

## Eliminació autotròfica en línia principal (Anmmox mainstream)

---

Estudiant: Irene Cuervas Oliveras

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: irene.cuervas@gmail.com

Tutor: Dr. Jesús Colprim Galceran

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor:

Nom del tutor: Dr. Jesús Colprim Galceran

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu electrònic: J.Colprim@lequia.udg.cat

## ÍNDEX

ÍNDEX.....	2
RESUM.....	3
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
INTRODUCCIÓ .....	6
OBJECTIVES.....	11
MATERIALS I MÈTODES .....	12
RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	17
CONCLUSIONS .....	33
BIBLIOGRAFIA.....	34

## RESUM

L'eliminació autotròfica del nitrogen de les aigües residuals en línia principal és un sistema que combinat amb un procés de nitrificació parcial (PN-A) presenta nombroses avantatges. Encara que la seva eficiència ha estat estudiada bàsicament en corrents amb alta concentració d'amoni i altes temperatures, actualment també s'estudia pel tractament d'aigües residuals urbanes, que es troben a temperatura ambient i tenen menys concentració d'amoni.

En aquest estudi s'analitza el procés PN-A en un sol reactor flux pistó tractant aigua sintètica a temperatura ambient i una concentració de  $\text{NH}_4^+$  a l'entrada de 75 mg-N/L. Per tal que Anammox pugui oxidar de forma anòxica el nitrogen necessita nitrit com a acceptor d'electrons, el qual és format durant la nitrificació parcial pels bacteris aerobis oxidants d'amoni (AOB). Perquè es puguin dur a terme les dues reaccions seqüencials necessàries la biomassa es troba en forma de grànuls que presenten un ambient aeròbic a la capa externa i anòxic a l'interior. Per aquest motiu l'aeració no és homogènia a tot el reactor, de manera que es diferencien zones amb oxigen i zones sense, que ajudaran un procés o un altre.

Es fa un seguiment del procés analitzant diferents paràmetres importants pel desenvolupament del procés, com són el pH, la temperatura, la concentració d'oxigen dissolt i de carboni inorgànic, l'alcalinitat, la conductivitat i la salinitat. A més a més, s'analitzen les concentracions de les espècies nitrogenades en el cabal d'entrada i sortida per determinar la càrrega inicial de nitrogen (NLR), la velocitat d'eliminació de nitrogen (NRR) i la ràtio  $\text{NO}_3^-$  produït/ $\text{NH}_4^-$  eliminat, que permeten estudiar l'eficiència del procés PN-A.

Al llarg de tot l'estudi no s'obtenen resultats positius pel que fa a l'eficiència del procés a causa dels bacteris oxidants de nitrit (NOB). La presència d'aquests bacteris es confirma a partir dels assajos d'activitat de la biomassa de l'interior del reactor en funció del seu diàmetre. Els grànuls amb un diàmetre  $<500 \mu\text{m}$  es troben en major concentració i presenten activitat AOB i NOB, mentre que no es detecta Anammox ja que són inhibits perquè l'oxigen arriba per difusió fins a l'interior del grànul. En canvi, en els grànuls amb diàmetre  $>500 \mu\text{m}$  sí que es detecta activitat AOB i Anammox perquè la difusió de l'oxigen arriba fins a un màxim de  $200 \mu\text{m}$ .

## RESUMEN

La eliminación autotrófica Anammox del nitrógeno de las aguas residuales en línea principal es un sistema que combinado con un proceso de nitrificación parcial (PN-A) presenta múltiples ventajas. Aunque su eficiencia ha estado estudiada básicamente en corrientes con alta concentración de amonio y altas temperaturas, actualmente también se estudia para el tratamiento de aguas residuales urbanas, que se encuentran a temperatura ambiente y con menos concentración de amonio.

En este estudio se analiza el proceso PN-A en un solo reactor flujo pistón tratando agua sintética a temperatura ambiente y con una concentración de  $\text{NH}_4^+$  en la entrada de 75 mg-N/L. Para que Anammox pueda oxidar de forma anóxica el nitrógeno necesita nitrito como aceptor de electrones, el cual se forma durante la nitrificación parcial por las bacterias aerobias oxidantes de amonio (AOB). A fin de que se puedan llevar a cabo las dos reacciones secuenciales necesarias la biomasa se encuentra en forma de gránulos que presentan un ambiente aeróbico en la capa externa y anóxico en la interna. Por este motivo la aeración no es homogénea en todo el reactor, de manera que se diferencian zonas con oxígeno y zonas sin, que ayudaran a un proceso o a otro.

Se hace un seguimiento del proceso analizando distintos parámetros importantes para el desarrollo del sistema, como son el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto y de carbono inorgánico, la alcalinidad, la conductividad y la salinidad. Además, se analizan las concentraciones de las especies nitrogenadas en el cabal de entrada y salida para determinar la carga inicial de nitrógeno (NLR), la velocidad de eliminación de nitrógeno (NRR) y la ratio  $\text{NO}_3^-$  producido/ $\text{NH}_4^-$  eliminado, que permiten estudiar la eficiencia del proceso PN-A.

A lo largo de todo el estudio no se obtienen resultados positivos en cuanto a la eficiencia del proceso a causa de las bacterias oxidantes de nitrito (NOB). La presencia de estas bacterias se confirma a partir de los ensayos de actividad de la biomasa del interior del reactor en función de su diámetro. Los gránulos con diámetro  $<500 \mu\text{m}$  se encuentran en mayor concentración y presentan actividad AOB y NOB, mientras que no se detecta Anammox ya que son inhibidos porqué el oxígeno llega por difusión hasta el interior del gránulo. En cambio, en los gránulos con diámetro  $>500 \mu\text{m}$  sí que se detecta actividad AOB i Anammox porque la difusión del oxígeno llega hasta un máximo de  $200 \mu\text{m}$ .

## ABSTRACT

Mainstream autotrophic Anammox nitrogen removal from wastewaters combined with a partial nitrification process (PN-A) is a system that presents several advantages. Despite its efficiency has been studied mainly for currents with high ammonium concentration and high temperatures, nowadays it is also being studied for urban wastewaters treatment, which are at environmental temperature and have low ammonium concentration.

In this study PN-A process is analysed in one-stage piston flow reactor treating synthetic water at environmental temperature and with a  $\text{NH}_4^+$  influent concentration of 75 mg-N/L. In order to enable Anammox to oxidize nitrogen anaerobically it needs nitrite as electron acceptor, which is formed during partial nitrification by aerobic ammonium oxidizing bacteria (AOB). Both sequential reactions are carried in biomass granules that have an aerobic environment in the external part and anaerobic in the internal. For this reason, aeration is not homogeneous all along the reactor, hence different zones with or without oxygen are differentiated to enhance one process or another.

A tracking of the process is done analysing important parameters for the development of the system, which are pH, temperature, dissolved oxygen and inorganic carbon concentration, alkalinity, conductivity and salinity. In addition, nitrogen species concentrations in the influent and the effluent are analysed to describe nitrogen loading rate (NLR), nitrogen removal rate (NRR) and  $\text{NO}_3^-$  produced/ $\text{NH}_4^-$  removed ratio, in order to study PN-A process efficiency.

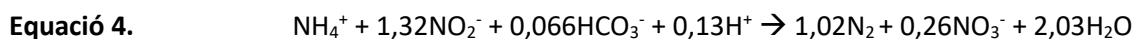
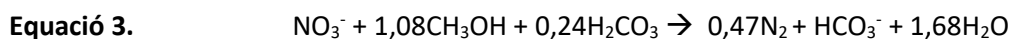
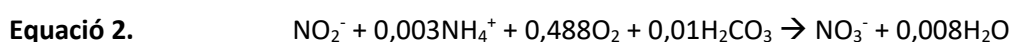
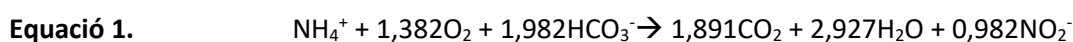
With regard to the process efficiency throughout the study, positive results has not been achieved due to nitrite oxidizing bacteria (NOB). NOB presence is confirmed by the biomass activity tests depending on its diameter. Granules with  $<500 \mu\text{m}$  diameter are more abundant and present AOB and NOB activity, whereas Anammox activity is not detected since they are inhibited by oxygen that reach all the granule due to oxygen diffusion. However, in granules with  $>500 \mu\text{m}$  diameter AOB and Anammox activity is detected because oxygen diffusion only reaches to a maximum of  $200 \mu\text{m}$ .

## INTRODUCCIÓ

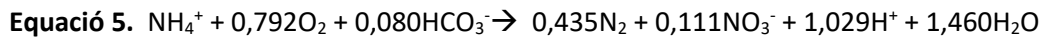
Les aigües residuals produïdes pels humans, ja sigui a nivell domèstic, urbà o causades per activitats industrials són una gran font de contaminació. És per això que el tractament d'aquest tipus d'aigües és important per protegir la salut pública i el medi ambient d'efectes nocius o bé per poder utilitzar-la de nou.

El disseny d'un sistema de tractament d'aigües és diferent en funció de l'origen d'aquesta aigua (Balaguer et al., 2007). Tot i així, tenen lloc tres transformacions bioquímiques bàsiques dutes a terme per microorganismes vius. El primer pas consisteix en l'eliminació de la matèria orgànica soluble, després es dona la digestió de la matèria orgànica insoluble i, finalment, la transformació de la matèria inorgànica soluble, com és el fòsfor i el nitrogen.

Majoritàriament el nitrogen a l'aigua es troba en forma d'amoni, de nitrit i de nitrat. Aquests compostos nitrogenats s'eliminen de l'aigua transformant-los en nitrogen gas. Per tal de dur a terme aquest procés els bacteris autotròfics utilitzen el carboni inorgànic com a font de carboni i porten a cap el procés de nitrificació (Eq. 1 i 2) i els bacteris heterotròfics, pels quals la matèria orgànica és la font de carboni, la desnitrificació (Eq. 3). Amb el descobriment dels bacteris anòxics oxidants d'amoni (Anammox), ha aparegut la possibilitat de canviar la forma d'eliminar el nitrogen fent que tot el procés es pugui donar només per l'activitat de bacteris autotròfics. El que fan aquests bacteris és convertir l'amoni directament a nitrogen gas utilitzant el nitrit com a acceptor d'electrons (Eq. 4), per tant són una drecera a l'hora d'eliminar el nitrogen.



