

# Desnitrificación del Agua Potable usando *Saccharum spontaneum* L. como un Sustrato Sólido Orgánico Natural

**Euclides M. Deago**

Centro de Investigaciones Hidráulicas e Hidrotécnicas  
Universidad Tecnológica de Panamá.  
euclides.deago@utp.ac.pa

**Gonzalo E. Pizarro**

Pontificia Universidad Católica de Chile.  
gpizarro@ing.puc.cl

**Resumen** - A nivel mundial existe una preocupación acerca de la creciente contaminación por nitrato de cuerpos de agua naturales, como resultado de actividades antropogénicas. Para hacer frente a esta situación, Sustratos Sólidos Orgánicos Naturales (SSON) han sido investigados como fuentes de carbono en la desnitrificación. A pesar de los avances en este campo, aún existe una falta de conocimiento sobre los procesos cinéticos implicados en la desnitrificación, utilizando SSON. Por esta razón hemos estudiado la desnitrificación utilizando *Saccharum spontaneum* L. (*S. spontaneum*) como SSON, para entender mejor estos procesos cinéticos. Este documento presenta los resultados experimentales obtenidos para la liberación de carbono orgánico desde *S. spontaneum* y su uso por las bacterias desnitrificantes. Pruebas de laboratorio se desarrollaron bajo condiciones anóxicas en reactores batch. Nuestros resultados mostraron que la cinética de liberación de carbono orgánico desde *S. spontaneum* fue de primer orden ( $0.08 \text{ d}^{-1}$ ). Además, la tasa máxima de utilización de nitrato ( $5.61 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{mg VSS}\cdot\text{d}$ ) y la tasa de desnitrificación ( $327 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}\cdot\text{d}$ ) fueron altas. Con este estudio demostramos que es posible obtener altos rendimientos de desnitrificación utilizando carbono orgánico liberado desde *S. spontaneum*. Este estudio mejora el conocimiento sobre el uso de SSON, como fuentes alternativas de carbono para la desnitrificación.

**Palabras claves:** Desnitrificación; *Saccharum spontaneum* L.; Sustratos Sólidos Orgánicos Naturales; cinética; agua potable.

**Abstract** - There is a global concern regarding the increasing pollution of natural water bodies by nitrate as a result of anthropogenic activities. To address this situation, Natural Organic Solid Substrates (NOSS) have been investigated as carbon sources in Denitrification. Despite advances in this field, a lack of knowledge about the kinetics involved in the Denitrification processes using NOSS still exists. For this reason we have studied the Denitrification using *Saccharum spontaneum* L. (*S. spontaneum*) as NOSS, to better understand these kinetic processes. This paper presents experimental results obtained for the release of organic carbon from *S. spontaneum*, and for its use by denitrifying bacteria. Laboratory tests were developed under anoxic conditions in batch reactors. Our results showed that the kinetics of release of organic carbon from the *S. spontaneum* was first order ( $0.08 \text{ d}^{-1}$ ). Furthermore, the maximum rate of utilization of substrate ( $5.61 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{mg VSS}\cdot\text{d}$ ), and the Denitrification rate ( $327 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{L}\cdot\text{d}$ ) were high. We demonstrated that it is possible to obtain high yields of the Denitrification using organic carbon released from *S. spontaneum*. This study improves the knowledge on the use of NOSS, as alternative sources of carbon for the Denitrification.

**Keywords:** Denitrification; *Saccharum spontaneum* L.; Natural organic substrate solid; kinetic; drinking water.

**Tipo de Artículo:** Reproducido con modificaciones menores y traducido del artículo original en inglés titulado 'Denitrification of drinking water using *Saccharum spontaneum* L. as a natural organic solid substrate', *Journal of Water Supply: Research and Technology – AQUA*, Vol 62 No 7 pp 477–486 por Euclides M. Deago y Gonzalo E. Pizarro (2013), con el permiso de los titulares del derecho de autor, IWA Publishing

**Fecha de Recepción:** 15 de septiembre de 2014

**Fecha de Aceptación:** 18 de noviembre de 2014

## 1. Introducción

La presencia de nitratos en el agua potable está asociada con la enfermedad conocida como metahemoglobinemia o síndrome del niño azul, que generalmente afecta a niños menores de 6 meses de edad [1]. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció 50 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L como la concentración máxima de nitrato permitida en el agua potable [1]. Para remover nitrato del agua existen tratamientos como la desnitrificación.

La desnitrificación es un proceso donde las bacterias aprovechan el nitrato como aceptor de electrones. La desnitrificación es más simple y más económica a gran escala que otros procesos como la ósmosis inversa o intercambio iónico [2]. Para que las bacterias realicen la desnitrificación requieren de un sustrato, ya sea orgánico o inorgánico, para suministrar los electrones necesarios para completar el proceso de reducción de nitrato [3]. Se ha determinado que la desnitrificación es más eficiente usando sustratos orgánicos, los cuales son catalizados por bacterias heterótrofas [2].

Tradicionalmente, la desnitrificación del agua potable se realiza con sustratos orgánicos solubles. Sustratos como etanol, metanol y ácido acético se usan comúnmente para eliminar el nitrato en los sistemas convencionales; con los cuales se han obtenidos eficiencias de desnitrificación entre

70 y 95% [4]. Sin embargo, la desnitrificación puede estar restringida por factores como la dosis adecuada de sustrato soluble, la utilización de sustratos que son riesgosos para la salud [4] y altos costos [5]. Debido a las limitaciones que presenta la desnitrificación, varios estudios han sugerido la exploración de nuevas fuentes de carbono y diseño de sistemas innovadores y robustos para obtener menores costos operativos [6].

Recientemente, los investigadores han iniciado una línea de estudios con Sustratos Sólidos Orgánicos Naturales (SSON) como fuentes de carbono para la desnitrificación. Los SSON son materiales vegetales que pueden obtenerse de la naturaleza o de procesos agrícolas. Entre los SSON que han sido previamente estudiados están: paja de trigo, gramíneas, tallos de cebada, cascarilla de arroz y hojas de palma [7-9]. Los resultados de estos estudios han demostrado que es posible implementar sistemas desnitrificantes usando SSON, para tratar las aguas residuales y agua potable. Otros materiales como aserrín han sido estudiados *in situ* para eliminar nitrato [10, 11]. Sin embargo, para mejorar el diseño de estos sistemas es necesario conocer los procesos cinéticos que intervienen en la eliminación de nitratos usando SSON.

