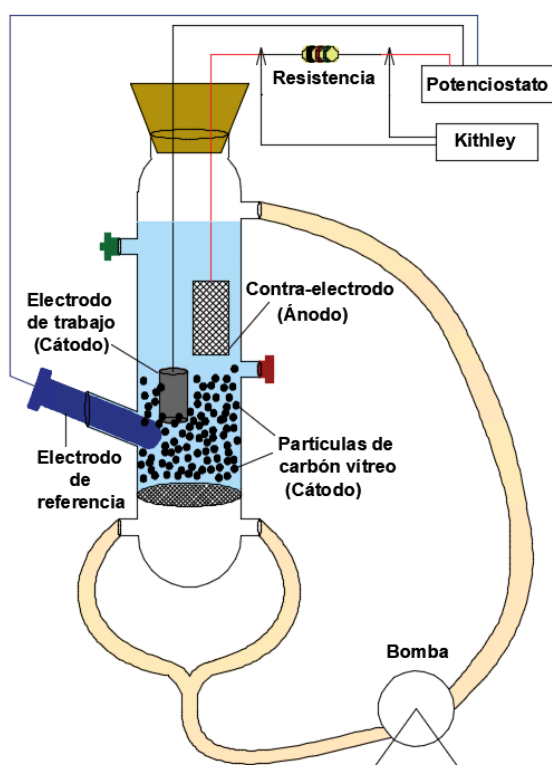
- Electrodo de referencia: es un electrodo de potencial conocido y constante al paso de la corriente, que permite medir y controlar el potencial aplicado al reactor durante el proceso estudiado. En este caso se utiliza un electrodo de vidrio de Ag /AgCl 3 M HANNA.
- Electrodo de trabajo: es aquel que aplica el potencial deseado de manera controlada, facilitando la transferencia de electrones desde o hacia el lecho fluidizado. Se utilizan como electrodos de trabajo: una barra de grafito, también llamada “grafito rod” (por su nombre en inglés) con uniones de oro, y una placa de papel grafito (2,5 cm x 5 cm y 0,1 mm de espesor).
- Electrodo auxiliar o contraelectrodo: mide la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia, de tal forma que la corriente que circula a través de él equilibra el sistema. El material de este electrodo debe ser inerte con la solución del electrolito para evitar cualquier interferencia con el proceso de electrolisis (Flores B., 1995). Se utiliza como contraelectrodo una varilla de titanio platinizado (Electrodo Ti/Pt malla 10x5 de 25x40mm más 1TC Ti Ø2,5x80mm)

Las características de los tres sistemas estudiados se recogen en la tabla 4.

**Tabla 4.** Características y materiales utilizados en los tres reactores de estudio.

Nombre	Reactor Rod	Reactor Papel	Reactor Control
Ambiente	Anaerobio	Anaerobio	Anaerobio
Polarizado	Sí	Sí	No
Electrodo de trabajo (ánodo)	Grafito rod con unión de oro (4 cm de longitud)	Placa de grafito (2,5 cm x 5 cm y 0,1 mm espesor)	Grafito rod con unión de oro (4 cm de longitud) + Placa de grafito (2,5 x 5cm y 0,1 mm de espesor)
Contraelectrodo	Varilla fina de titanio platinizado con malla	Varilla fina de titanio platinizado con malla	Varilla fina de titanio platinizado con malla
Electrodo de referencia	Electrodo de Ag/AgCl (Hanna)	Electrodo de Ag/AgCl (Hanna)	No

Se realiza el estudio electroquímico de estos sistemas utilizando un Kithley que conecta los tres electrodos (figura 11), para mantener un potencial constante en el electrodo de trabajo (cátodo) con respecto al de referencia y ajustando la corriente en el contraelectrodo.



**Figura 11.** Esquema del Reactor utilizando como electrodo de trabajo el rod de grafito.

Como se ilustra en la figura 11, los tres electrodos deben sumergirse en la solución del electrolito por completo, manteniendo una separación entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo para evitar posibles cortocircuitos.

Para realizar las conexiones de la placa de grafito con el cable del potenciostato, se acopla uno de los extremos de la placa al cable mediante un pegamento epoxi UV. La conexión de los electrodos rod se lleva a cabo mediante la unión de partículas de oro en su extremo que fijan el cable conectado al potenciostato. Posteriormente los cables del electrodo de trabajo y contraelectrodo se traspasan por el tapón de silicona superior del reactor (Figura 11), y una vez sumergidos ambos electrodos en la solución se realiza la conexión con el potenciostato.

Además, se acopla una resistencia (1 Kohm) en el cable de salida del contraelectrodo para medir la intensidad que circulaba por ella conectando sus extremos a un equipo Kithley.

### **3.3. Métodos analíticos**

Para el seguimiento del proceso se determinan las concentraciones en los botes de cultivo de los iones (nitrato y nitrito) por cromatografía iónica y del acetato por cromatografía líquida a lo largo de un tiempo determinado.

#### **Cromatografía de intercambio iónico**

Las concentraciones de nitrato y nitrito se determinaron con un cromatógrafo de intercambio iónico Metrohm 930 Compact Ion Chromatograph Flex.

#### **Cromatografía líquida de alta resolución**

Para determinar la concentración de acetato presente en el cultivo se utiliza un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) de la serie HP 1100 acoplado a un detector UV con una longitud de onda de 210 nm. El compuesto circula por la columna cromatográfica (Supelco C-610H) a través de la fase estacionaria, utilizando como fase móvil  $H_3PO_4$  0,1 % con un caudal de 0,5 mL/min para separar los componentes de la muestra.