El procés Anammox utilitza el nitrit com a acceptor d'electrons. És per això que l'eliminació autotròfica del nitrogen es produeix a partir de dues reaccions seqüencials: nitrificació parcial (Eq. 1) i oxidació autotròfica Anammox (Eq. 4). Quan es donen aquestes dues reaccions, el procés d'eliminació del nitrogen s'anomena PN-A (partial nitrification-anammox). Aquest sistema consisteix en una primera etapa on aproximadament el 60% de l'amoni de l'aigua a tractar (Ruscalleda, 2011) és convertit a nitrit per bacteris aeròbics oxidants d'amoni (AOB). A partir d'aquest nitrit format, els bacteris Anammox poden convertir la resta d'amoni a nitrogen gas com a producte principal. L'equació i estequiometria completa del procés PN-A és la següent (Eq. 5):



A l'hora d'operar el sistema PN-A es pot fer a partir de dos reactors, on en un hi ha condicions aeròbiques per la nitrificació parcial i a l'altre condicions anaeròbiques per tal de que Anammox pugui treballar. D'altra banda, el procés també es pot desenvolupar en un sol reactor (one-stage PN-A) gràcies a la formació de biofilms o sistemes granulars (Carvajal-Arroyo et al. 2016). El fet d'utilitzar la via PN-A presenta molts avantatges. Primer de tot, hi ha una reducció pròxima al 60% del consum d'oxigen ja que no cal oxidar tot l'amoni a nitrit. És a dir, es necessita menys aeració. En segon lloc, no és necessari afegir matèria orgànica perquè no hi ha procés de desnitrificació. D'aquesta manera s'elimina gairebé en un 100% la demanda de carboni orgànic. Per últim, el sistema produeix un 80% menys de biomassa fent disminuir els costos de manteniment dels fangs residuals (Cao et al., 2017). Per tant, tots els avantatges comporten una reducció dels costos d'operació. A més a més, quan té lloc el procés de desnitrificació, els bacteris heterotròfics desnitrificants produeixen òxid nítrós gasós ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Aquest gas és molt perjudicial per l'atmosfera, però amb el sistema PN-A s'ha demostrat a nivell de laboratori que les emissions són significativament més baixes (Carvajal-Arroyo et al., 2016).

Els bacteris Anammox tenen més activitat quan es troben dins el reactor en forma de cèl·lules lliures (Cao et al., 2017). Tot i això, al utilitzar només un sol reactor on ha de tenir lloc la reacció aeròbica i la reacció anaeròbica, és impossible mantenir Anammox en la forma lliure. És necessari que hi hagi oxigen per tal que els bacteris AOB puguin fer la nitrificació parcial, però s'han de buscar estratègies d'operació perquè Anammox és anaerobi i l'oxigen inhibeix la seva activitat. És per aquest motiu que Anammox necessita trobar-se immobilitzat ja sigui en forma de biofilms, grànuls o folcs. Gràcies al transport per difusió i a la conversió dels substrats es poden formar micropartícules on a l'interior s'hi donen les condicions anòxiques favorables per Anammox i a la capa externa les condicions pel creixement dels bacteris AOB (Carvajal-Arroyo et al., 2016).

El sistema PN-A es pot també dur a terme dins d'una estació depuradora d'aigües residuals (EDAR) de dues formes diferents: sidestream i mainstream. Quan s'opera en sidestream l'aigua entra al sistema amb una alta concentració d'amoni i matèria orgànica. L'amoni s'elimina gràcies als microorganismes autotròfics nitrificants i als desnitrificants heterotròfics i s'obté un cabal de sortida amb  $<1\text{ppm}$  de  $\text{NH}_4^+$  i  $<5\text{ppm}$  de  $\text{NO}_3^-$ . Un sedimentador separa aquest cabal de sortida de la biomassa, la qual és recirculada cap al bioreactor (procés secundari). A més a més, aquest cabal de recirculació amb una alta concentració de matèria orgànica (fangs) és purgat i enviat a un digester anaerobi on es digereix amb un temps de 30 dies. Dins del digester la temperatura és de  $35^\circ\text{C}$  i la matèria orgànica es converteix en biogàs ( $\text{CH}_4$ ), el qual s'utilitzarà com a font d'energia en altres processos (Kouba et al., 2016). El cabal de sortida del digester es separa en la fracció de sòlids, que seran utilitzats per compostatge, i en la líquida la qual té

unes condicions òptimes pels bacteris Anammox. Aquest cabal líquid és estable i de composició constant, no conté matèria orgànica i té una concentració d'amoni de 1000 ppm. Així doncs, es desenvolupa el sistema PN-A i s'obté un cabal de sortida amb uns 50 ppm de  $\text{NH}_4^+$  que retorna al cabal d'entrada principal de la depuradora i correspon a un 10% del nitrogen d'entrada. Tot i que s'obté biogàs com a producte de tot el procés de depuració, el balanç d'energia és negatiu.

Quan el sistema opera en mainstream es tracta d'una configuració amb un primer reactor per eliminar la matèria orgànica i un segon per eliminar el nitrogen autotròficament (PA/Anammox). A l'igual que en el procés sidestream, els fangs purgats del primer bioreactor passen a un digester anaerobi a 35°C del qual s'obindrà biogàs, una part de fangs utilitzats per compostatge i una cabal líquid amb una concentració variable d'amoni que entrarà en el sistema en el segon bioreactor. El cabal d'entrada d'aquest segon bioreactor és d'uns 70 ppm d'amoni aproximadament i és on es desenvolupa el procés PN-A per acabar obtenint nitrogen gas. En aquest cas, el balanç d'energia sí que és positiu.

Obtenir un balanç d'energia positiu en el procés és molt important pel que fa la sostenibilitat del medi ambient. Així doncs, és molt interessant estudiar i desenvolupar el sistema mainstream Anammox amb nitrificació parcial perquè és una font d'obtenció d'energia en forma de biogàs al mateix temps que s'elimina el nitrogen contaminant de les aigües residuals (Malovanyy et al., 2015), evitant així problemes d'eutrofització de les aigües per excés de nutrients.

Tal i com s'ha dit, el sistema sidestream utilitza un cabal d'entrada amb una concentració d'amoni més alta, d'entre 500 i 1500 mg/L, mentre que amb mainstream la concentració d'amoni a l'entrada és d'entre 30 i 100 mg/L i la composició és variable. Aquesta baixa concentració en mainstream suposa un problema a l'hora d'inhibir els bacteris aerobis que fan la segona part de la nitrificació (NOB) (Eq. 2). Tot i això, el sistema sidestream només utilitza entre un 15-20% del nitrogen total d'entrada. Una altra diferència entre els dos possibles modes d'operació és la ràtio C/N: mentre que en sidestream és  $<1$  g, en mainstream és d'entre 7 i 12 g (Cao et al., 2017). A més a més, la temperatura de treball en sidestream és de 30°C. En canvi, en mainstream la temperatura es veu afectada per variacions estacionals amb valors  $<15^\circ\text{C}$ , cosa que fa que l'activitat d'Anammox en mainstream PN-A sigui més baixa.

En general, l'eliminació del nitrogen en aigües residuals mitjançant el sistema PN-A ha estat desenvolupat per tractar aigües amb altes concentracions d'amoni i amb temperatures d'entre 25 i 40°C. Tanmateix, al tenir grans avantatges, s'està començant a estudiar la seva utilització per tractar aigües residuals municipals. Aquestes aigües es caracteritzen per tenir una concentració de nitrogen més baixa (aproximadament d'uns 70 mg/L) i per trobar-se a temperatura ambient (Hu et al., 2013), per tant són pròpies de l'eliminació autotròfica en línia principal (mainstream).



Com s'ha comentat anteriorment, el procés PN-A mainstream té una ràtio C/N alta. Això pot provocar que una part important de la biomassa correspongui a bacteris heterotròfics desnitrificants, fet que causa que la població i l'activitat dels AOBs i Anammox disminueixin (Cao et al., 2017). Per tant, també disminueix la quantitat de nitrogen eliminat. Un altre paràmetre important és la temperatura òptima d'activitat d'Anammox, la qual és de 30°C (Puyol et al., 2013). Si l'aigua residual es troba a temperatura ambient, Anammox no tindrà un bon rendiment d'eliminació de nitrogen i, pel contrari, l'activitat dels bacteris NOB, que són competidors amb Anammox pel nitrit, augmentarà (Laureni et al., 2016).

En el procés mainstream, els bacteris AOB i Anammox competeixen per l'amoni, els AOB i NOB competeixen per l'oxigen i els Anammox i els NOB competeixen pel nitrit (Cao et al., 2017). Com que cada grup de bacteris té una  $\mu_{\max}$  concreta a cada temperatura, les competències són unes o altres en funció de les condicions de treball.

Un dels aspectes claus en l'eliminació de nitrogen pel mètode PN-A és la inhibició dels bacteris NOB, ja que sinó no es durà a terme la desnitrificació autotròfica amb Anammox. Per tal d'evitar l'activitat NOB, és molt important prevenir l'acumulació de nitrit. Anammox és més afí al nitrit que NOB, per tant Anammox podrà actuar encara que hi hagi baixes concentracions de  $\text{NO}_2^-$ . Una altra manera d'inhibir els NOB és aconseguir una concentració d'amoni lliure (FA) superior a 5mg/L. També es poden utilitzar estratègies de bioaugment per tal que hi hagi més concentració de població Anammox que no NOB, així l'activitat Anammox també podrà ser superior a la de NOB. A part, és important ajustar la ràtio  $\text{NO}_3^-$  produït/  $\text{NH}_4^+$  consumit al 11%, fet que implica que es compleix la estequiometria de la reacció total (Eq. 5) i que, per tant, no actuen els NOB (Carvajal-Arroyo et al., 2016).

L'espècie dominant d'AOB és *Nitrosomonas Spp.*, la qual té una velocitat de creixement més alta que els NOB ( $\mu_{\max \text{AOB}}=2,1/\text{dia}$ ,  $\mu_{\max \text{NOB}}=0,7-0,9/\text{dia}$ ). En conseqüència, una forma de prevenir l'activitat de NOB és actuar a altes temperatures. D'aquesta manera s'eliminarà la competència per l'oxigen entre AOB i NOB. Contràriament, aquesta possible solució és difícil d'aplicar en mainstream PN-A ja que la temperatura de l'aigua sol ser baixa. Tampoc es pot ajustar el temps de retenció de sòlids (SRT) per causar un rentat de NOB. Per tenir rentat caldria treballar amb un SRT petit, però cal tenir en compte que Anammox té una velocitat màxima específica de creixement molt baixa (Zhang et al., 2017). És a dir, cal un SRT més llarg per assegurar el creixement de bacteris Anammox.

AOB i NOB competeixen per l'oxigen, tot i així els AOB tenen una velocitat de consum d'oxigen més alta que NOB. Així mateix, si hi ha condicions limitants d'oxigen els NOB s'inhibiran. L'inconvenient és que l'espècie NOB dominant canvia en funció de les condicions de concentració d'OD del reactor: quan la concentració d'oxigen és baixa domina *Nitrospira Spp.*, mentre que a concentracions d'oxigen altes domina *Nitrobacter Spp.* Per una banda, *Nitrobacter Spp.* es considera un estratègia de la R, per tant és un

competidor important a altes concentracions d'oxigen. D'altra banda, *Nitrospira Spp.* és un fort competidor quan les condicions d'oxigen no són favorables (estratega de la K) (Cao et al., 2017).