En esta investigación seleccionamos *Saccharum spontaneum* L. (*S. spontaneum*), la cual es una gramínea abundante en climas tropicales y considerada una especie invasiva difícil de controlar [12]. A pesar de su condición de especie invasiva, la *S. spontaneum* recientemente ha sido estudiada como biomasa para la producción de bioetanol [13]. Los objetivos de nuestra investigación fueron: i) estudiar la liberación de carbono orgánico desde *S. spontaneum* debido a lixiviación e hidrólisis; ii) estimar parámetros cinéticos y estequiométricos de desnitrificación utilizando carbono orgánico liberado desde *S. spontaneum*; y iii) estimar la tasa de remoción de nitrato usando el carbono orgánico liberado desde *S. spontaneum*.

*S. spontaneum* es considerada una fuente potencial de carbono para la remoción biológica de nitrato debido a sus bajos costos, accesibilidad y abundancia.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Análisis físico-químico del sustrato sólido orgánico natural estudiado

*S. spontaneum* fue colectada en el campus de la Universidad Tecnológica de Panamá. Para el estudio se usó material detrítico de *S. spontaneum*, el cual consta de dos partes principales: la corteza y la médula [14]. Entre las propiedades físico-químicas evaluadas al material detrítico están: contenido de humedad, contenido de fibra (lignina, celulosa y hemi-celulosa); contenido de nitrógeno; fracción biodegradable y la cantidad de carbono orgánico biodisponible.

El contenido de humedad se determinó secando la muestra en un horno a 105 °C durante 24 horas. El contenido de fibra (lignina, celulosa y hemi-celulosa) se obtuvo utilizando el método de Van Soest [15]. El nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl, y el carbono total fue obtenido por el método de combustión. El contenido de cationes en *S. spontaneum* se determinó usando digestión con ácido nítrico digestión y detección ICP. La fracción biodegradable y carbono orgánico biodisponible se estimaron aplicando la metodología propuesta por Van Soest [16].

### 2.2 Ensayo de lixiviación

La prueba de lixiviación se realizó para evaluar la liberación de compuestos solubles desde el material detrítico de *S. spontaneum*, por la acción física del agua (autólisis). Autólisis consiste en la ruptura de vacuolas de células vegetales, debido a la saturación de agua, que ocurre en la descomposición de material vegetal sumergido [17].

Las pruebas fueron realizadas en tres tipos de reactores: *i*) el primero contenía corteza de

*S. spontaneum*; *ii*) el segundo reactor contenía solo médula de *S. spontaneum*; y *iii*) el tercero contenía secciones completas de *S. spontaneum* (corteza y médula). Las masas de materiales usadas fueron iguales para cada reactor (4 g como masa seca). Estos materiales fueron cortados en trozos de 15 mm. El agua y botellas utilizadas en las pruebas de lixiviación fueron esterilizadas y el material detrítico se lavó cuidadosamente para eliminar impurezas. El volumen de agua utilizado en el ensayo fue de 200 mL. Los reactores fueron sellados y operados durante 4 días a una temperatura de  $30 \pm 1$  °C. Los análisis de agua conducidos en estos experimentos incluyeron nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ), amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ ), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y cationes.

### 2.3 Experimentos en reactores batch

En los reactores de lixiviación, el material detrítico de *S. spontaneum* completo (corteza y médula) mostró el mejor comportamiento en cuanto a liberación de sustratos solubles; por lo tanto, este material fue seleccionado para los siguientes experimentos. El pH en los reactores se mantuvo entre 6.5 y 7, utilizando 3 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 3 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Los reactores se agitaron continuamente a 150 rpm y fueron inyectados con gas nitrógeno durante 5 minutos para desairar y así mantener las condiciones anóxicas (Oxígeno Disuelto < 1.0 mg/L). Las pruebas se hicieron a una temperatura de  $30 \pm 1$  °C.

#### 2.3.1 Evaluación de liberación de carbono desde *Saccharum spontaneum* L. en condiciones anóxicas

El objetivo del experimento fue estudiar el comportamiento de la liberación de carbono orgánico desde material detrítico de *S. spontaneum* en condiciones anóxicas (desnitrificación).

Los ensayos se realizaron por triplicado en botellas de vidrio ámbar de 500 mL. Se usaron 400 mL de agua desionizada y 12.7 g de material detrítico de *S. spontaneum* (como masa seca).

Se usó  $\text{NaNO}_3$  para obtener una concentración de nitrato de 100 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ . Para promover la desnitrificación se aprovecharon las bacterias nativas adheridas al material detrítico, por lo que este material no fue lavado como se hizo en el ensayo de lixiviación; por lo tanto, no hubo inoculación de bacterias. La utilización de bacterias nativas adheridas en sustratos sólidos ha sido aplicada en investigaciones similares [18]. En este experimento no se dosificaron micronutrientes, porque se consideró que las bacterias serían capaces de obtenerlos del material detrítico. Periódicamente, se muestrearon 25 mL de agua en cada reactor. Las muestras fueron analizadas para determinar nitrato, DQO, pH y Oxígeno Disuelto. El volumen de muestra extraído de cada reactor fue reemplazado con agua fresca y  $\text{NaNO}_3$  fue dosificado para mantener una concentración de nitrato de 100 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ .

### 2.3.2 Determinación de constante de liberación de carbono

Durante este estudio se consideró una cinética de primer orden para la liberación de carbono orgánico, desde material detrítico de *S. spontaneum*. La ecuación de cinética de primer orden ha sido utilizada comúnmente en los estudios de degradación de sustratos complejos [19, 20]. La constante liberación de carbono orgánico ( $k_r$ ) fue obtenida por regresión lineal de la ecuación 1.

$$C(t) = C_o * \exp^{-k_r t} \quad (1)$$

$C(t)$  es la DQO residual en materiales detríticos al final de cada período de medición. El valor de  $C(t)$  se obtiene con la ecuación 2.