### **3.4. Medidas electroquímicas**

Se realiza el estudio del sistema electroquímico en cada reactor, mediante un potenciostato conectado a un ordenador y controlado por un software específico. Como técnicas electroquímicas se aplican la cronoamperometría y la voltamperometría cíclica.

### **Cronoamperometría**

La cronoamperometría es una técnica amperométrica simple, y una de las más utilizadas. Su funcionamiento es simple, se basa en aplicar un potencial de pulso a un electrodo de trabajo y medir la corriente que pasa a través de la célula frente al tiempo (Rezaei & Irannejad, 2019) . Su aplicación permite medir la dependencia del tiempo actual para el proceso de difusión controlada que se produce en el electrodo.

### **Voltamperometría cíclica**

La voltamperometría también llamada voltametría cíclica es una técnica electroquímica que se usa con gran frecuencia porque aporta una gran cantidad de información experimental y conocimientos sobre los detalles cinéticos y termodinámicos del sistema químico estudiado. Se basa en aplicar un barrido de potencial al electrodo de trabajo de manera cíclica desde un valor máximo a un mínimo a una velocidad determinada (Marken et al., 2010). En este proyecto se aplican potenciales máximos y mínimos de 0,3 a -0,9 V y de 1 a -1 V con una velocidad de 0,005 V/s.

## **3.5. Procedimiento experimental**

### *Enriquecimiento de los microorganismos nitrificantes y desnitrificantes*

Se lleva a cabo el enriquecimiento de microorganismos mediante la preparación de inóculos sucesivos, inyectando 5 mL de cultivos anteriores en los botes anaerobios con medio fresco. Posteriormente se etiquetan con la nueva fecha y se guardan de nuevo en el cuarto caliente sobre el agitador.

### *Recogida de muestras*

Las muestras se toman de los botes de cultivo con una jeringuilla y aguja en las que el O<sub>2</sub> se elimina previamente con un flujo continuo de N<sub>2</sub> gas para mantener un ambiente anóxico. Parte de la muestra (2 mL) se filtra en un eppendorf para la cromatografía de intercambio iónico utilizando un filtro de jeringa de naylon de 0,45 µm. Otra pequeña parte de la muestra (1,5 mL) se filtra en un vial ámbar de cromatografía HPLC con un filtro de 0,2 µm. Todas las muestras se guardan en un congelador para evitar la activación y desarrollo de los microorganismos.

### *Sustitución del tampón utilizado en el medio mínimo basal*

Se realiza un estudio de sustitución del tampón carbonato (NaHCO<sub>3</sub>) de la tabla 3,

por 6 g de tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) para la preparación de 1 L de medio mínimo basal. La realización del inóculo tiene lugar dentro de una cámara anaerobia, para mantener las condiciones anóxicas, se abren dos botes de cultivos con medio carbonatado y se vacía su contenido en tubos de 50 mL, posteriormente se centrifugan durante 10 min. Una vez separado el pellet del sobrenadante, se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 50 mL de medio fresco fosfatado, se sellan de nuevo los botes inoculados y se guardan en el cuarto caliente.

#### *Montaje y puesta en marcha del ME-FBR*

En primer lugar, se realizan ensayos de fluidización con partículas de carbón vítreo de dos tamaños diferentes: 0,4 y 0,7 mm de diámetro. Se eligen las partículas de 0,7 mm porque su comportamiento es mejor al fluidizar con una corriente de gas. Posteriormente, se rellena cada reactor con 120 mL de medio fresco y se sellan completamente todas sus tomas para evitar la entrada de aire. A continuación, se fluidiza cada reactor con una corriente continua de  $\text{N}_2(\text{g})$  durante 30 min con el objetivo de crear un ambiente anóxico en su interior. Una vez transcurrido ese tiempo, se elimina la corriente de  $\text{N}_2$  y se fluidiza con la recirculación del gas de la zona superior de la cámara principal mediante la bomba. Por último, se realizan las conexiones correspondientes y se polariza el reactor para llevar a cabo las medidas electroquímicas.

## **4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

### **4.1. Optimización del medio mínimo basal**

#### **Fuente de carbono**

Se realiza un análisis del medio inoculado con las tres fuentes de carbono, midiendo las muestras del día 0 (cuando se realiza el inóculo) y del día siguiente en el cromatógrafo iónico. Los resultados obtenidos de cromatografía iónica recogidos en la tabla 5 indican que la disminución de nitrato es mayor en el bote que contiene acetato de sodio, mientras que la reducción de nitratos con formiato se desarrolla de manera mucho más lenta y con butirato los resultados no son concluyentes para esclarecer la disminución de nitratos.

**Tabla 5.** Resultados de la concentración de nitrato y nitrito medidos en el cromatógrafo iónico para las tres fuentes de carbono