Per tant, treballar a baixes temperatures i amb una concentració baixa d'oxigen no elimina la competència de NOB per l'oxigen amb AOB degut a que *Nitrospira Spp.* és un estratega de la K amb alta afinitat per l'oxigen. És a dir, es facilita l'establiment dels NOB a baix OD i baixa temperatura. Una possible solució a aquest impediment és utilitzar aeració intermitent (Malovanyy et al., 2015). Utilitzant aquest mètode es pot aconseguir una bona nitrificació ja que condicions anòxiques durant molt de temps causen que l'activitat de NOB entri en fase lag. Així mateix, els NOB són inhibits sense afectar els AOB, els quals tornaran a activar el seu metabolisme quan entrin de nou a la fase d'aeració.

## OBJECTIVES

The principal objective of this work is to analyse the viability of mainstream nitrogen autotrophic removal in municipal wastewaters. The study is developed in a pilot plant located at LEQUIA (Girona) where the water treated is synthetic.

To accomplish the principal objective the following secondary objectives are described:

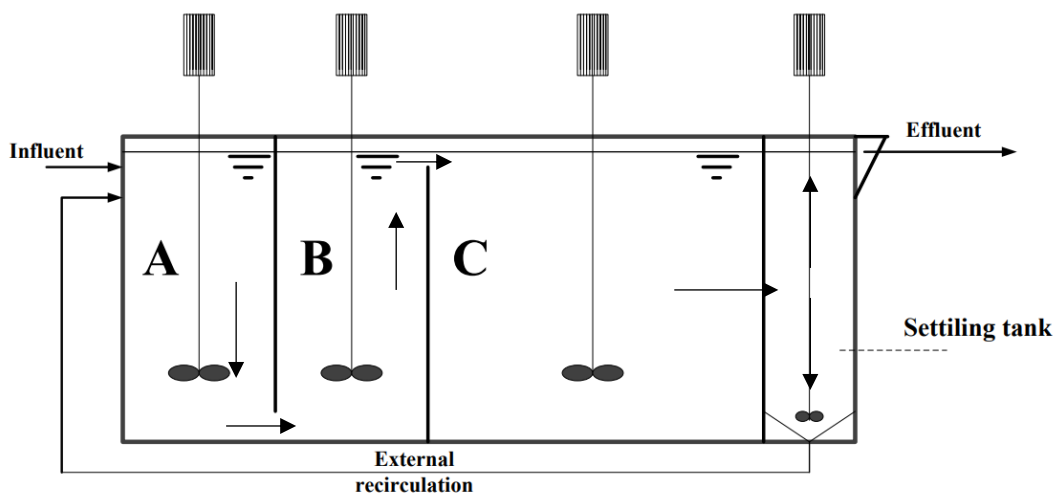
- Study the evolution of the reactor where the process is developed controlling different parameters during the study.
- Carry out anaerobic and anoxic batch activity tests to examine Anammox and AOB activity and to detect or reject NOB presence.
- Analyse oxygen diffusion in the inner part of the biomass granules according to whether their diameter is smaller or larger than 500 $\mu$ m.

## MATERIALS I MÈTODES

### Descripció del reactor

El sistema PN-A es va estudiar en un sol reactor (one-stage) de tipus flux pistó situat al LEQUIA del Parc Científic i Tecnològic de Girona. Aquest reactor operava de forma continua, amb moviment constant i cap a una direcció en l'espai concreta. Les reaccions que tenien lloc al seu interior progressaven seguint aquesta direcció i la longitud del reactor.

El flux pistó utilitzat era de polietilè i es caracteritzava per estar diferenciat en quatre compartiments diferents comunicats entre ells (Figura 1). La configuració d'aquest tipus de reactor permetia establir zones on les condicions eren diferents. Tots els compartiments eren agitats per un agitador mecànic de la marca Herdolph a 200 rpm. Tot i així, es diferenciaven entre ells perquè al primer hi havia un ambient anòxic, mentre que al segon i al tercer compartiment les condicions eren aeròbiques. Aquestes condicions aeròbiques es van aconseguir gràcies a un flux d'aire controlat per un difusor d'aire de la marca Alicat Scientific, el qual operava a una velocitat de 80 centímetres cúbics per minut (ccm) aconseguint així una concentració d'oxigen dissolt (OD) mitja de 0,19 mg/L dins del reactor. Finalment, al quart compartiment es trobava el sedimentador i per on sortien el corrent de sortida i de recirculació, els quals tenien un cabal de 37,44 L/dia i 374,4 L/dia, respectivament. El sistema de sedimentació permetia separar la biomassa del cabal de sortida. D'aquesta manera la biomassa tornava a entrar al bioreactor a través del cabal de recirculació, mentre que l'aigua ja tractada sortia del sistema.



**Figura 1.** Representació esquemàtica del reactor de tipus flux pistó utilitzat per fer l'estudi a escala de laboratori del procés PN-A. El reactor es divideix en quatre compartiments perfectament agitats a 200 rpm el primer dels quals es troba sota condicions anòxiques. La resta de compartiments reben aeració gràcies a l'entrada d'un flux d'aire i a que són oberts a l'ambient. Des de l'últim compartiment surten els corrents de sortida i de recirculació i és on es troba el sedimentador per separar la biomassa de l'aigua ja tractada. Les fletxes negres indiquen el flux de l'aigua al llarg del reactor.

El reactor tenia unes dimensions de 70x37,5x14 cm i un volum funcional de 37,35 L, per la qual cosa el temps de residència hidràulic era d'1 dia. El primer compartiment ocupava un 21,2% del volum total del reactor, el segon un 28,3% i el tercer un 50,5%.

El sistema es va posar en marxa el 2 de juliol de 2016. Tot i així, aquest estudi i seguiment del seu procés va començar el 2 de març de 2017. Alguns dels paràmetres del reactor van ser mesurats a través de sensors que enviaven els valors a un ordinador i mesuraven la concentració d'OD, el potencial redox, el pH i la temperatura. Aquests sensors indicaven que el pH mitjà a l'interior era de 6,98, la temperatura de 25,1±0,5°C i el potencial redox de 228 mV. La ràtio C/N i la demanada química d'oxigen (COD) no van ser controlats perquè no s'afegia matèria orgànica al sistema.

El bioreactor era alimentat a partir d'aigua sintètica per tal d'evitar els possibles efectes del creixement de microorganismes heterotròfics (Cao et al., 2017). L'aigua es preparava dins un tanc de 250L amb agitació i refrigeració a 4°C. Els compostos utilitzats per preparar l'aigua d'alimentació del reactor i les seves concentracions s'indiquen a la Taula 1.

**Taula 1.** Components i concentracions utilitzades per preparar l'aigua sintètica que correspon al corrent d'entrada al reactor.

Component	Concentració
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0125 g/L
EDTA·2 H <sub>2</sub> O	0,0125 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,008 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	0,518 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,3 g/L
Micronutrients	0,125 mL/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,354 g/L

La concentració de sulfat d'amoni era de 0,354 g/L per poder tenir una concentració d'amoni a l'entrada de 75 mg NH<sub>4</sub>-N/L, de manera que fos un corrent amb característiques mainstream. Pel que fa al bicarbonat sòdic, era requerit en el procés per millorar l'oxidació de l'amoni a nitrit ja que la relació HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> és el paràmetre que controla la ràtio molar NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Segons l'estequiometria (Eq. 4) la relació nitrit/amoni al cabal de sortida ha de ser 1,32NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Per aconseguir aquesta ràtio la relació bicarbonat/amoni al cabal d'entrada ha de ser de 1,16HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Gabarró, 2014; Ganigué et al., 2009). Per tal que el bicarbonat no fos una limitació, es preparava aigua sintètica amb una ràtio 2,3HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Per tant, la concentració de NaHCO<sub>3</sub> seria de 1,035 g/L. Tot i així, l'aigua sintètica era preparada amb aigua de xarxa la qual a Girona té una concentració de bicarbonat de 200 mg/L aproximadament. El fet que aquesta concentració ja fos alta feia que la ràtio encara fos més alta. És per això que a partir del 5 de maig l'aigua sintètica es preparava amb la meitat de concentració de NaHCO<sub>3</sub> obtenint una ràtio de 1,15, però que l'alcalinitat de l'aigua utilitzada ja compensa.

## Presa de mostres

Les mostres es prenen a l'entrada i a la sortida del reactor dues vegades a la setmana. Es mesurava el pH, la conductivitat, la salinitat, l'alcalinitat, la concentració de carboni inorgànic (IC) i les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat expressades en mg de nitrogen/L.

Cada mostra es filtrava amb un filtre de 0,2 µm de diàmetre de porus de la marca Millipore i un filtre de fibra de vidre per retenir la biomassa. El pH es mesurava amb un pH-Meter BASIC 20+ de la marca Crison, la conductivitat i la salinitat amb un EC-Meter BASIC 30+ de Crison i l'alcalinitat amb un aparell tritador Titromatic també de la casa Crison. La concentració d'amoni es mesurava amb un destil·lador Kjeldahl de la marca BÜCHI utilitzant el mètode amoni K-371. Pel que fa a les concentracions de nitrit i nitrat, es mesuraven per espectrofotometria gràcies a uns kits de la marca LANGE. El rang de detecció del nitrit a l'entrada era de 0,015 a 0,6 mg-N/L i a la sortida era de 0,6 a 6 mg-N/L. Pel nitrat, el rang de detecció a l'entrada era de 0,23 a 13,5 mg-N/L i a la sortida de 5 a 35 mg-N/L. En algunes ocasions, quan la concentració d'aquests anions era massa alta o massa baixa i no entrava dins el rang, s'utilitzava un cromatògraf iònic Dionex. Pel que fa al carboni inorgànic, es mesurava amb un cromatògraf de tipus HPLC (cromatografia líquida d'alta eficàcia).

Les dades obtingudes a partir del mostreig permetien tenir un control de les concentracions iòniques i dels diferents paràmetres importants pel procés del bioreactor. A més a més, també feien possible la determinació de la càrrega inicial de nitrogen (NLR - Nitrogen Loading Rate) (Eq. 6), de la velocitat d'eliminació del nitrogen (NRR - Nitrogen Removal Rate) (Eq. 7) i de la ràtio  $\text{NO}_3^-$  produït/ $\text{NH}_4^+$  eliminat (Eq. 8), el qual segons l'estequiometria de la reacció ha de ser 0,11.

$$\text{Equació 6. NLR} = \frac{\sum \text{Nitrogen a l'entrada}}{\text{TRH}} = \frac{\text{mg NH}_4^+ \text{-N/L} + \text{mg NO}_2^- \text{-N/L} + \text{mg NO}_3^- \text{-N/L}}{\text{TRH (d)}}$$

$$\text{Equació 7. NRR} = \frac{\sum \text{Nitrogen a l'entrada (mg-N/L)} - \sum \text{Nitrogen a la sortida (mg-N/L)}}{\text{TRH}}$$

$$\text{Equació 8. Ràtio} \frac{\text{NO}_3^- \text{ produït}}{\text{NH}_4^+ \text{ eliminat}} = \frac{\text{mg NO}_3^- \text{-N sortida/L} - \text{mg NO}_3^- \text{-N entrada/L}}{\text{mg NH}_4^+ \text{-N entrada/L} - \text{mg NH}_4^+ \text{-N sortida/L}}$$

## Determinació dels sòlids

La concentració de biomassa del bioreactor on tenia lloc el procés PN-A es calculava amb l'anàlisi dels sòlids en suspensió. Aquest càlcul també es realitzava a l'hora de fer assajos d'activitat dels diferents tipus de microorganismes funcionals en el procés d'oxidació de l'amoni a nitrogen gas. S'agafava mostra per duplicat dels diferents compartiments del reactor o bé del reactor en batch on tenia lloc l'assaig.