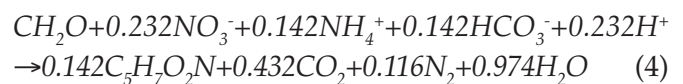
$$C(t) = C_o - COD(t) \quad (2)$$

$COD(t)$  es la DQO acumulada durante el ensayo.  $COD(t)$  es considerada la masa equivalente del carbono orgánico liberado desde

el material detrítico de *S. spontaneum*. Esta masa es calculada como sigue:

$$COD(t) = \Sigma(COD_r + COD_c) \quad (3)$$

Donde  $COD_r$  corresponde a la masa de DQO soluble medido en el sobrenadante durante las pruebas; y  $COD_c$  corresponde a la masa de DQO equivalente utilizado por las bacterias para reducir el nitrato (aceptador del electrón). Para obtener esta DQO equivalente, el nitrato consumido por las bacterias durante el ensayo fue multiplicado por el factor 2.225 g DQO/g  $\text{N-NO}_3^-$  (obtenido de la ecuación 4).



Los criterios usados para obtener la ecuación 4 son descritos en el Apéndice A.

### 2.3.4 Determinación de tasa de desnitrificación usando el Sistema OxiTop

Este experimento fue establecido para determinar la tasa de desnitrificación en reactores batch, usando *S. spontaneum* como fuente de carbono orgánico. Estas pruebas se realizaron en el sistema de OxiTop (WTW Measurement Systems, Alemania). Básicamente, el sistema OxiTop® es un respirómetro que mide presiones, que originalmente fue desarrollado para las mediciones de DBO. Este método se basa en la medición de presiones generadas por los gases formados en los procesos de descomposición. En este estudio, los gases formados fueron  $\text{N}_2$  y  $\text{CO}_2$  (según ecuación 4). La prueba se llevó a cabo por triplicado, durante un período de siete días en botellas de 500 mL con igual volumen de agua (200 mL) e igual masa de material detrítico de *S. spontaneum* (4 g como masa seca) (Figura 1). En esta prueba, también se usó material detrítico sin lavar (es decir, con las bacterias nativas). La concentración

de nitrato utilizada fue de 100 mg de  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ . Los parámetros analizados al agua de los reactores fueron: nitrato, nitrito, amonio y DQO.

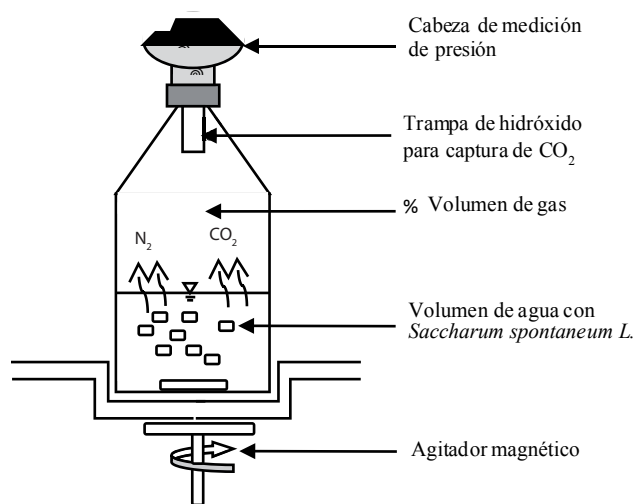


Figura 1. Representación esquemática del ensayo de desnitrificación usando el sistema OxiTop®.

## 2.4 Determinación de parámetros cinéticos

En primer lugar se realizó una prueba de lixiviación según la configuración descrita en el ensayo anterior. Concluida la prueba de lixiviación, el sobrenadante fue filtrado e inoculado con bacterias obtenidas de pruebas anteriores. Las bacterias se aclimataron durante 24 horas con una concentración de nitrato de 200 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ . El volumen de agua utilizado en cada reactor fue de 200 mL. La concentración inicial de nitrato y DQO en la prueba fueron 140 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  y 479 mg/L, respectivamente.

La tasa de reducción de nitrato fue asumida con una cinética de tipo Monod. Se aplicó regresión no lineal para estimar los parámetros cinéticos: constante de afinidad de Monod ( $K_s$ ) y máxima tasa de utilización de nitrato ( $q_{max}$ ). El parámetro estequiométrico  $Y$  (rendimiento neto de bacterias) se determinó usando la ecuación 5, la cual se basa en la reducción del nitrato y DQO consumido en el ensayo [21]:

$$Y = 1 - 2.86 \frac{N}{\text{COD}} \quad (5)$$

## Técnicas analíticas

Antes de cada análisis, todas las muestras se filtraron a través de membranas de nitrato de celulosa 0,45  $\mu\text{m}$ . Los componentes disueltos como  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NH}_4^+$  y DQO se analizaron con el espectrofotómetro HACH DR/2400 (HACH Company, USA), aplicando el método de sulfato ferroso (HACH 8153), método Nesler (HACH 8038) y método colorimétrico (HACH 8000), respectivamente. El Oxígeno Disuelto fue medido con un electrodo de luminiscencia acoplado al equipo portátil HACH HQ40d (HACH Company, EE.UU.). El pH se midió con electrodo de vidrio (Thermo Scientific, E.U.). El nitrato se analizó con electrodo de ion selectivo (Cole Palmer, EE.UU.). Ambos electrodos fueron acoplados al multiparámetro Orion Star 5 (Thermo Scientific, EE.UU.). Los cationes se determinaron mediante espectrometría de masas ICP [22]. La biomasa (mg COD/L) se calculó usando la ecuación 6 [23]:

$$\text{COD}_B = \text{COD}_T - \text{COD}_S \quad (6)$$

Donde  $\text{COD}_T$  es la DQO total medida en el sobrenadante (muestras sin filtrar); y  $\text{COD}_S$  corresponden a la DQO soluble medida en el sobrenadante (muestras filtradas).

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Propiedades físico-químicas de material détrico de *S. spontaneum* usado en el estudio

Se escogió el material détrico de las plantas porque contiene la mayor concentración lignocelulósica [17]. Para evaluar las propiedades del material détrico de *S. spontaneum*, las partes principales se analizaron por separado (corteza y la médula). El contenido de carbono y nitrógeno fueron superiores en la médula; sin embargo, la relación C/N fue mayor en la corteza (Tabla 1).