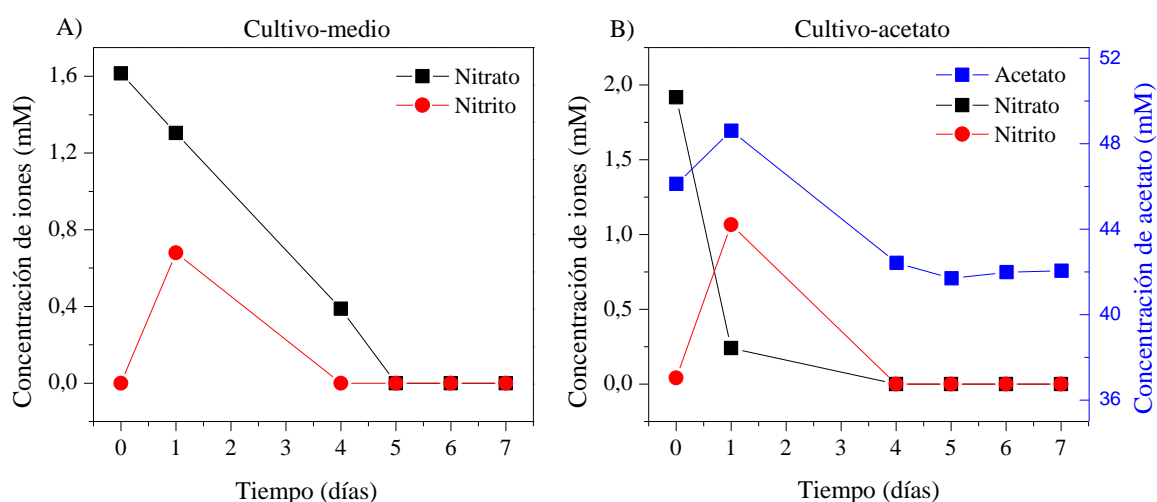
Fuente de carbono	Especie	Concentración (mM)	
		Día 0	Día 1
Formiato	Nitrato	1,40	0,81
	Nitrito	0,00	0,33
Acetato	Nitrato	1,60	0,19
	Nitrito	0,00	0,96
Butirato	Nitrato	1,13	1,34
	Nitrito	0,00	0,00

A partir de estas medidas se elige el acetato de sodio como fuente óptima de carbono para el crecimiento de cepas, está elección queda confirmada por la bibliografía (Ma et al., 2013), el cual analiza varios compuestos orgánicos, resultando el acetato el compuesto más eficiente para la desnitrificación.

### Evolución de la desnitrificación con el tiempo

Se realiza un seguimiento del proceso de desnitrificación en los botes de cultivo, mediante la toma de muestras en diferentes intervalos de tiempo.

En primer lugar, se compara la evolución del proceso con las tomas realizadas en un intervalo de tiempo de 7 días, tomando como día 0 el día en el que se realiza el inóculo del cultivo. Los datos medidos en el cromatógrafo iónico y HPLC se han representado en la figura 12.



**Figura 12.** a) Concentración de iones (nitrato y nitrito) en el cultivo con medio. b) Concentración de iones (nitrato y nitrito) y acetato en el cultivo con acetato

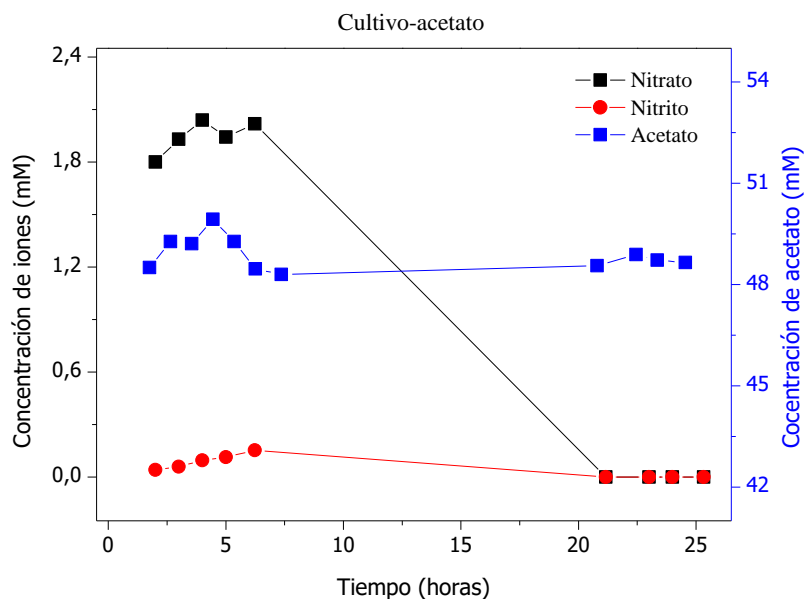
Como se observa en la figura 12, la concentración de nitrato decrece a medida que evoluciona el tiempo de cultivo en ambos botes, sin embargo, el nitrato en presencia de acetato en el tiempo de 24 horas disminuye a 0,25 mientras que sin presencia de acetato esta disminución tarda en alcanzarse aproximadamente 5 días. (figura 12 a y b). Esta disminución en 24 horas de nitrato en presencia de acetato como fuente de carbono, refleja que los microorganismos se han desarrollado y han utilizado el acetato además de fuente de carbono como donador de electrones y han reducido los nitratos presentes en el medio.

La concentración de nitrito evoluciona de la misma forma en ambas gráficas, figura 12, de manera creciente hasta el primer día, con un máximo de 0,67 mM en el cultivo con medio, figura 12.a y hasta 1,07 mM en el cultivo con acetato, figura 12.b. Su forma creciente indica que los microorganismos están reduciendo el nitrato, estado de oxidación +5, a nitrito, estado de oxidación +3, ambos solubles y detectables por el cromatógrafo iónico, hasta alcanzar un valor mínimo, a partir del cual la concentración de nitratos y nitritos no son detectados por la cromatografía, y que al haberse reducido formarán  $N_2$  (g). Tal y como se observa en la figura 12.a la concentración de nitrato y nitrito alcanza el cero el día 5 en el bote de cultivo con medio, mientras que en el bote con acetato lo hacen el día 4, esto indica que el proceso de desnitrificación es mucho más rápido cuando se añade una fuente de carbono adicional para el crecimiento de las cepas.

En cuanto al consumo de acetato, figura 12.b, se puede observar que apenas varía su concentración a lo largo de tiempo, manteniéndose constante en valores aproximados de 42 mM durante los últimos 4 días de estudio.