La mostra es passava per un equip de filtració al buit amb un filtre de fibra de vidre prèviament pesat. Seguidament, es posava el filtre en un portafiltres d'alumini i es posava a una estufa a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  durant 24

hores. Un cop transcorregut aquest temps, es tornava a pesar el filtre per tal de determinar la concentració de sòlids en suspensió totals (SST) (Eq. 9). Aquests corresponen als residus secs que queden retinguts al filtrar la mostra (APHA, 2005).

A continuació, es posava el filtre a la mufla on, un cop s'escalfava i arribava a la temperatura, estava 1 hora a 550°C. Al assolir aquesta temperatura tota la fracció orgànica es volatilitza, quedant només retinguda la part inorgànica. Per això, quan es refredava el filtre, es tornava a pesar i es calculava la concentració de sòlids en suspensió fixes (SSF) (Eq. 10). La porció de sòlids que s'ha volatilitzat es coneix amb el nom de sòlids en suspensió volàtils (SSV) (Eq. 11) i es considera que correspon a la biomassa.

$$\text{Equació 9. SST (g/L)} = \frac{\text{Pes filtre després de l'estufa (g)} - \text{Pes filtre abans de filtrar (g)}}{\text{Volum de la mostra (L)}}$$

$$\text{Equació 10. SSF (g/L)} = \frac{\text{Pes filtre després de la mufla (g)} - \text{Pes filtre abans de filtrar (g)}}{\text{Volum de la mostra (L)}}$$

$$\text{Equació 11. SSV (g/L)} = \text{SST (g/L)} - \text{SSF (g/L)}$$

### Assaigs d'activitat

Els microorganismes implicats en el tractament d'aigües residuals solen formar agregats amb estructura flocular més petits o bé de grànuls densos amb més diàmetre. Alguns estudis afirmen que aquests dos tipus d'agregats participen de forma diferent en el tractament d'aigües (Shi et al., 2016). Es considera que els grànuls amb un diàmetre més gran milloren l'eficiència del procés PN-A ja que l'activitat dels bacteris Anammox és més alta (Vlaeminck et al., 2010).

Per aquest motiu, els assaigs d'activitat dels bacteris AOB, NOB i Anammox es duen a terme fraccionant la biomassa amb un tamís de diàmetre de porus de 500 µm. La biomassa s'extreia del bioreactor on operava el procés PN-A i, un cop fraccionada, es rentava fins a tres vegades amb medi mineral (Taula 2). D'aquesta manera, s'eliminaven les possibles restes residuals que podien haver dissoltes dels components del reactor.

**Taula 2.** Components i concentracions de l'aigua mineral utilitzada en els assajos d'activitat dels microorganismes AOB, NOB i Anammox. Aquesta solució mineral s'utilitza per rentar la biomassa i també com a medi del reactor en batch on es realitzen els assajos d'activitat.

Component	Concentració
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0125 g/L
EDTA·2 H <sub>2</sub> O	0,0125 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,008 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	1 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,3 g/L
Micronutrients	0,125 mL/L

Els assajos es desenvolupaven en un reactor en batch de 5L a una temperatura de 30°C i amb una agitació de 250 rpm. En el cas dels AOB i NOB la saturació d'oxigen era del 85% per així evitar que l'O<sub>2</sub> fos un factor limitant. En canvi, pels Anammox, abans de començar l'assaig, es purgava amb CO<sub>2</sub> per aconseguir un ambient totalment anòxic.

Es van fer assajos pels tres tipus de microorganismes i per les dues fraccions de biomassa. Les condicions inicials de cada assaig es presenten a la Taula 3. Pels assajos AOB s'afegia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com a substrat amb una concentració de 40 mg-N/L (Kouba et al., 2016). Pels assajos NOB el substrat utilitzat era NaNO<sub>2</sub> amb una concentració de 12,17 mg-N/L. Per últim, en els assajos Anammox s'afegien els dos substrats amb les mateixes concentracions que pels assajos AOB i NOB.

**Taula 3.** Condicions d'operació en els assajos d'activitat pels bacteris AOB, NOB i Anammox. Les condicions són les mateixes tant pels assajos amb les partícules grans(∅>500µm) com pels de les partícules petites(∅ <500µm).

	<b>AOB</b>	<b>NOB</b>	<b>ANAMMOX</b>
<b>Tipus de reactor</b>	Batch	Batch	Batch
<b>Volum del reactor (L)</b>	5	5	5
<b>[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] a l'inici (mg-N/L)</b>	40	-	40
<b>[NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] a l'inici (mg-N/L)</b>	-	12,17	12,17
<b>pH</b>	7,5	7,5	7,15
<b>Temperatura (°C)</b>	30±0,3	30±0,3	30±0,3
<b>Saturació O<sub>2</sub> (%)</b>	85±5	85±5	0
<b>OD (mg O<sub>2</sub>/L)</b>	0,11	0,11	0
<b>Agitació (rpm)</b>	255	255	255

L'activitat específica es determina quantitativament a partir de la linealització de l'evolució de les concentracions de les espècies nitrogenades. El pendent de l'equació de la recta que s'obté correspon a la velocitat expressada en mg-N/L·h de consum o producció de l'amoni, nitrit i nitrat, respectivament. L'activitat específica es calcula dividint aquesta velocitat per la concentració de biomassa (SSV) utilitzada en l'assaig i s'expressa com a Kg N/Kg SSV·dia.



## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### Operació del reactor

El reactor nitrificació parcial/Anammox (PN-A) tracta aigua residual urbana per estudiar una nova alternativa per eliminar nitrogen autotròficament a la línia principal d'aigües. El repte principal d'aquest nou procés és treballar amb càrregues de nitrogen molt més baixes que les que són habituals en aquest tipus de tractament. Els paràmetres que es controlen per estudiar el procés PN-A es mesuren dues vegades per setmana. A la Taula 4 i a les Figures 2 i 3 es mostren els valors pel pH, salinitat, conductivitat, alcalinitat i carboni inorgànic analitzats des del 2 de març del 2017 fins al 24 de maig del 2017.

**Taula 4.** Mitjana dels valors obtinguts i les seves desviacions estàndard pel pH, la salinitat i la conductivitat. El control d'aquests paràmetres en el cabal d'entrada i de sortida es va fer dues vegades a la setmana des del 2 de març del 2017 fins al 24 de maig del 2017.

	<b>Entrada</b>	<b>Sortida</b>
<b>pH</b>	8,61±0,18	7,66±0,17
<b>Salinitat (mg NaCl/L)</b>	1169,5±92	1101,5±98,52
<b>Conductivitat (mS/cm)</b>	2,32±0,17	2,19±0,19

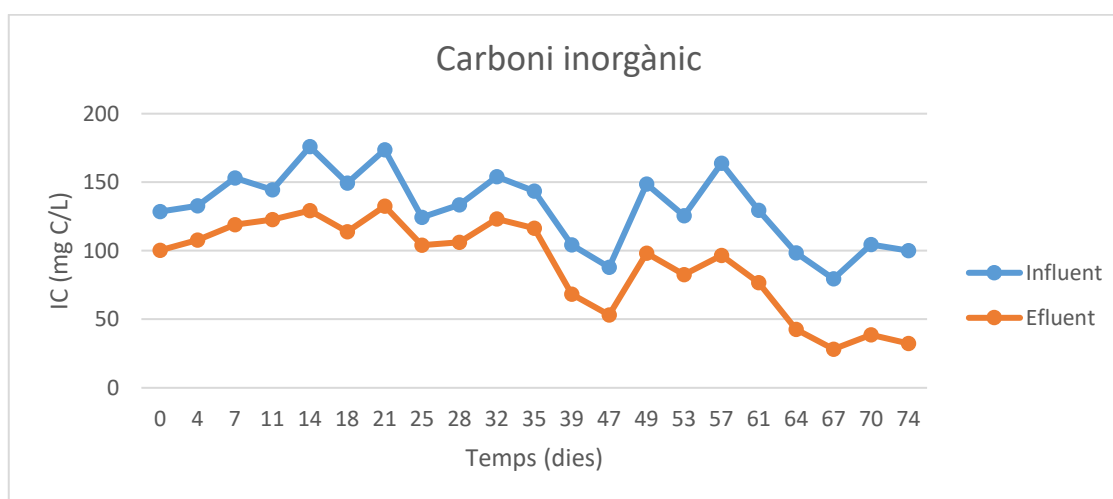
La salinitat és un paràmetre força controlat en el tractament d'aigües residuals ja que una concentració molt alta podria inhibir els microorganismes implicats. Els bacteris Anammox no es veuen afectats si la salinitat és <150 mM, és a dir, 8770 mg NaCl/L (Yi et al., 2011). El reactor estudiat presenta una concentració de sal que no varia gaire en comparació amb l'entrada i la sortida i en els dos casos es troba per sota de la concentració inhibidora.

El pH i la conductivitat també són controlats cada vegada que es pren mostra. El pH es veu disminuït durant la nitrificació parcial degut al consum d'alcalinitat. La conductivitat també es veu lleugerament disminuïda a causa del consum d'amoni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) i bicarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), els ions principals (Carvajal-Arroyo et al., 2016).

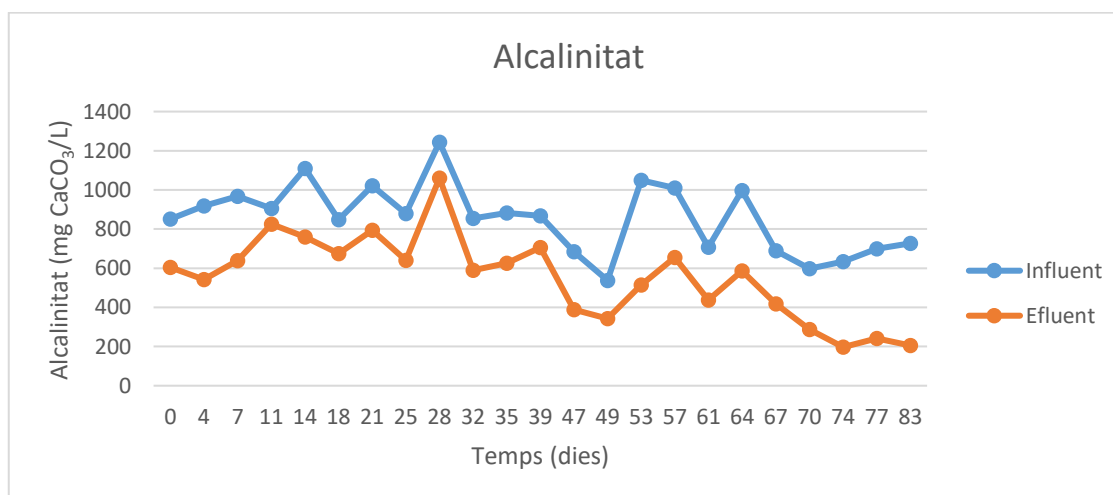
El carboni inorgànic es troba dins el bioreactor en forma de bicarbonat sòdic. Aquest bicarbonat és la font principal de carboni pels bacteris AOB i, a més, es consumeix durant la nitrificació per tal de neutralitzar el pH (Kimura et al., 2011). El bicarbonat també és el component principal de l'alcalinitat la qual s'expressa com a mg de CaCO<sub>3</sub>/L i que, com s'ha dit anteriorment, és el paràmetre que controla la ràtio molar NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> per aconseguir que només una part de l'amoni s'oxidi a nitrit per part dels AOB. A les Figures 2 i 3 s'observa l'evolució d'aquests dos paràmetres que, com a conseqüència de la relació entre ells, presenten la mateixa tendència al llarg del temps.