La corteza tuvo concentraciones mayores de lignina y celulosa, mientras que la médula presentó el más alto contenido de hemi-celulosa (Tabla 1). En cuanto a otros nutrientes, la médula tuvo el mayor contenido, particularmente para el calcio y el potasio, cuyos niveles fueron 10 veces superiores a los encontrados en la corteza.

La composición lignocelulósica y la relación C/N sugieren que la médula es más biodegradable que la corteza. Reddy y DeLaune [17] señalan que los materiales con baja relación C/N y menor contenido de lignina son más biodegradables. Por otra parte, la fracción biodegradable estimada para la médula indica que casi la totalidad de la médula estaba biodisponible (95%). Por lo tanto, podemos inferir que probablemente las bacterias obtengan el carbono orgánico de la médula de *S. spontaneum*.

**Tabla 1.** Propiedades físico-químicas de *S. spontaneum*

Parámetros	Corteza	Médula
Ca (mg/g)	0.21	1.33
Fe (mg/g)	0.12	0.07
K (mg/g)	10.17	48.86
Mg (mg/g)	0.28	0.35
Na (mg/g)	0.05	0.07
P (mg/g)	2.33	3.89
N (%)	0.55	2.10
C (%)	36.62	45.54
C/N	66.58	21.69
Celulosa (%)	46.98	30.02
Hemi-celulosa (%)	22.19	25.51
Lignina (%)	8.72	0.62
Carbono orgánico (%)	26.96	44.05
Fracción Biodegradable, $f_b$ (%)	66.08	94.17
Densidad (g/mL)	0.76	0.81
Materia seca (%)	78.62	58.33
Cenizas (%)	4.68	12.76

### 3.2 Ensayos de lixiviación

La liberación de carbono orgánico (en términos de DQO) fue alta, especialmente en el reactor que contenía corteza (Tabla 2). Los altos valores de DQO deben evaluarse con cautela, porque ésta es una limitación si se considera usar material detrítico de *S. spontaneum* como sustrato para la eliminación biológica de nitrato del agua potable. La liberación de nitrógeno por lixiviación desde *S. spontaneum* fue despreciable (Tabla 2).

Las masas liberadas al sobrenadante de varios elementos (*Ca*, *Mg*, *Na*, *Si*) por lixiviación fueron bajas (Tabla 2). Angelidaki & Sanders [24], indican que elementos tales como *Ca*, *Na*, *K* y *Mg* son utilizados por las bacterias en sus enzimas, paredes celulares, ribosomas y ácidos nucleicos. Potasio (*K*) es el compuesto que presentó la mayor concentración en el agua. Este resultado fue consistente con el contenido de *K* detectado en el material detrítico (Tabla 1). Las concentraciones de los elementos analizados no son un riesgo de contaminación; sin embargo, este aspecto debe tomarse en cuenta si se considera usar material detrítico de *S. spontaneum* como sustrato para remover nitrato del agua potable, ya que la OMS establece que la concentración máxima permitida de *K* es 10 mg/L [1].

De acuerdo a los resultados de la prueba de lixiviación, se concluyó que el material detrítico completo de *S. spontaneum* fue el más adecuado como fuente de carbono para los ensayos de desnitrificación. Materiales detríticos con la corteza sin remover retarda el efecto de autólisis, debido a que esta corteza actúa como una barrera impermeable que restringe el contacto del agua con el material lábil. Por lo tanto, el agua actuará únicamente en las secciones transversales de las piezas de materiales detríticos de *S. spontaneum*. La lenta liberación de sustratos solubles desde *S. spontaneum* permitirá eliminar el nitrato en un período más largo.

**Tabla 2.** Masa de nitrógeno, DQO y otros elementos solubles liberados al agua por gramo de masa de *S. spontaneum*.

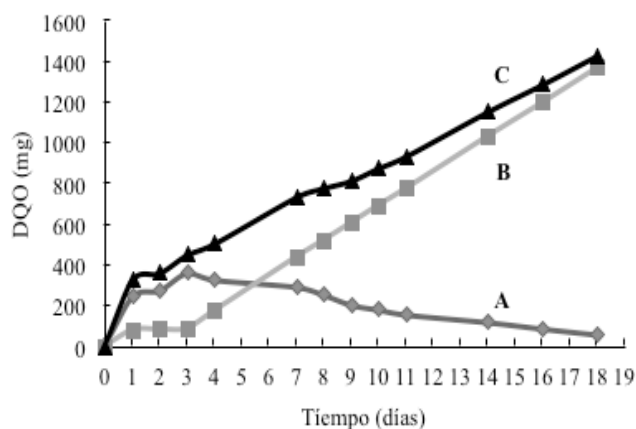
Reactores	Parámetros (mg/g de masa seca)								
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	COD	Ca	K	Mg	Na	Si
<i>S. spontaneum</i> completa	0	0	0.029	30.00	0.051	1.120	0.014	0.012	0.074
Médula de <i>S. spontaneum</i>	0	0	0.029	33.75	0.107	2.264	0.020	0.012	0.094
Corteza de <i>S. spontaneum</i>	0	0	0.030	37.50	0.207	2.714	0.026	0.012	0.137

### 3.3 Ensayo de reactores batch

#### 3.3.1 Comportamiento de la liberación de carbono desde *S. spontaneum*

En estos ensayos se utilizó un mayor contenido de material detrítico que en la prueba de lixiviación, debido a varias condiciones: *i*) en primer lugar, el tiempo utilizado en esta prueba fue mayor; *ii*) se asumió que el carbono orgánico se obtendría de la parte del material con menor contenido de lignina (médula); y *iii*) también se asumió que la bacteria usaría únicamente la celulosa presente en la médula de la *S. spontaneum*. La biodegradación de materiales detríticos se caracteriza por una pérdida relativamente rápida de la celulosa [25]; pero esta biodegradabilidad depende del contenido de lignina [26].