Los puntos representados en la figura 12, con un intervalo de tiempo de días, nos dan una idea de la forma en la que evoluciona cada especie. Para definir mejor su comportamiento se estudian nuevos inóculos de cultivos en el mismo medio anterior, en un intervalo de tiempo más reducido, 25 horas, representando sus resultados en la figura 13.





**Figura 13.** Concentración de los iones (nitrato y nitrito) y acetato en el cultivo con acetato durante 25 horas.

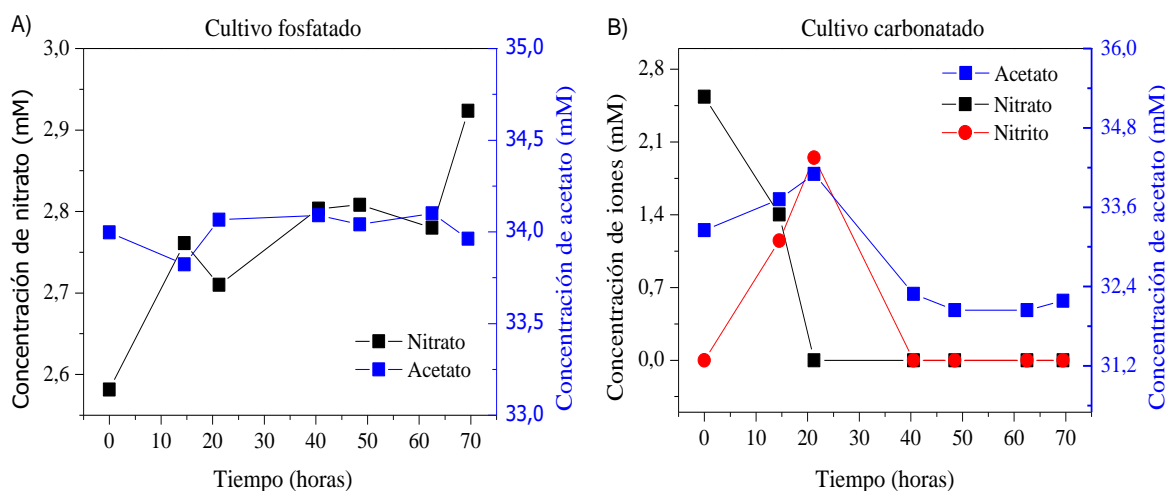
La evolución de la concentración de nitrato en la figura 13, muestra una forma constante durante las 7 primeras horas, alcanzando un valor de 2mM, seguido de un descenso hasta una concentración cero transcurridas 21 horas de estudio. Al igual que el nitrato, la concentración de nitrito mantiene su forma creciente hasta un valor de 0,15 mM durante las 7 primeras horas, y un lento descenso hasta reducir la cantidad de nitrito a cero a las 21 horas. Se puede observar una dependencia del crecimiento del nitrito con el nitrato, puesto que alcanzan sus máximos valores al mismo tiempo seguido de un descenso pronunciado hasta las 21 horas.

En cuanto a la concentración de acetato, se observa que hay una variación muy leve, casi nula durante todo el estudio manteniéndose entre valores de 48-50 mM.

### **Variación de la solución tampón utilizada en el medio mínimo basal**

La cantidad inicial de acetato añadida en los experimentos es 50 mM, al no observarse mucho consumo en las gráficas 12.b y 13, se cuestiona si los microorganismos utilizan el carbono proveniente del tampón carbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) para su crecimiento. Para solucionar esta cuestión se modifica la solución tampón utilizada en el medio mínimo basal, cambiando el carbonato por fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Se realiza el estudio inoculando ambos medios y recogiendo muestras en el mismo

intervalo de tiempo durante 70 horas (aproximadamente 3 días), sus resultados se representan en la figura 14.



**Figura 14.** a) Concentración de nitrato y acetato en el cultivo fosfatado. b) Concentración de iones (nitrato y nitrito) y acetato en el cultivo carbonatado.

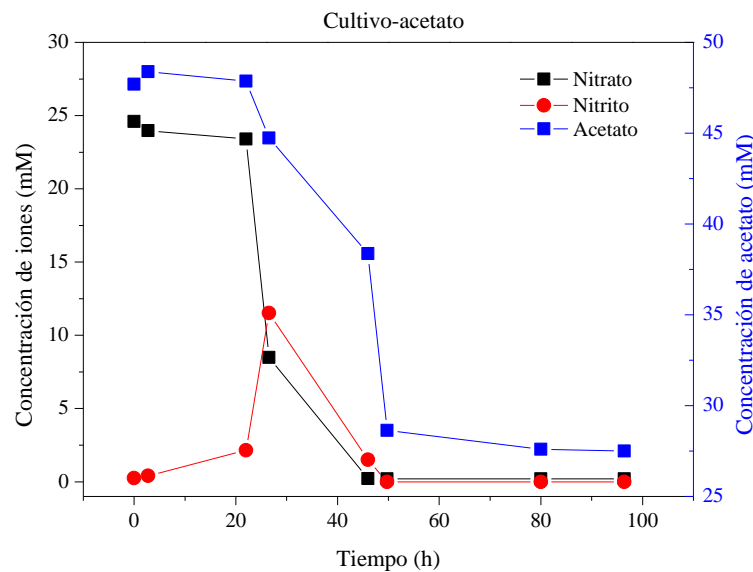
El cultivo en el medio fosfatado figura 14.a, no presenta una evolución del proceso de desnitrificación, puesto que no se detecta la formación de iones nitrito en ninguna muestra y la concentración de nitrato aumenta progresivamente tomando un valor máximo de 2,92 mM tras las 70 horas de estudio. Por otra parte, la concentración de acetato toma valores similares en ambos cultivos, reduciéndose hasta 32 mM en el cultivo carbonatado, figura 14.b y manteniéndose constante en valores de 34 mM en el cultivo fosfatado.