Per una banda, durant el primer mes d'estudi el carboni inorgànic a l'entrada oscil·la entre els 120-180 mg-C/L. Durant el principi del mes d'abril presenta un descens de la concentració probablement causat

per un error en la preparació de l'aigua sintètica d'entrada. A finals del mes d'abril la concentració torna a augmentar i, ja al final del seguiment (a partir del 5 de maig), el nivell torna a baixar en motiu de la disminució de la concentració de bicarbonat sodi a l'entrada (0,518 g/L). Per altra banda, la concentració de carboni a l'efluent es inferior ja que s'ha consumit durant el procés, però segueix la mateixa tendència. L'alcalinitat també segueix la mateixa tendència a l'entrada i a la sortida observant una disminució a partir del canvi de concentració de bicarbonat a l'entrada.



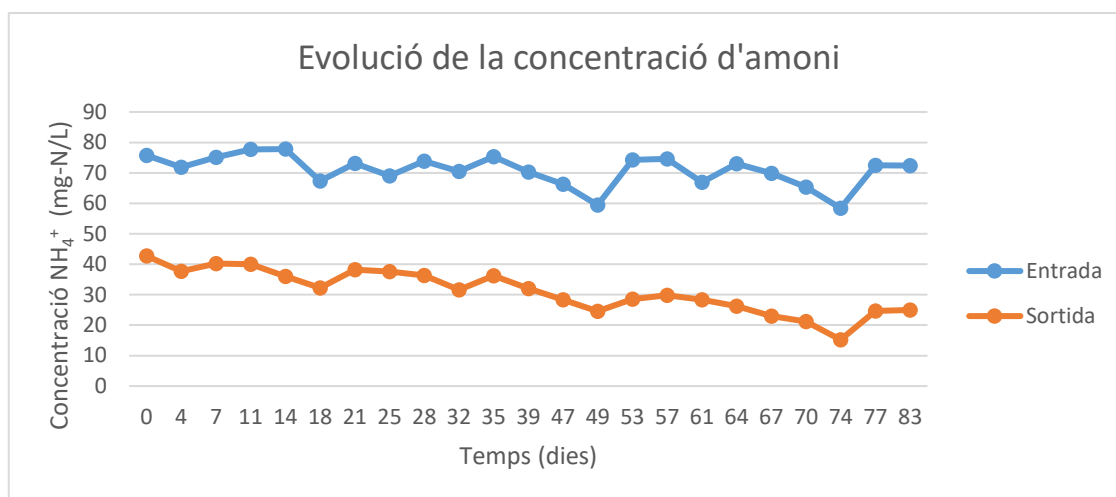
**Figura 2.** Evolució de la concentració de carboni inorgànic en el cabal d'entrada i en el cabal de sortida expressada en mg C/L. La mesura es fa dues vegades a la setmana des del 2 de març del 2017 fins al 24 de maig del 2017.



**Figura 3.** Evolució de l'alcalinitat en el cabal d'entrada i en el cabal de sortida expressada en mg CaCO<sub>3</sub>/L. Es mesura dues vegades a la setmana des del 2 de març del 2017 fins al 24 de maig del 2017.

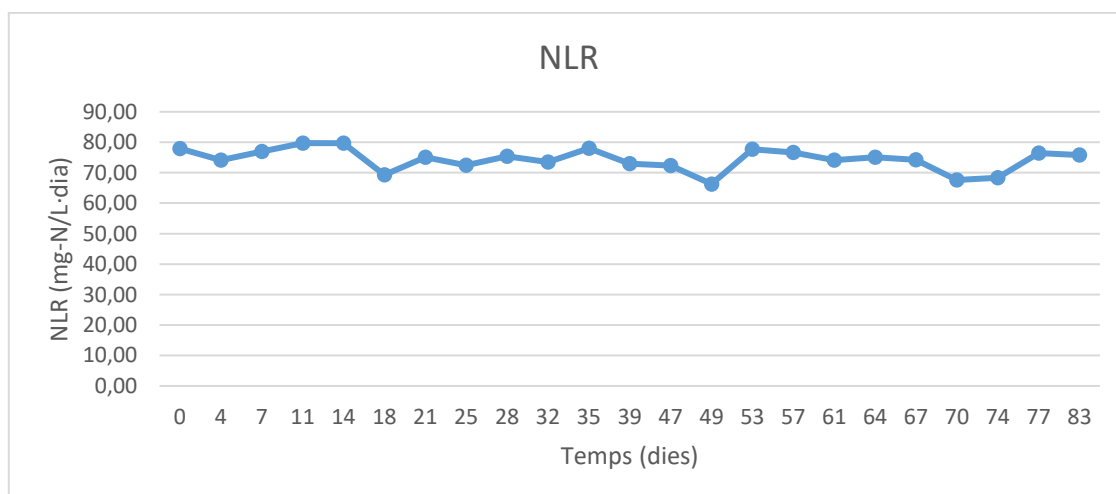
L'eficiència del reactor es comprova mesurant les concentracions de les espècies nitrogenades en el corrent d'entrada i sortida. Les aigües municipals després d'un tractament previ quan entren a un sistema mainstream PN-A solen tenir una concentració d'amoni a l'entrada de 75 mg-N/L. Encara que la quantitat de sulfat d'amoni en el cabal d'entrada ha estat calculada per tenir aquesta concentració, a la Figura 4

s'observa que a l'entrada mai s'ha obtingut una concentració d'amoni estable variant en un rang entre 58,41 i 77,81 mg-N/L degut als elevats volums que es preparaven d'aigua sintètica. La concentració d'amoni a la sortida s'ha mantingut entre 15,21 i 42,71 mg-N/L. Tot i les variacions en les concentracions, la tendència de la concentració als corrents d'entrada i sortida és la mateixa. Per tant, durant tot el seguiment s'ha estat consumint la mateixa proporció d'amoni.



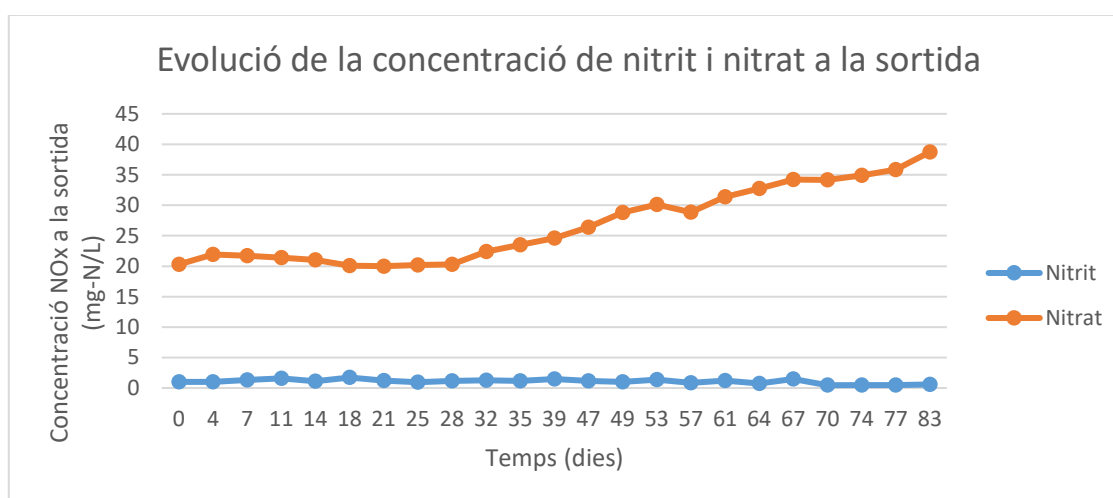
**Figura 4.** Evolució de la concentració d'amoni en el cabal d'entrada i en el cabal de sortida expressada en mg-N/L. La concentració es mesura dues vegades a la setmana des del 2 de març del 2017 fins al 24 de maig del 2017.

El nitrit i el nitrat no s'afegeixen en el cabal d'entrada, la presència d'aquestes espècies nitrogenades a l'aliment és deguda a que es troben en baixa concentració a l'aigua de xarxa utilitzada per preparar l'aliment sintètic. Per tant, la càrrega inicial de nitrogen (NLR) que es mostra a la Figura 5 amb uns valors entre 66,3 i 79,72 mg-N/L-dia prové pràcticament tota de l'amoni a l'entrada.

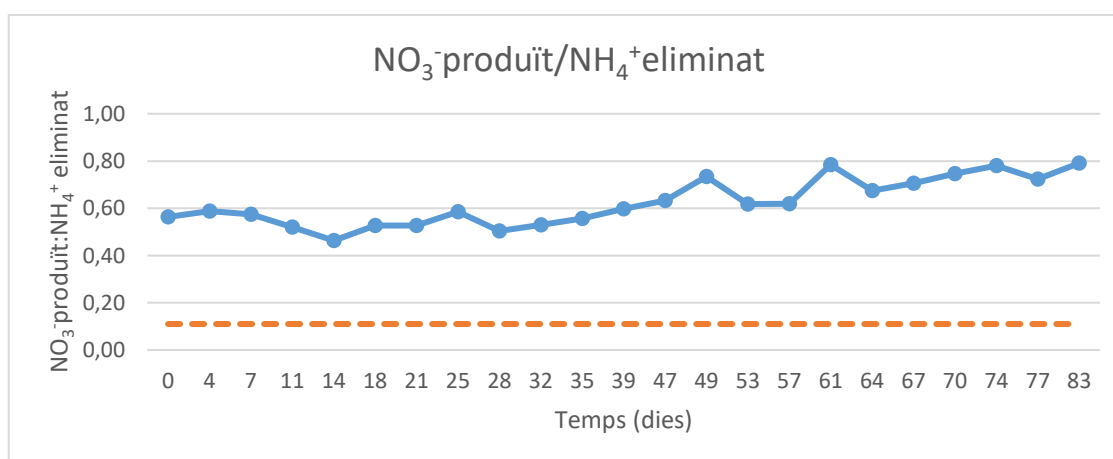


**Figura 5.** Seguiment de la càrrega inicial de nitrogen (NLR) que entra al bioreactor calculada a partir de les concentracions d'entrada d'amoni, nitrit i nitrat que s'han mesurat dues vegades a la setmana des del 2 de març del 2017 fins al 24 de maig del 2017.