La máxima DQO soluble medida en el sobrenadante se obtuvo en el tercer día de operación de los reactores batch (Figura 2A). Después del tercer día, hubo un descenso constante hasta el final del ensayo. En base a estos resultados se infiere que la liberación del carbono orgánico desde *S. spontaneum* se produjo en dos fases: por lixiviación, que ocurrió en los primeros tres días de pruebas; y por hidrólisis, la cual ocurrió posterior al tercer día. Reddy & DeLaune [17] indican que la lixiviación es la primera fase de la degradación de materiales detríticos sumergidos. La hidrólisis es la descomposición de las macromoléculas (por ejemplo celulosa) a compuestos más simples (monómeros) [17, 19].



**Figura 2.** A) DQO medida directamente en el sobrenadante de los reactores, B) DQO obtenido de los electrones equivalentes de nitrato consumido en los ensayos, C) DQO total liberado desde *S. spontaneum*.

La reducción gradual de DQO después del tercer día en el sobrenadante de los reactores batch (Figura 2A), sugiere que las bacterias tuvieron condiciones favorables en términos de donante de electrones y contenido de nutrientes, proporcionados por la fase de lixiviación. Reddy & DeLaune [17] indican que sustratos solubles liberados por lixiviación desde materiales detríticos, pueden ser utilizados directamente por bacterias heterótrofas. El comportamiento descrito en estos ensayos (Figura 2A) son similares a los reportados en estudios similares [27, 28].

Los valores del carbono orgánico acumulado en el sobrenadante durante el ensayo representan el carbono liberado desde el material detrítico de *S. spontaneum*. La concentración máxima de carbono obtenida fue de 1432 mg DQO (Figura 2).

Durante la etapa de lixiviación se liberó el 32% de este carbono, mientras que el 68% restante fue atribuido a la hidrólisis. El carbono liberado representa el 78% de la masa carbono biodisponible en la celulosa de la médula de *S. spontaneum*. La masa de celulosa utilizada durante el ensayo fue 1262 mg (medido como DQO).

El comportamiento observado en los datos de la Figura 2, sugiere que la liberación de carbono fue de primer orden. La constante de hidrólisis ( $k_h$ ), que describe el comportamiento de la liberación de carbono desde *S. spontaneum*, se obtuvo mediante la aplicación de regresión lineal a los datos graficados obtenidos con linealización de la ecuación 1. En estos cálculos no se consideró la masa de carbono liberado por lixiviación. El  $k_h$  obtenido con regresión lineal fue  $0.08 \text{ d}^{-1}$ . Estos resultados confirman que la liberación de carbono orgánico desde *S. spontaneum* fue de primer orden ( $R^2 = 0.96$ ). Angelidaki & Sanders [24] indicaron que la liberación de carbono en condiciones anóxicas depende de la disponibilidad de aceptor de electrones como nitrato. El valor de  $k_h$  obtenida en este estudio está en el rango de valores reportados en estudios de degradación de materiales detríticos similares [17, 29].

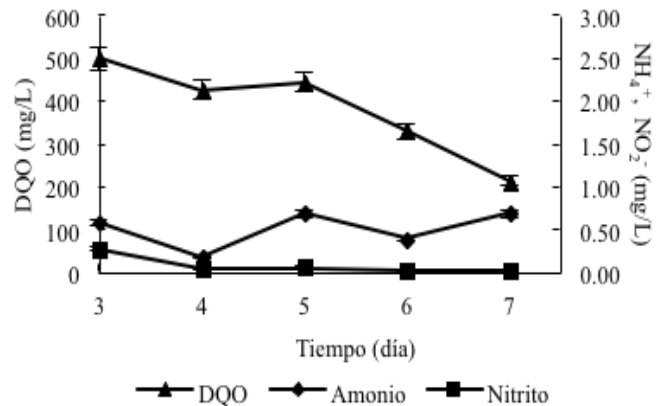
En este estudio se requirió 1 gr de *S. spontaneum* (medido como masa seco de la médula) para remover 0.15 g de nitrato. Este factor y la constante  $k_h$  son variables que podrían usarse para dimensionar sistemas de tratamiento para eliminar nitrato del agua. Además, estas variables son útiles para la modelación matemática de la desnitrificación usando SSON.

### 3.4 Ensayos de desnitrificación usando el sistema OxiTop

#### 3.4.1 Comportamiento de $\text{N-NO}_2^-$ , $\text{N-NH}_4^-$ y DQO

En el ensayo de desnitrificación se monitoreó el comportamiento de la concentración de  $\text{N-NO}_2^-$ ,  $\text{N-NH}_4^-$  y DQO. La concentración de nitrato estuvo por debajo de 1 mg/L para los tres reactores (Figura

3). Como señalan Rittmann & McCarty [5], factores como ausencia de oxígeno disuelto y concentración necesaria de donante de electrones son limitantes en la formación de nitrito.



**Figura 3.** Comportamiento de DQO, amonio y nitrito en el ensayo de desnitrificación en los reactores con el sistema OxiTop.

Las mediciones de amonio realizadas en el sobrenadante de los reactores durante todo el ensayo, mostraron que sus concentraciones fueron bajas ( $< 0.7 \text{ N-NH}_4^+ \text{ mg/L}$ ) (Figura 3). El amonio se atribuye a la amonificación de nitrógeno presente en los materiales detríticos de *S. spontaneum*; y según la literatura, un material rico en nitrógeno promueve la amonificación [17]. La DQO medida en el sobrenadante de los reactores presentó la máxima concentración al tercer día (500 mg/L); mientras que la concentración más baja se registró al final del ensayo (212.5 mg/L). La concentración máxima de DQO está acorde con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores (Figura 2A), que indica que la DQO fue proporcionada por los sustratos solubles de *S. spontaneum*. Desde el día 3, la DQO liberada está asociada con la actividad hidrolítica de bacterias adheridas en el material detrítico de *S. spontaneum*.