A partir de este estudio se descarta utilizar la solución de tampón fosfato para el medio mínimo basal, ya que no potencia el crecimiento de las cepas para el proceso de desnitrificación. Tal y como se muestra en la figura 14 el tampón carbonato proporciona las condiciones idóneas para la biomasa en estudio consiguiendo finalmente nuestro objetivo que es la reducción de los nitratos, aunque no logramos esclarecer qué papel tiene el acetato y el tampón carbonato en el desarrollo de la biomasa, para lo que se tendría que hacer estudios posteriores de identificación de microbiota y del estudio de su metabolismo.

### Variación de la concentración de $KNO_3$ suministrada en el medio

Para visualizar mejor el consumo de acetato en el cultivo, se incrementa diez veces la cantidad de nitrato potásico ( $KNO_3$ ) en el medio mínimo basal, añadiendo 3 gr/

L, lo que supone una concentración final de 30 mM. Los resultados se representan en la figura 15.



**Figura 15.** Concentración de iones (nitrato y nitrito) en el cultivo con acetato durante 96 horas (aproximadamente 4 días).

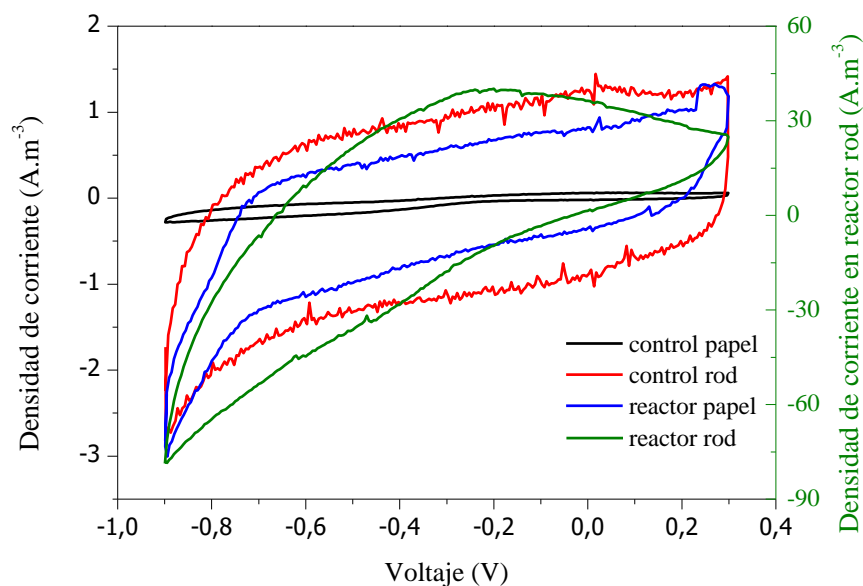
La evolución del consumo de acetato en la figura 15 muestra una disminución de su concentración frente al tiempo de cultivo, en el intervalo de 22- 52 h su pendiente negativa es muy pronunciada, disminuyendo su concentración desde 47 mM hasta 27,6 mM y manteniéndose prácticamente constante a partir de esta medida. Por otra parte, la reducción de nitrato parte con una concentración de 24,6 mM en las primeras medidas y se reduce por completo en 52 horas. Estas medidas confirman el consumo de acetato por parte de los microorganismos durante la etapa de desnitrificación, puesto que ambas especies se reducen de forma proporcional con la evolución del tiempo de cultivo.

Al aumentar la cantidad inicial de  $\text{KNO}_3$  en el medio, se observa un incremento de la cantidad de nitratos transformada a nitritos, alcanzando un pico máximo de concentración 11,5 mM en 26 horas, y reduciéndose por completo a  $\text{N}_2$  en 52 horas. La figura 15 muestra unos resultados satisfactorios del proceso de desnitrificación, desarrollando la máxima transformación de nitratos aproximadamente en la mitad del tiempo de operación del cultivo. Además, esclarece la relación del consumo de acetato en el proceso de desnitrificación como fuente de carbono, con una relación cercana 2:1 (consumo acetato /nitrato reducido).

## 4.2. Interacción de los microorganismos con el cátodo

La interacción de los microorganismos activos con el cátodo se estudia mediante la voltametría cíclica, aplicando al sistema un barrido de potencial definido. Los resultados obtenidos con esta técnica (voltamogramas) representan la densidad de corriente frente al potencial aplicado.

La figura 16 recoge los resultados para unos potenciales máximos y mínimos de 0,3V a -0,9 V respectivamente, antes de realizar el inóculo en los reactores (abiótico).



**Figura 16.** Representación de las voltametrías cíclicas en los tres sistemas de estudio: reactor rod (verde), reactor papel (azul), reactor control con cátodo rod (rojo) y reactor control con cátodo de papel grafito (negro).

Como se observa en la figura 16, el voltamograma que se corresponde con el reactor control con cátodo de papel es una línea recta prácticamente sin picos apreciables, por lo que los posibles picos de oxidación-reducción que puedan tener las bacterias una vez inoculado el reactor se van a visualizar en ese plano de trabajo. El reactor control con cátodo rod y el reactor con el cátodo de papel de grafito, muestran una forma sigmoidal, presentan dos picos máximos y mínimos en potenciales de 0,3 V y -0,9 V y alcanzan una densidad de corriente en valor absoluto máxima de 2,5 A/m<sup>3</sup>.