En relació a possibles productes formats (nitrit i nitrat), a la Figura 6 es mostra la concentració d'aquests components a l'efluent. La concentració de nitrit a la sortida és pròxima als 0 mg-N/L, per la qual cosa gairebé tot el  $\text{NO}_2^-$  format pels AOB s'ha consumit. La concentració de nitrat a la sortida hauria de ser molt baixa segons l'estequiometria de l'oxidació autotròfica del nitrogen. Malgrat això, durant el seguiment del bioreactor la concentració de nitrat a la sortida es troba al voltant dels 20 mg-N/L i a partir del mes d'abril comença a augmentar fins a ser pròxima als 40 mg-N/L. Si apart d'això es té en compte la relació  $\text{NO}_3^-$  produït/ $\text{NH}_4^+$  eliminat que es presenta a la Figura 7, es pot considerar la presència de bacteris NOB ja que la ràtio segons l'estequiometria del procés Anammox (Eq. 5) és de 0,11. Per tant, el nitrit que és produït dins del reactor és consumit tant per part dels Anammox com pels NOB.

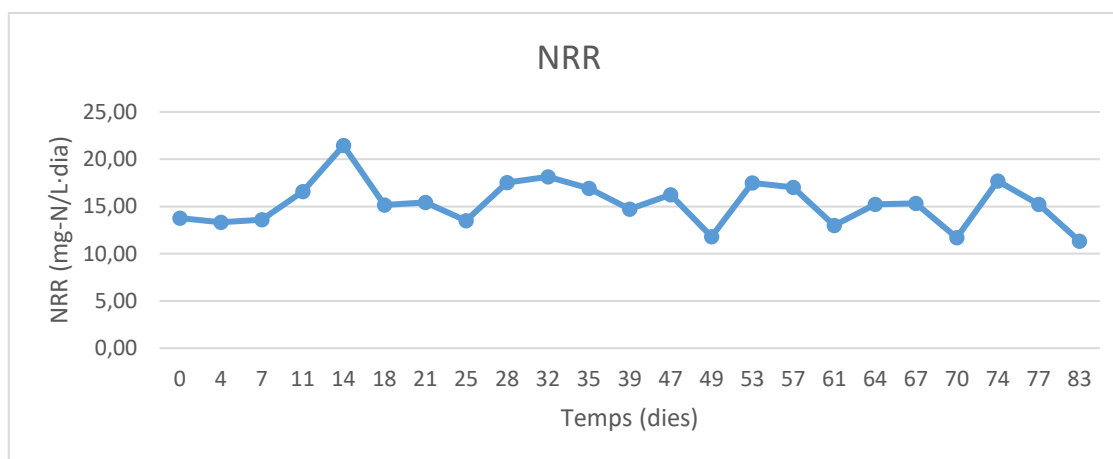


**Figura 6.** Evolució de la concentració de nitrit i nitrat en el cabal de sortida expressada en mg-N/L. Es mesura la concentració dues vegades a la setmana des del 2 de març del 2017 fins al 24 de maig del 2017.



**Figura 7.** Evolució de la ràtio  $\text{NO}_3^-$  produït/ $\text{NH}_4^+$  eliminat calculat a partir de les concentracions de les dues espècies nitrogenades mesurades els dies de presa de mostra. La línia discontinua a 0,11 indica el valor teòric de la ràtio segons l'estequiometria del procés PN-A.

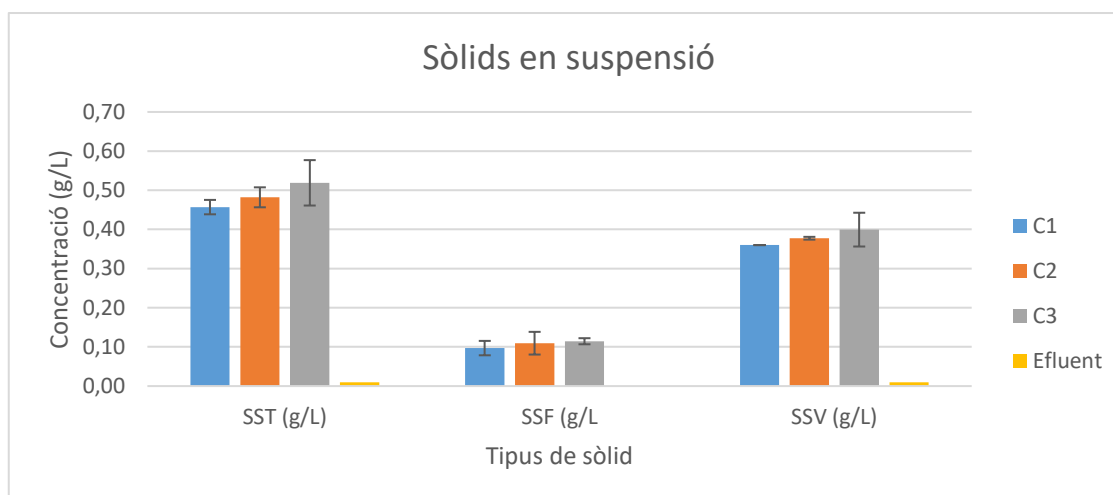
La possible presència de NOB fa que l'eficiència del procés PN-A no sigui gaire alta ja que aquests bacteris tenen una velocitat de creixement i una afinitat pel nitrit superior als Anammox (Kouba et al., 2016). És per això que la velocitat d'eliminació de nitrogen (NRR) observada a la Figura 8 no presenta valors alts ni estables considerant que no s'oxida tot l'amoni, el nitrit i el nitrat de l'entrada a nitrogen gas, sinó que es forma més nitrat com a producte final.



**Figura 8.** Seguiment de la velocitat d'eliminació de nitrogen (NRR) calculada a partir de la diferència entre les concentracions a l'entrada i a la sortida de l'amoni, el nitrit i el nitrat. El paràmetre NRR s'ha mesurat dues vegades a la setmana des del 2 de març del 2017 fins al 24 de maig del 2017.

### Sòlids en suspensió en el reactor

Conèixer la concentració de sòlids en suspensió permet saber la biomassa que hi ha al reactor. Les mostres s'han pres als quatre compartiments dues vegades durant l'avaluació del sistema PN-A. Els resultats dels sòlids en suspensió totals, fixes i volàtils es representen a la Figura 9. Les concentracions són similars en els tres primers compartiments encara que augmenten lleugerament en el segon i el tercer. Tot i això, en l'efluent la concentració és 0 g/L o pròxima a 0 g/L ja que és el compartiment on hi ha el sedimentador que separa la biomassa. Els sòlids volàtils són els que corresponen a la concentració de biomassa. La mitjana dins dels tres primers compartiments és de  $0,38 \pm 0,02$  g/L, valor massa baix ja que estudis que han assolit 73 mg-N/L·dia de velocitat d'eliminació del nitrogen, partien d'una concentració de sòlids en suspensió de 4,9 g/L (Miao et al., 2016).



**Figura 9.** Concentracions dels sòlids en suspensió totals, fixes i volàtils expressades en g/L per cada compartiment del bioreactor. Les mesures s'han fet dues vegades durant l'estudi del sistema PN-A, el 7 de març i el 24 d'abril del 2017. Al gràfic s'expressen les mitjanes i desviacions estàndard calculades amb els valors obtinguts els dos dies de presa de mostra.

Per altra banda, aquests sòlids estaven agregats en forma de grànuls de manera que, possiblement, s'establís un consorci entre l'activitat de diferents microorganismes. A més, la mida dels grànuls pot influir considerablement en l'activitat global del grànul atesa la importància dels fenòmens de transport de matèria (difusió de l'oxigen i conversió de les espècies nitrogenades).

## Assaigs d'activitat

### Partícules amb diàmetre inferior a 500µm

Per tal de determinar l'activitat específica dels bacteris AOB es requereix determinar la velocitat de consum de l'amoni així com la velocitat de producció de nitrit, ja que aquests microorganismes tenen com a funció oxidar l'amoni a nitrit. A més, controlant la producció de nitrat es pot determinar la presència de bacteris NOB.

Per avaluar l'activitat AOB en partícules petites (diàmetre inferior a 500 µm) es va realitzar un experiment en batch on es feia el seguiment de les espècies nitrogenades amb el temps. La concentració inicial de biomassa va ser de  $0,38 \pm 0,07$  g SSV/L i la concentració inicial d'amoni de  $35,54 \pm 0,1$  mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L, de manera que el substrat no fos limitant (Taula 5). El sistema es mantenia airejat amb una concentració mitjana d'OD de  $0,11$  mg O<sub>2</sub>/L, per a promoure l'activitat AOB.

**Taula 5.** Condicions inicials en l'assaig d'activitat AOB per partícules de menys de 500  $\mu\text{m}$ . S'expressen els valors dels sòlids en suspensió total (SST), sòlids en suspensió fixes (SSF), sòlids en suspensió volàtils (SSV) i les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat.

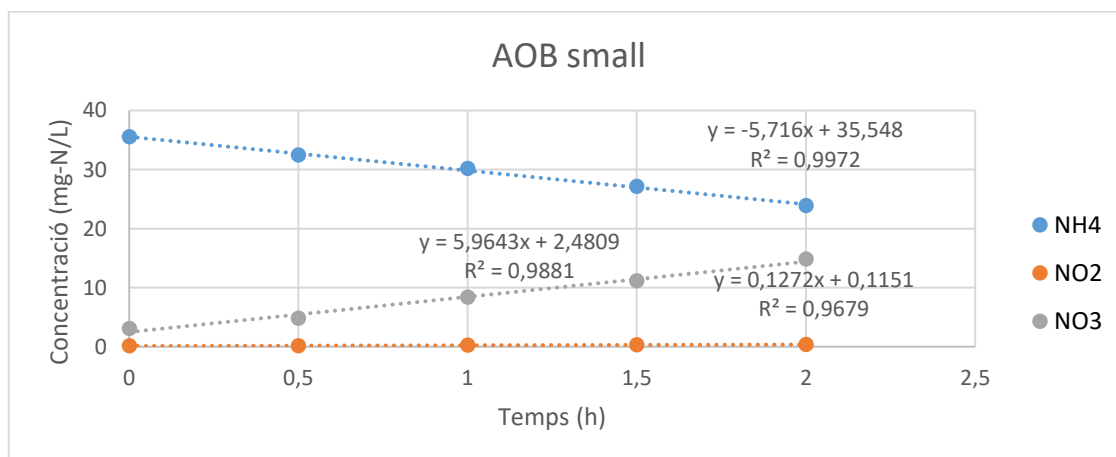
	Condicions a temps zero
SST (g/L)	0,54 $\pm$ 0,1
SSF (g/L)	0,17 $\pm$ 0,03
SSV (g/L)	0,38 $\pm$ 0,07
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg-N/L)	35,54 $\pm$ 0,1
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg-N/L)	0,1243
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg-N/L)	3,0956

A la taula 6 es presenten els resultats de la concentració d'amoni, nitrit i nitrat en diferents temps de l'assaig.