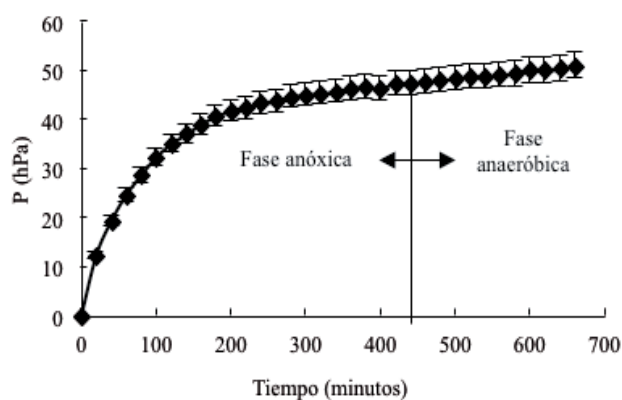
Basados en los resultados de DQO, amonio y nitrito, confirmamos que el material detrítico de



*S. spontaneum* es capaz de proveer las concentraciones necesarias de nutrientes para la desnitrificación.

### 3.4.2 Evolución de la desnitrificación

La evolución de la desnitrificación se evaluó mediante la medición de presiones generadas de los gases formados ( $N_2$  y  $CO_2$ ). Esto fue posible usando el sistema OxiTop. La presión en los reactores batch alcanzó un valor constante de  $47.33 \pm 5.69$  hPa entre los 420 y 440 minutos de iniciada la prueba (Figura 4), lo cual sugiere que la producción de nitrógeno gaseoso concluyó. Esto fue verificado con mediciones de nitrato al final del ensayo, los cuales fueron cero. Además, usando la ley general de los gases fue posible comprobar que la suma de las presiones parciales de los gases formados de desnitrificación (Ec. 4), fueron similares a la presión medida a los 440 min (final de desnitrificación). Estas presiones parciales se calcularon utilizando los moles de  $N_2$  y  $CO_2$  (Ec. 4), una temperatura de  $30^\circ C$  y el volumen de gas o espacios vacíos (292 mL) de las botellas (Figura 1).



**Figura 4.** Comportamiento de las presiones medidas en el ensayo de desnitrificación usando el sistema OxiTop.

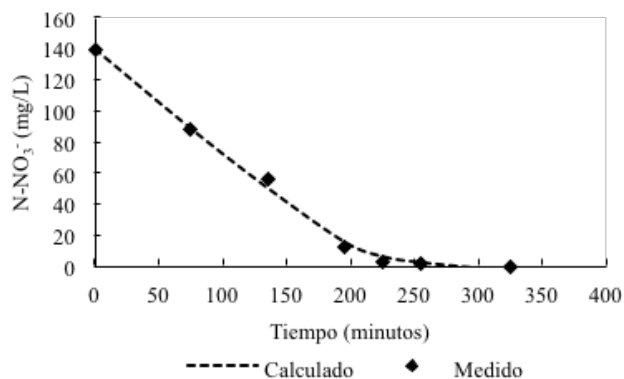
El aumento de las presiones medidas después de 440 minutos (Figura 4) sugiere la presencia de gases de la actividad anaeróbica, ya que el nitrato fue agotado. Este comportamiento confirma el supuesto de que la hidrólisis es uno de los procesos

involucrados en la liberación de carbono orgánico desde *S. spontaneum* durante la desnitrificación.

En este ensayo, el nitrato fue removido a una tasa de  $327 \text{ mg N-NO}_3^- / \text{L}\cdot\text{d}$ . Esta tasa fue superior a los valores reportados por otros estudios que utilizaron SSON (Tabla 3). Estos resultados indican que *S. spontaneum* puede ser una fuente de carbono eficiente para la remoción biológica de nitratos del agua.

### 3.5 Parámetros cinéticos y estequiométricos de Desnitrificación

En el ensayo de cinética la completa desnitrificación se produjo a los 325 minutos (Figura 5). En esta prueba fueron necesarios  $200 \text{ mg DQO/L}$  para reducir  $140 \text{ mg N-NO}_3^- / \text{L}$ . La relación observada de  $\text{DQO}_{\text{consumido}} / \text{N}_{\text{reducido}}$  fue 6.31 g DQO/g N. Este valor es ligeramente superior al valor estequiométrico obtenido de la ecuación 4 ( $6.11 \text{ g DQO/g N}$ ). Esta condición es consistente con lo reportado en la literatura, que indica que la desnitrificación completa ocurre cuando la relación DQO/N se aproxima al valor estequiométrico [31].



**Figura 5.** Cinética de desnitrificación obtenida en base al carbono orgánico liberado desde *S. spontaneum*.

La aplicación de regresión no lineal de la ecuación de Monod permitió ajustar la curva a los datos experimentales del ensayo de cinética, utilizando carbono orgánico liberado desde *S. spontaneum* (Figura 5). Los valores obtenidos

para  $q_{max}$  y  $K_s$  fueron 5.61 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/VSS·d y 20.15 mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L, respectivamente. El  $q_{max}$  fue superior a los valores reportados por otros estudios de desnitrificación (Tabla 4). Esto podría deberse a dos factores: consumo de amonio y de alta temperatura durante la prueba. Las bacterias utilizan amonio como su fuente de nitrógeno para la síntesis de celular [5]. Según la literatura,  $q_{max}$  se

incrementa al doble de su valor cuando se aumenta la temperatura en 10 °C [5, 17].

El valor de  $K_s$  obtenido en este estudio varió considerablemente en comparación con los valores reportados en la literatura (Tabla 4). Rittmann & McCarty [5], indican que el parámetro  $K_s$  es altamente variable.

**Tabla 3.** Máximas tasas de desnitrificación usando Sustratos Sólidos Orgánicos Naturales como donantes de electrones.

Sustratos	Descripción del Sistema	Concentración de nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	Tasa de desnitrificación (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L·d)	Temp. de ensayos (°C)	Referencias
Paja de trigo	Column	100	235.2	5	[30]
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Column	100	167.2	0	[8]
<i>Arunda donax</i> C	olumn	100	102.2	0	[8]
<i>S. spontaneum</i> .	Batch	100	327.3	0	Este estudio

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos y estequiométricos de desnitrificación obtenidos con carbono orgánico liberado desde *S. spontaneum* vs valores reportados en la literatura para carbonos orgánicos convencionales.