El reactor con el cátodo rod alcanza densidades de corriente en valor absoluto ( $80 \text{ A/m}^3$ ) mucho más elevadas que los otros reactores, presenta un pico mínimo en  $-0,9 \text{ V}$  y un máximo en  $-0,3 \text{ V}$  que puede estar relacionado con un pico de oxidación-reducción que aporte información adicional una vez se haya inoculado el reactor o debido a un cambio en las estrategias microbianas para tomar electrones del electrodo fluidizado (Harnisch & Freguia, 2012).

Se realizaron además medidas de cronoamperometría en los primeros días del sistema, sin aplicar ningún potencial y sin inocular todavía el reactor, observándose medidas de cronoamperometría cero. Esto nos indica que el sistema no consume ni produce electrones.

### **Desnitrificación en un ME-FBR de cátodo fluidizado**

A pesar de que no se llegaron a completar todas las medidas del proceso de desnitrificación dentro del reactor, se puede validar la hipótesis de que el uso de un lecho de partículas fluidizadas actuando como cátodo promueve la reducción de nitratos mediante la intervención de bacterias electroactivas tal como lo recoge Tejedor (Tejedor-Sanz et al., 2020). Este proyecto llevó a cabo la reducción nitratos en un reactor polarizado negativamente  $-0,6 \text{ V}$ , sin la adición de ningún sustrato adicional como fuente de energía. Primero acondiciona el electrolito para fomentar el desarrollo de microorganismos capaces de usar un electrodo como donantes de electrones, posteriormente se inyecta una cantidad de nitrato provocando una rápida caída de corriente en función del tiempo, indicando así la presencia de reacciones de reducción. Tras realizar el análisis de las especies de nitrógeno se confirma la reducción de nitratos a  $\text{N}_2$  por procesos bioelectroquímicos.

## **5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

El estudio realizado en este proyecto de desnitrificación en un ME-FBR utilizando un cátodo como lecho fluidizado aporta las siguientes conclusiones:

- El uso de acetato de sodio como fuente de carbono óptima para enriquecer los microorganismos reductores de nitratos presentes en el agua residual a tratar.
- La aportación inicial de  $\text{KNO}_3$  en una concentración  $30 \text{ mM}$ , para completar correctamente el proceso de desnitrificación en el cultivo en un intervalo de

tiempo de 52 horas aproximadamente.

- Elección de partículas de carbón vitreo de 0,7 mm de diámetro para fluidizar adecuadamente dentro del reactor ME-FBR y actuando como cátodo.
- Caracterización de tres sistemas electroquímicos, realizando voltametrías cíclicas entre -0,9 V y 0,3 V, alcanzando mayor densidad de corriente en el reactor rod, y estableciendo posibles picos de oxidación-reducción una vez se haya inoculado el reactor.

Como posibles recomendaciones de cara a futuras investigaciones, se recomienda profundizar el estudio de la configuración del reactor, para definir qué tipo de material consigue incrementar en mayor medida la transferencia de electrones en el proceso de desnitrificación. Además, sería conveniente estudiar las posibles modificaciones del proceso por la presencia de más compuestos (sulfatos, fosfatos, etc.) en las aguas residuales, para mantener la efectividad del proceso.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Albornoz, L. L., Marder, L., Benvenuti, T., & Bernardes, A. M. (2019). Electrodialysis applied to the treatment of an university sewage for water recovery. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2), 102982.
- Arevalo, G., Galvis, A., Postgraduados, C. De, & Mendoza-hernandez, T. (2007). Aplicación de fertilizantes sintéticos o abonos verdes y su efecto sobre la cantidad de nitrato residual en el suelo. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 13(2), 85–90.
- Bajracharya, S., Sharma, M., Mohanakrishna, G., Dominguez Benneton, X., Strik, D. P. B. T. B., Sarma, P. M., & Pant, D. (2016). An overview on emerging bioelectrochemical systems (BESs): Technology for sustainable electricity, waste remediation, resource recovery, chemical production and beyond. *Renewable Energy*, 98, 153–170.
- Bello, M. M., Abdul Raman, A. A., & Purushothaman, M. (2017). Applications of fluidized bed reactors in wastewater treatment – A review of the major design and operational parameters. *Journal of Cleaner Production*, 141, 1492–1514.
- Bhatia, S. K., Joo, H. S., & Yang, Y. H. (2018). Biowaste-to-bioenergy using

- biological methods – A mini-review. *Energy Conversion and Management*, 177(September), 640–660.
- BOE. (2003). *Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano*. (pp. 17467–17488). España
- Bohdziewicz, J., Bodzek, M., & Wąsik, E. (1999). The application of reverse osmosis and nanofiltration to the removal of nitrates from groundwater. *Desalination*, 121(2), 139–147.
- Cao, X., Huang, X., Liang, P., Xiao, K., Zhou, Y., Zhang, X., & Logan, B. E. (2009). A new method for water desalination using microbial desalination cells. *Environmental Science and Technology*, 43(18), 7148–7152.
- Centi, G., & Perathoner, S. (2003). Remediation of water contamination using catalytic technologies. *Applied Catalysis B: Environmental*, 41(1–2), 15–29.
- Chen, G., Zhang, Y., Wang, X., Chen, F., Lin, L., Ruan, Q., Wang, Y., Wang, F., Cao, W., & Chiang, P. (2020). Optimizing of operation strategies of the single-stage partial nitrification-anammox process. *Journal of Cleaner Production*, 256, 120667.
- Clasen, T., Pruss-Ustun, A., Mathers, C. D., Cumming, O., Cairncross, S., & Colford, J. M. (2014). Estimating the impact of unsafe water, sanitation and hygiene on the global burden of disease: Evolving and alternative methods. *Tropical Medicine and International Health*, 19(8), 884–893.
- Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., De Schamphelaire, L., Pham, T. H., Boeckx, P., Boon, N., & Verstraete, W. (2007). Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environmental Science and Technology*, 41(9), 3354–3360.
- DOCE. (1991). *Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas*. Bruselas
- DOCE. (2000). *Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo Europeo*. In *Diario Oficial De Las Comunidades Europeas*. Bruselas
- Dong, Y., He, W., Liang, D., Li, C., Liu, G., Liu, J., Ren, N., & Feng, Y. (2019). Operation strategy of cubic-meter scale microbial electrochemistry system in a municipal wastewater treatment plant. *Journal of Power Sources*, 441, 227124.
- Donoso, R., & Cortés, S. (2018). Exposure to nitrates in drinking water and its association with thyroid gland dysfunction. *Revista Medica de Chile*, 146(2), 223–231.