**Taula 6.** Valors de les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat obtingudes en l'assaig d'activitat dels bacteris AOB amb un diàmetre inferior als 500  $\mu\text{m}$ .

Mostra	Temps (h)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg-N/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/L)
T0	0	35,54 $\pm$ 0,1	0,1243	3,0956
T1	0,5	32,44 $\pm$ 0,78	0,1584	4,7835
T2	1	30,145 $\pm$ 0,06	0,2633	8,3631
T3	1,5	27,13 $\pm$ 0,14	0,2876	11,1715
T4	2	23,905 $\pm$ 0,62	0,3777	14,8123

Analitzant els resultats es pot veure de forma general que la concentració d'amoni disminueix amb el temps, fet que indica activitat AOB. Per avaluar quantitativament aquesta activitat, a la Figura 10 es presenta l'evolució de les espècies nitrogenades i l'equació matemàtica corresponent a la linealització.



**Figura 10.** Evolució del consum d'amoni i la producció de nitrit i nitrat durant l'assaig d'activitat dels bacteris AOB amb un diàmetre inferior als 500  $\mu\text{m}$ .

El pendent de cada recta de regressió obtingut per l'amoni, el nitrit i el nitrat equival a la velocitat de consum o producció, respectivament. Els resultats es recullen a la Taula 7.

**Taula 7.** Activitats específiques dels bacteris AOB amb un diàmetre inferior als 500 µm i una concentració de biomassa de 0,38 g SSV/L pel que fa al consum d'amoni i a la producció de nitrit i nitrat.

	<b>Velocitat (mg-N/L·h)</b>	<b>Velocitat (mg-N/L·dia)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b>Activitat específica (Kg N/Kg SSV·dia)</b>
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	5,716	137,184	0,38	0,361
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	0,1272	3,0528	0,38	0,008
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	5,9643	143,1432	0,38	0,377

Tal i com es mostra a la Taula 7, l'activitat específica de consum d'amoni pels AOB és pràcticament igual a l'activitat específica de producció de nitrat (0,361 i 0,377 Kg N/Kg SSV-d, respectivament). En canvi, l'activitat específica de consum de nitrit és gairebé 0 (0,008 Kg N/Kg SSV-d).

Per tant, l'assaig d'activitat permet determinar que en els grànuls hi ha activitat AOB i NOB. És a dir, es dona una primera etapa de consum d'amoni on es forma nitrit (nitritació per part dels AOB) i un següent pas on els NOB consumeixen el nitrit i l'oxigen a nitrat (nitratació). Aquestes dues velocitats de consum són molt similars, el que indica que en aquestes partícules petites l'activitat anammox sigui baixa i es promogui el creixement de NOB. Aquest fet és degut a què en partícules petites l'oxigen es difon en tot el grànul estimulant l'activitat NOB i inhibint l'activitat anammox.

La presència de NOB també es va confirmar fent l'assaig d'activitat en batch sense afegir amoni com a substrat. Les condicions inicials de l'experiment es mostren a la Taula 8. La concentració de biomassa era de 0,32±0,05g SSV/L i la mitjana d'OD dins el reactor va ser de 0,11mg O<sub>2</sub>/L., igual que en l'assaig per AOB en partícules petites.

**Taula 8.** Condicions inicials en l'assaig d'activitat NOB per partícules de menys de 500 µm. S'expressen els valors dels sòlids en suspensió total (SST), sòlids en suspensió fixes (SSF), sòlids en suspensió volàtils (SSV) i les concentracions inicials de nitrit i nitrat.

	<b>Condicions a temps zero</b>
<b>SST (g/L)</b>	0,48±0,12
<b>SSF (g/L)</b>	0,16±0,07
<b>SSV (g/L)</b>	0,32±0,05
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg-N/L)</b>	11,5345
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg-N/L)</b>	2,7684

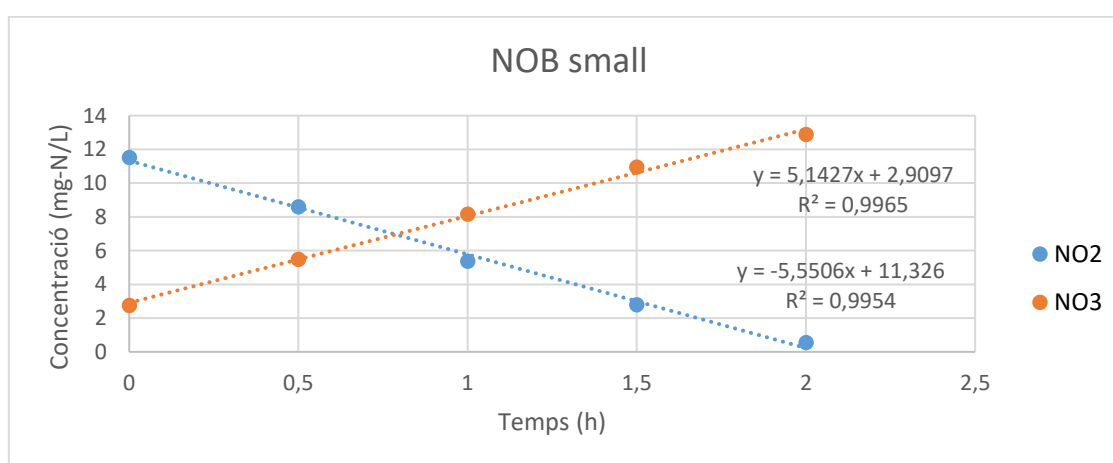
L'evolució de les espècies nitrogenades amb el temps es mostra a la Taula 9. En el cas dels bacteris NOB no es fa el seguiment de l'amoni ja que no intervé en el procés.



**Taula 9.** Valors de les concentracions de nitrit i nitrat obtingudes en l'assaig d'activitat dels bacteris NOB amb un diàmetre inferior als 500 µm.

Mostra	Temps (h)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/L)
T0	0	11,5345	2,7684
T1	0,5	8,604	5,4873
T2	1	5,3835	8,1605
T3	1,5	2,7924	10,9541
T4	2	0,5638	12,8918

Com era d'esperar, al cap de dues hores d'assaig el nitrit afegit al inici de l'assaig es va consumir fins ser pròxim a 0 mg-N/L i es va anar produint nitrat. Amb la linealització de l'evolució de les concentracions que es presenten a la Figura 11 es pot determinar quantitativament la velocitat de consum i producció dels dos anions.

**Figura 11.** Evolució del consum de nitrit i producció de nitrat durant l'assaig d'activitat dels bacteris NOB amb un diàmetre inferior als 500 µm. La linealització de les concentracions al llarg del temps de l'assaig permet obtenir l'equació matemàtica i determinar les velocitats de consum o producció.

A la taula 10 apareixen els resultats de l'activitat específica dels NOB corresponent al consum de nitrit i a la producció de nitrat.

**Taula 10.** Activitats específiques dels bacteris NOB amb un diàmetre inferior als 500 µm i una concentració de biomassa de 0,32g SSV/L pel que fa al consum de nitrit i a la producció de nitrat.

	Velocitat (mg-N/L·h)	Velocitat (mg-N/L·dia)	Biomassa (g/L)	Activitat específica (Kg N/Kg SSV·dia)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5,5506	133,2144	0,32	0,416
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5,1427	123,4248	0,32	0,386

L'activitat específica de consum de nitrit i la de producció de nitrat són força similars (0,416 i 0,386 Kg N/Kg SSV·d, respectivament). Tanmateix, l'activitat específica de producció de nitrat en l'assaig AOB amb un diàmetre <500 µm és 0,377 Kg N/Kg SSV·d (Taula 7). Conseqüentment, es pot afirmar la presència de bacteris NOB en les partícules amb un diàmetre inferior als 500 µm i, a part d'això, es confirma que

l'oxidació de l'amoni a nitrat es fa a través de dues etapes ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ) ja que quan només hi ha nitrit al inici també es forma  $\text{NO}_3^-$ .

Els bacteris Anammox són bacteris anaerobis que oxiden l'amoni utilitzant el nitrit com a acceptor d'electrons. Per determinar l'activitat específica d'aquests microorganismes es va fer un assaig per duplicat en batch. La concentració de biomassa inferior als 500  $\mu\text{m}$  utilitzada per l'assaig va ser de 0,56 g SSV/L mentre que la concentració d'OD va ser de 0 g  $\text{O}_2/\text{L}$  per assolir un ambient completament anòxic. A la Taula 11 es mostren les condicions a temps zero de l'assaig.

**Taula 11.** Condicions inicials en l'assaig d'activitat Anammox per partícules de menys de 500  $\mu\text{m}$ . S'expressen els valors dels sòlids en suspensió total (SST), sòlids en suspensió fixes (SSF), sòlids en suspensió volàtils (SSV) i les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat a temps zero.

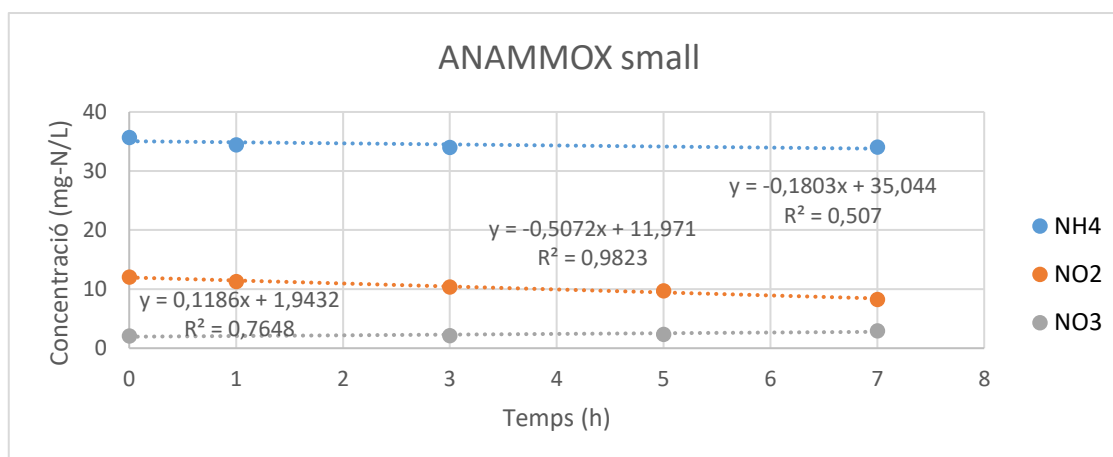
	Condicions a temps zero
<b>SST (g/L)</b>	0,69±0,08
<b>SSF (g/L)</b>	0,14±0,01
<b>SSV (g/L)</b>	0,56±0,08
<b><math>\text{NH}_4^+</math> (mg-N/L)</b>	35,69±0,68
<b><math>\text{NO}_2^-</math> (mg-N/L)</b>	12,04±0,26
<b><math>\text{NO}_3^-</math> (mg-N/L)</b>	2,09±0,05

Les concentracions de les tres espècies nitrogenades en el temps es presenten a la Taula 12.