$q_{max}$ (mg N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mg VSS·d)	$K_s$ (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /L)	Y (mg DQO/mg DQO)	Temp. de ensayo (°C)	Fuentes de carbono orgánico	Referencias
3.14	18.20	.21	23 M	etanol [	32]
3.65	.71	0.34	5-26 G	lucosa [	33]
0.65	24.15	.41	20 M	etanol [	34]
1.45	58.97	.50	20 A	acetato [	34]
5.61	20.15	.55	30	<i>S. spontaneum</i>	Este estudio

El rendimiento neto de bacterias (Y) se calculó utilizando valores de nitrato reducido y de DQO consumida en la pruebas. La Y obtenida fue 0.55 mg DQO/mg DQO, la cual fue superior a los valores reportados en otros estudios, que utilizan sustratos solubles (Tabla 4). Esto sugiere que el carbono orgánico obtenido de *S. spontaneum* permitió una mayor eficiencia de las bacterias.

#### 4. Conclusiones

La desnitrificación se estudió en reactores batch usando *S. spontaneum* como un Sustrato Sólido Orgánico Natural. Los resultados de este estudio demostraron que la liberación de carbono orgánico desde *S. spontaneum*, en condiciones anóxicas, inició con una lixiviación de componentes solubles; posteriormente hubo una hidrolización de primer orden del carbono orgánico biodisponible en el material detrítico, la

cual fue generada por las bacterias adheridas en dichos materiales. Se obtuvieron valores elevados para la tasa de remoción de nitrato, de parámetros cinéticos y estequiométricos, los cuales fueron mayores a valores reportados para SSON similares y sustratos convencionales. Este alto rendimiento refleja una adaptación positiva de las bacterias en el microambiente de los ensayos batch, lo cual permitió la obtención del donante de electrones y los nutrientes necesarios para su desarrollo. Nuestros resultados demostraron el potencial de la *S. spontaneum* como sustrato único para la eliminación de nitratos del agua potable.

#### Referencias Bibliográficas

- Chambon, P., U. Lund, H. Gala-Gorchev, and Ohanian, WHO Guidelines for drinking-water quality: volume 2. Health Criteria and Other Supporting Information - Addendum. 1998, World Health Organization: Geneva, Switzerland. p. 1-127.
- Mateju, V., S. Cizinska, J. Krejci, and T. Janoch, Biological Water Denitrification - a Review. *Enzyme and Microbial Technology*, 1992. **14**(3): p. 170-183.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker, Brock. *Biology of Microorganisms*. Décima ed. Vol. 1. 2003, New Jersey: Person Prentice Hall. 1011.
- Shrimali, M. and K.P. Singh, New methods of nitrate removal from water. *Environmental Pollution*, 2001. **112**(3): p. 351-359.
- Rittmann, B.E. and P.L. McCarty, *Environmental Biotechnology: Principles and Application*. 2001, New York: McGraw-Hill. 745.
- Soares, M.I.M., Biological denitrification of groundwater. *Water Air And Soil Pollution*, 2000. **123**(1-4): p. 183-193.
- Aslan, S. and A. Turkman, Biological denitrification of drinking water using various natural organic solid substrates. *Water Science and Technology*, 2003. **48**(11-12): p. 489-495.
- Ovez, B., S. Ozgen, and M. Yuksel, Biological denitrification in drinking water using *Glycyrrhiza glabra* and *Arunda donax* as the carbon source. *Process Biochemistry*, 2006. **41**(7): p. 1539-1544.
- Hashemi, S.E., M. Heidarpour, and B. Mostafazadeh-Fard, Nitrate removal using different carbon substrates in a laboratory model. *Water Science and Technology*, 2011. **63**(11): p. 2700-2706.
- Robertson, W.D., D.W. Blowes, C.J. Ptacek, and J.A. Cherry, Long-term performance of in situ reactive barriers for nitrate remediation. *Ground Water*, 2000. **38**(5): p. 689-695.
- Schipper, L.A. and M. Vojvodic-Vukovic, Nitrate removal from groundwater and denitrification rates in a porous treatment wall amended with sawdust. *Ecological Engineering*, 2000. **14**(3): p. 269-278.
- Park, A., P. Friesen, and A.A.S. Serrud, Comparative water fluxes through leaf litter of tropical plantation trees and the invasive grass *Saccharum spontaneum* in the Republic of Panama. *Journal of Hydrology*, 2010. **383**(3-4): p. 167-178.
- Scordia, D., S.L. Cosentino, and T.W. Jeffries, Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp *aegyptiacum* (Willd.) Hack. *Bioresource Technology*, 2010. **101**(14): p. 5358-5365.
- Audesirk, T.E. and G. Audesirk, *Biology: Life on Earth*. 4th ed. Vol. 1. 1995, New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Van Soest, P.J., Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for determination of fiber and lignin. *Journal Association Official Agronomy Chemistry*, 1963. **46**: p. 829-835.
- Van Soest, P.J. Environment and forage quality. in *Cornell Nutrition Conferences for Feed Manufactures*. 1996. Rochester, Ithaca, NY.
- Reddy, K.R. and R.D. DeLaune, *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*. First ed. Vol. 1. 2008, Florida: Taylor & Francis Group. 774.
- Gibert, O., S. Pomierny, I. Rowe, and R.M. Kalin, Selection of organic substrates as potential reactive materials for use in a denitrification permeable reactive barrier (PRB). *Bioresource Technology*, 2008. **99**(16): p. 7587-7596.
- Vavilin, V.A., S.V. Rytov, and L.Y. Lokshina, A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology*, 1996. **56**(2-3): p. 229-237.
- Veeken, A., S. Kalyuzhnyi, H. Scharff, and B. Hamelers, Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. *Journal of Environmental Engineering-Asce*, 2000. **126**(12): p. 1076-1081.
- Cokgor, E.U., S. Sozen, D. Orhon, and M. Henze, Respirometric analysis of activated sludge behaviour - I. Assessment of the readily biodegradable substrate. *Water Research*, 1998. **32**(2): p. 461-475.
- APHA, AWWA, and WEF, *Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater*, A.P.H.A.A.W.W.A.W.E. Federation, Editor. 2005: Washington DC, USA.
- Grady, L.C.P., G.T. Daigge, and H.C. Lim, *Biological Wasterwater Treatment*. Second ed. 1999, New York: Marcel Dekker, Inc. 1076.
- Angelidaki, I. and W. Sanders, Assessment of anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews Environmental Science and Bio/Technology*, 2004. **3**(2): p. 117-129.
- Melillo, J.M., J.D. Aber, A.E. Linkins, A. Ricca, B. Fry, and K.J. Nadelhoffer, CARBON AND NITROGEN DYNAMICS ALONG THE DECAY CONTINUUM - PLANT LITTER TO SOIL ORGANIC-MATTER. *Plant and Soil*, 1989. **115**(2): p. 189-198.
- Chandler, J.A., W.J. Jewell, J.M. Goseet, P.J. Soest, and J.B. van Robertson, Predicting methane fermentation biodegradability, in *Biotechnology and Bioengineering*. 1980. p. 93-107.
- Volokita, M., A. Abeliovich, and M.I.M. Soares, Denitrification of groundwater using cotton as energy source. *Water Science and Technology*, 1996. **34**(1-2): p. 379-385.
- Xu, Z.X., L. Shao, H.L. Yin, H.Q. Chu, and Y.J. Yao, Biological Denitrification Using Corncoobs as a Carbon Source and Biofilm Carrier. *Water Environment Research*, 2009. **81**(3): p. 242-247.
- Vavilin, V.A., B. Fernandez, J. Palatsi, and X. Flotats, Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management*, 2008. **28**(6): p. 941-953.
- Soares, M.I.M. and A. Abeliovich, Wheat straw as substrate for water denitrification. *Water Research*, 1998. **32**(12): p. 3790-3794.
- Cuervo-López, F., S. Martínez Hernández, A. Texier, and J. Gómez, Principles of denitrifying processes, in *Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution: Principles and Engineering*, F. Cervantes, Editor. 2009, IWA Publishing: London. p. 420.
- Rabah, F.K.J., M.F. Dahab, and T.C. Zhang, Estimation of the intrinsic maximum substrate utilization rate using batch reactors with denitrifying biofilm: A proposed methodology. *Water Environment Research*, 2007. **79**(8): p. 887-892.
- Lin, Y.H., Kinetics of nitrogen and carbon removal in a moving-fixed bed biofilm reactor. *Applied Mathematical Modelling*, 2008. **32**(11): p. 2360-2377.
- Cherchi, C., A. Onnis-Hayden, I. El-Shawabkeh, and A.Z. Gu, Implication of Using Different Carbon Sources for Denitrification in Wastewater Treatments. *Water Environment Research*, 2009. **81**(8): p. 788-799.
- Su, C.M. and R.W. Puls, Removal of added nitrate in cotton burr compost, mulch compost, and peat: Mechanisms and potential use for groundwater nitrate remediation. *Chemosphere*, 2007. **66**(1): p. 91-98.