- El Midaoui, A., Elhannouni, F., Taky, M., Chay, L., Menkouchi Sahli, M. A., Echihabi, L., & Hafsi, M. (2002). Optimization of nitrate removal operation from ground water by electro dialysis. *Separation and Purification Technology*, 29(3), 235–244.
- Environmental Protection Agency. (1993). *Manual: Nitrogen Control*. September, 311.
- Fahid, F. K., & Dahab, M. F. (2004). Nitrate removal characteristics of high performance fluidized-bed biofilm reactors. *Water Research*, 38(17), 3719–3728.
- FAO, & Ongley, E. D. (1997). LOS FERTILIZANTES, EN CUANTO CONTAMINANTES DEL AGUA. In *Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. (Estudio FAO Riego y Drenaje - 55)* (FAO, pp. 1–17). GEMS/Water Collaborating Centre Canada Centre for Inland Waters Burlington,.
- FAOWater. (2008). *Water at a Glance The relationship between water, agriculture, food security and poverty*. <https://doi.org/10.3%>
- Flores B., E. (1995). Voltametría cíclica: la espectroscopía electroquímica. Parte I. *Revista de Química*, 9(2), 165–172.
- Gandiglio, M., Lanzini, A., Soto, A., Leone, P., & Santarelli, M. (2017). Enhancing the energy efficiency of wastewater treatment plants through co-digestion and fuel cell systems. In *Frontiers in Environmental Science* (Vol. 5, p. 70). Frontiers Media S.A.
- Garzon-Vidueira, R., Rial-Otero, R., Garcia-Nocelo, M. L., Rivas-Gonzalez, E., Moure-Gonzalez, D., Fompedriña-Roca, D., Vadillo-Santos, I., & Simal-Gandara, J. (2020). Identification of nitrates origin in Limia river basin and pollution-determinant factors. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 290(July 2019), 106775.
- Ge, Z., Ping, Q., Xiao, L., & He, Z. (2013). Reducing effluent discharge and recovering bioenergy in an osmotic microbial fuel cell treating domestic wastewater. *Desalination*, 312, 52–59.
- Ghafari, S., Hasan, M., & Aroua, M. K. (2008). Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater-A review. *Bioresource Technology*, 99(10), 3965–3974.
- Harnisch, F., & Freguia, S. (2012). A basic tutorial on cyclic voltammetry for the



- investigation of electroactive microbial biofilms. In *Chemistry - An Asian Journal* (Vol. 7, Issue 3, pp. 466–475). John Wiley & Sons, Ltd.
- Häyrynen, K., Pongrácz, E., Väisänen, V., Pap, N., Mänttari, M., Langwaldt, J., & Keiski, R. L. (2009). Concentration of ammonium and nitrate from mine water by reverse osmosis and nanofiltration. *Desalination*, 240(1–3), 280–289.
- Huang, L., Regan, J. M., & Quan, X. (2011). Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(1), 316–323.
- Kadier, A., Simayi, Y., Abdeshahian, P., Azman, N. F., Chandrasekhar, K., & Kalil, M. S. (2016). A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal*, 55(1), 427–443.
- Kelly, P. T., & He, Z. (2014). Nutrients removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 153, pp. 351–360). Elsevier Ltd.
- Kim, Y. S., Nakano, K., Lee, T. J., Kanchanatawee, S., & Matsumura, M. (2002). On-site nitrate removal of groundwater by an immobilized psychrophilic denitrifier using soluble starch as a carbon source. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(3), 303–308.
- Lakshmi, L. P. (2010). a Study on Denitrification in a Fluidized Bed Bioreactor. *Engineering Conferences International*.
- Lehnert, N., Dong, H. T., Harland, J. B., Hunt, A. P., & White, C. J. (2018). Reversing nitrogen fixation. In *Nature Reviews Chemistry* (Vol. 2, Issue 10, pp. 278–289). Nature Publishing Group.
- Liu, G., & Wang, J. (2017). Enhanced removal of total nitrogen and total phosphorus by applying intermittent aeration to the Modified Ludzack-Ettinger (MLE) process. *Journal of Cleaner Production*, 166, 163–171.
- Liu, J., Zhang, F., He, W., Zhang, X., Feng, Y., & Logan, B. E. (2014). Intermittent contact of fluidized anode particles containing exoelectrogenic biofilms for continuous power generation in microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 261, 278–284.
- Logan, B. E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schröder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., & Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science and Technology*, 40(17),

5181–5192.

- Ma, X., Shan, Y., Zhang, F., & Wang, J. (2013). Aerobic denitrification characteristics research of *Pseudomonas* strains HFX08. *Applied Mechanics and Materials*, 253–255, 903–907.
- Marken, F., Neudeck, A., & Bond, A. M. (2010). Cyclic voltammetry. In *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications* (pp. 57–106). Springer Berlin Heidelberg.
- Özkaya, B., Kaksonen, A. H., Sahinkaya, E., & Puhakka, J. A. (2019). Fluidized bed bioreactor for multiple environmental engineering solutions. *Water Research*, 150, 452–465.
- Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., & Vanbroekhoven, K. (2010). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. In *Bioresource Technology* (Vol. 101, Issue 6, pp. 1533–1543). Elsevier Ltd.
- Rezaei, B., & Irannejad, N. (2019). Electrochemical detection techniques in biosensor applications. In *Electrochemical Biosensors* (pp. 11–43). Elsevier.
- Rodríguez, P. (2016). “ *Puesta En Marcha Y Operación De Un Reactor Uasb F Híbrido Para Desnitrificación Simultánea Autótrofa Y Heterótrofa .*” *April*, 86.
- Samatya, S., Kabay, N., Yüksel, Ü., Arda, M., & Yüksel, M. (2006). Removal of nitrate from aqueous solution by nitrate selective ion exchange resins. *Reactive and Functional Polymers*, 66(11), 1206–1214.
- Schröder, U., Harnisch, F., & Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: Terminology and classification. *Energy and Environmental Science*, 8(2), 513–519.
- Tejedor-Sanz, S. (2016). *Merging Microbial Electrochemical Systems with Conventional Reactor Designs for Treating Wastewater*. 205.
- Tejedor-Sanz, S. (2017). *Reactores de lecho fluidizado electroquímicos microbianos: ecoinnovación en el tratamiento de aguas industriales*. Revista Aguas Residuales Info.
- Tejedor-Sanz, S., Fernández Labrador, Patricia Manchón, C., & Esteve-Núñez, A. (2020). Fluidized bed cathodes as suitable electron donors for bacteria to remove nitrogen and produce biohydrogen. *Electrochemistry Communications*, 116, 106759.
- Tejedor-Sanz, S., Ortiz, J. M., & Esteve-Núñez, A. (2017). Merging microbial

- electrochemical systems with electrocoagulation pretreatment for achieving a complete treatment of brewery wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 330, 1068–1074.
- Tomaszewski, M., Cema, G., & Ziemińska-Buczyńska, A. (2017). Influence of temperature and pH on the anammox process: A review and meta-analysis. *Chemosphere*, 182, 203–214.
- Varanasi, J. L., & Das, D. (2017). Characteristics of microbes involved in microbial fuel cell. In *Microbial Fuel Cell: A Bioelectrochemical System that Converts Waste to Watts* (pp. 43–62). Springer International Publishing.
- Velthof, G. L., Lesschen, J. P., Webb, J., Pietrzak, S., Miatkowski, Z., Pinto, M., Kros, J., & Oenema, O. (2014). The impact of the Nitrates Directive on nitrogen emissions from agriculture in the EU-27 during 2000-2008. *Science of the Total Environment*, 468–469, 1225–1233.
- Vijay, A., Chhabra, M., & Vincent, T. (2019). Microbial community modulates electrochemical performance and denitrification rate in a biocathodic autotrophic and heterotrophic denitrifying microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 272, 217–225.
- Wang, H., & Ren, Z. J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1796–1807.
- Wang, X., Aulenta, F., Puig, S., Esteve-Núñez, A., He, Y., Mu, Y., & Rabaey, K. (2020). Microbial electrochemistry for bioremediation. *Environmental Science and Ecotechnology*, 1(December 2019), 100013.
- Ware, G. W. (1989). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (G. W. Ware (ed.); Vol. 107). Springer New York.
- WWAP (UNESCO World Water Assessment). (2017). World Water Development Report, Wastewater: The Untapped Resource. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- WWAP (UNESCO World Water Assessment). (2019). *The United Nations world development report 2019. Leaving no one behind*.
- Yasui, H., Nakamura, K., Sakuma, S., Iwasaki, M., & Sakai, Y. (1996). A full-scale operation of a novel activated sludge process without excess sludge production. *Water Science and Technology*, 34(3-4-4 pt 2), 395–404.
- Zhang, F., Li, J., & He, Z. (2014). A new method for nutrients removal and recovery from wastewater using a bioelectrochemical system. *Bioresource Technology*,

166, 630–634.

Zhu, C., Wang, H., Yan, Q., He, R., & Zhang, G. (2017). Enhanced denitrification at biocathode facilitated with biohydrogen production in a three-chambered bioelectrochemical system (BES) reactor. *Chemical Engineering Journal*, 312, 360–366.

### **Páginas web consultadas**

www.aguasresiduales.info. (2017). *Las formas múltiples del Nitrógeno (amónio-nitrito-nitrato-nitrificación-desnitrificación)*.

<https://www.aguasresiduales.info/revista/blog/las-formas-multiples-del-nitrogeno>

www.iagua.es. (2019). *Concluye Life ANSWER con el desarrollo de una innovadora solución para tratar aguas residuales | iAgua*.

<https://www.iagua.es/noticias/proyecto-life-answer/concluye-life-answer-desarrollo-innovadora-solucion-tratar-aguas>

www.life-answer.eu.es. (2018). *Newsletters Life-Answer*. [http://life-answer.eu/wp-content/uploads/2018/10/Newsletter-October\\_Life-ANSWER.html](http://life-answer.eu/wp-content/uploads/2018/10/Newsletter-October_Life-ANSWER.html)

www.rmu.es. (2020). *Energy Efficiency - Rudolf Messner Umwelttechnik*. <http://www.rmu.de/energy-efficiency.html>