## Apéndice A

La ecuación 4 se obtuvo según los criterios termodinámicos y bioenergética [5]. Utilizamos 0.6 como el coeficiente de transferencia de energía ( $\epsilon$ ). Según Rittmann & McCarty [5], este es el valor más común utilizado por las bacterias desnitrificantes. Para el balance de masa de los electrones equivalentes, se utilizaron factores  $f_s$  (porción de electrones utilizado para la síntesis celular) y  $f_e$  (fracción de electrones utilizado para la producción de energía). Los valores obtenidos para  $f_s$  y  $f_e$  fueron 0.29 y 0.71, respectivamente.

El  $\text{CH}_2\text{O}$  fue considerado el carbono orgánico utilizado en la desnitrificación [35]. Este carbohidrato representa el producto de la hidrólisis (monómeros). Esta hipótesis considera que las condiciones anóxicas en la prueba limitada la presencia de productos de fermentación. El amonio se añadió a la estequiometría, porque es conocido que las bacterias aprovechan el nitrógeno disponible en los materiales detríticos [17].

### Ecuaciones de Van Soest:

#### Fracción biodegradable

$$f_b = 1 - 0.0541(\text{Lig}_{\% \text{cell wall}})^{0.76}$$

#### Carbono orgánico en material detrítico

$$C_{\text{bio}} = C_t (\text{cell wall}/100)(1 - 0.0541(\text{Lig}_{\% \text{cell wall}})^{0.76}) + C_t (1 - \text{cell wall}/100)$$

## Apéndice B

Notación. Los siguientes símbolos son usados en este artículo

SSON	Sustratos Sólidos Orgánicos Naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
$f_b$	Fracción biodegradable de material detrítico
$\epsilon$	Coeficiente de transferencia de energía
$f_s$	Fracción de electrones para síntesis celular
$f_e$	Fracción de electrones para producción de energía
$COD(t)$	DQO total liberado desde <i>S. spontaneum</i> en un tiempo (t) dado (gramos)
$COD_c$	Corresponde a la masa de DQO equivalente usada por bacterias para reducir nitrato (gramos)
$COD_r$	Masa de DQO soluble medida durante los ensayos (gramos)
$COD_B$	Biomasa calculada (como mg DQO/L)
$COD_T$	DQO total medido como mg DQO/L (agua no filtrada)
$COD_s$	DQO soluble medida como DQO/L (agua filtrada)
$C_o$	Contenido inicial de carbono en el SSON (medido como gramos de DQO)
$C(t)$	Cantidad de carbono remanente en el SSON en cada uno de los período de medición (medido como gramos de DQO).
$k_h$	Constante de hidrólisis (d-1)
$t$	Períodos de medición (días)
$q_{max}$	Máxima tasa de utilización de nitrato (mg N-NO <sub>3</sub> -/mgVSS-d)
$K_s$	Coeficiente de afinidad de Monod (mg/L)
$Y$	Rendimiento neto de bacterias (mg DOQ/ mg DQO)
$Lig \%$	Porcentaje de lignina basado en el contenido de pared celular
$cell \ wall$	Porcentaje de carbono orgánico en el material detrítico
$C_{bio}$	
$Cell \ wall$	Suma aproximada del contenido de lignina, celulosa, y hemi-celulosa (%)
$C_t$	Carbono total en el material detrítico (%)