**Taula 12.** Valors de les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat obtingudes en l'assaig d'activitat dels bacteris Anammox amb un diàmetre inferior als 500  $\mu\text{m}$ .

Mostra	Temps (h)	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mg-N/L)	$\text{NO}_2^-\text{-N}$ (mg-N/L)	$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mg-N/L)
T0	0	35,689±0,68	12,041±0,26	2,086±0,05
T1	1	34,437±0,66	11,318±0,2	-
T2	3	34,016±0,18	10,394±0,04	2,137±0,03
T3	5	-	9,740±0,43	2,361±0,14
T4	7	34,052±0,59	8,248±0,14	2,969±0,04

La Figura 12 mostra gràficament l'evolució de les tres espècies nitrogenades. Per aconseguir una linealització amb un coeficient de correlació el més alt possible s'ha eliminat el valor de la concentració d'amoni a les 5 hores i el de la concentració de nitrit a una hora des de l'inici de l'assaig. L'error d'aquests valors pot ser causat per un error en l'aparell de mesura o bé per un error humà al preparar la dilució o al obtenir la mostra.



**Figura 12.** Evolució del consum d'amoni i nitrit i de la producció de nitrat durant l'assaig d'activitat dels bacteris Anammox amb un diàmetre inferior als 500µm. La linealització de les concentracions al llarg del temps de l'assaig permet determinar les velocitats de consum o producció de cada espècie.

Tot i descartar aquests dos valors, el coeficient de correlació pel consum d'amoni i per la producció de nitrat és baix. Encara que els microorganismes consumeixen l'amoni i el nitrit i produeixen nitrat, ho fan a velocitats molt baixes, tal i com es mostra a la Taula 13.

**Taula 13.** Activitats específiques de l'assaig dels bacteris Anammox amb un diàmetre inferior als 500 µm i una concentració de biomassa de 0,56 g SSV/L pel que fa al consum d'amoni i nitrit i a la producció de nitrat.

	Velocitat (mg-N/L·h)	Velocitat (mg-N/L·dia)	Biomassa (g/L)	Activitat específica (Kg N/Kg SSV·dia)
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0,18	4,32	0,56	0,008
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	0,5072	12,1728	0,56	0,022
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	0,1186	2,8464	0,56	0,005

A partir de les activitats específiques es calcula la ràtio experimental de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>produït/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>eliminat (0,005/0,008) el qual és de 0,625 Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/Kg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N. La ràtio NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(0,022/0,008) és de 2,75 Kg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/Kg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N. Els dos valors s'allunyen molt de la ràtio estequiomètrica que hauria de ser 0,11NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> i 1,32 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Així doncs, tenint en compte que les tres espècies nitrogenades tenen una activitat específica de gairebé 0 Kg N/Kg SSV·dia, els resultats obtinguts no són significatius. Probablement no es detecta activitat Anammox perquè la fracció de biomassa utilitzada és la part flocular, la qual no conté grànuls densos on l'activitat Anammox és més alta.

### Partícules amb diàmetre superior a 500µm

L'activitat dels bacteris AOB en partícules grans de diàmetre >500 µm es va avaluar també en un assaig en batch per duplicat. A la Taula 14 es presenten les condicions en el moment inicial de l'experiment on

la concentració inicial d'amoni era de  $36,25 \pm 0,01$  mg-N/L. La concentració de biomassa era de  $0,07 \pm 0,04$  g SSV/L i la mitjana d'OD al reactor era de  $0,11$  mg  $O_2$ /L.

**Taula 14.** Condicions inicials en l'assaig d'activitat AOB per partícules superiors als 500  $\mu\text{m}$ . S'expressen els valors dels sòlids en suspensió total (SST), sòlids en suspensió fixes (SSF), sòlids en suspensió volàtils (SSV) i les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat al inici.

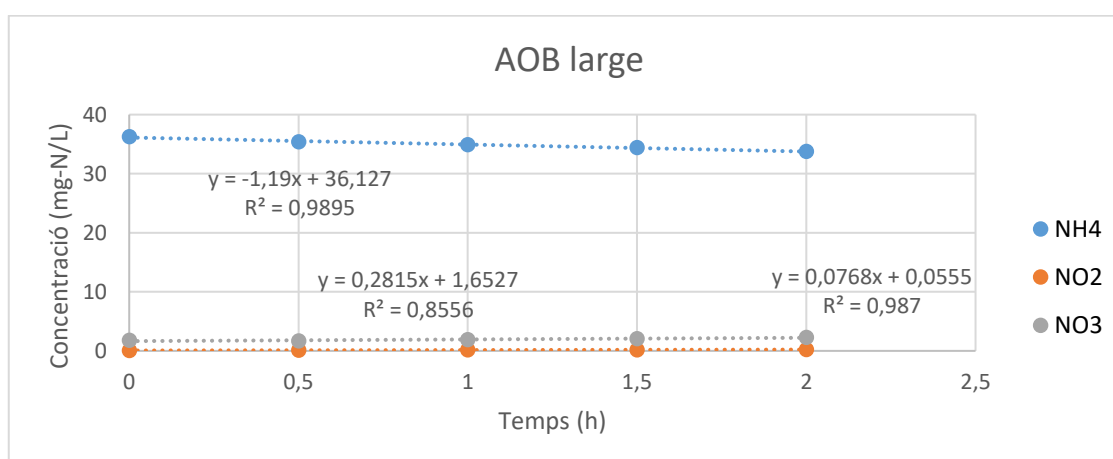
	Condicions a temps zero
SST (g/L)	$0,08 \pm 0,05$
SSF (g/L)	$0 \pm 0,01$
SSV (g/L)	$0,07 \pm 0,04$
$NH_4^+$ (mg-N/L)	$36,25 \pm 0,01$
$NO_2^-$ (mg-N/L)	0,0476
$NO_3^-$ (mg-N/L)	1,7667

L'evolució de les espècies nitrogenades al llarg del temps es mostra a la Taula 15.

**Taula 15.** Valors de les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat obtingudes en l'assaig d'activitat dels bacteris AOB amb un diàmetre superior als 500  $\mu\text{m}$ .

Mostra	Temps (h)	$NH_4^+$ -N (mg-N/L)	$NO_2^-$ -N (mg-N/L)	$NO_3^-$ -N (mg-N/L)
T0	0	$36,245 \pm 0,01$	0,0476	1,7667
T1	0,5	$35,405 \pm 0,12$	0,0989	1,6848
T2	1	$34,87 \pm 0,01$	0,1413	1,8824
T3	1,5	$34,385 \pm 0,19$	0,1696	2,0491
T4	2	$33,78 \pm 0,79$	0,2042	2,2884

Es pot observar que la concentració d'amoni disminueix al llarg de les dues hores d'assaig mentre que la concentració de nitrit es manté gairebé a 0 mg  $NO_2^-$ -N/L i la de nitrat pràcticament no augmenta. La linealització i l'equació matemàtica per determinar quantitativament les activitats específiques es mostren a la Figura 13.



**Figura 13.** Evolució del consum d'amoni i la producció de nitrit i nitrat durant l'assaig d'activitat dels bacteris AOB amb un diàmetre superior als 500  $\mu\text{m}$ . La linealització de les concentracions al llarg del temps de l'assaig permet determinar les velocitats de consum o producció.

A la Taula 16 s'indiquen els resultats de les activitats específiques dels bacteris AOB en partícules grans. L'activitat de producció de nitrit i nitrat és molt baixa en comparació a l'activitat específica de consum d'amoni.

**Taula 16.** Activitats específiques de l'assaig dels bacteris AOB en partícules superiors als 500µm de diàmetre i una concentració de biomassa de 0,07g SSV/L pel que fa al consum d'amoni i a la producció de nitrit i nitrat.

	<b>Velocitat (mg-N/L·h)</b>	<b>Velocitat (mg-N/L·dia)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b>Activitat específica (Kg N/Kg SSV·dia)</b>
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	1,19	28,56	0,07	0,408
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	0,0768	1,8432	0,07	0,026
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	0,2815	6,756	0,07	0,097

Els bacteris AOB de les partícules grans presenten una activitat específica de consum d'amoni de 0,408 Kg N/Kg SSV·dia molt similar als AOB de les partícules més petites amb un consum de 0,361 Kg N/Kg SSV·dia (Taula 7). Pel contrari, l'activitat específica de producció de nitrat és molt més baixa en les partícules grans essent de 0,026 Kg N/Kg SSV·dia, mentre que en les partícules petites és similar a l'activitat de consum d'amoni. La producció de nitrit es manté igual en les dues mides de partícules, encara que lleugerament superior en les grans.

La diferència entre l'activitat específica de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> i de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i el fet que l'activitat de producció de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sigui tan baixa (0,026 Kg N/Kg SSV·dia), indiquen la possibilitat de que hi hagi coexistència de microorganismes AOB i Anammox en les partícules grans. El consum d'amoni és el mateix en les dues mides de partícula, però en les partícules petites, en les quals s'ha comprovat la presència de bacteris NOB; la producció de nitrat iguala el consum d'amoni. En canvi, en les partícules grans aquestes dues activitats no s'igualen i la concentració de nitrat no augmenta amb el temps, de manera que no hi ha producció de nitrat per part dels NOB.

Tot i això, el nitrit que els AOB produeixen presenta concentracions al voltant de 0 mg-N/L durant tot l'assaig. Per tant, els AOB consumeixen amoni i produeixen nitrit que és consumit pels Anammox. Aquests bacteris, tot i ser anaerobis i trobar-se en un ambient anòxic, poden actuar ja que la difusió de l'oxigen arriba fins a una màxim de 200µm per la qual cosa, al ser partícules amb diàmetre superior, l'O<sub>2</sub> no arriba a l'interior dels grànuls donant un ambient anòxic propici per a l'activitat Anammox.

La coexistència de bacteris AOB i Anammox i que no hi hagi presència de NOB es pot confirmar amb l'assaig d'activitat dels NOB en partícules grans. L'experiment també es va realitzar en un batch sota les mateixes condicions que l'assaig per AOB, però sense amoni i amb una concentració inicial de nitrit de 10,75 mg-N/L. La biomassa tenia una concentració de 0,07±0,01g SSV/L i l'OD era de 0,11 mg O<sub>2</sub>/L. Les condicions inicials apareixen a la Taula 17.

**Taula 17.** Condicions inicials en l'assaig d'activitat NOB per partícules superiors als 500 µm. S'expressen els valors dels sòlids en suspensió total (SST), sòlids en suspensió fixes (SSF), sòlids en suspensió volàtils (SSV) i les concentracions de nitrit i nitrat al començament de l'experiment.

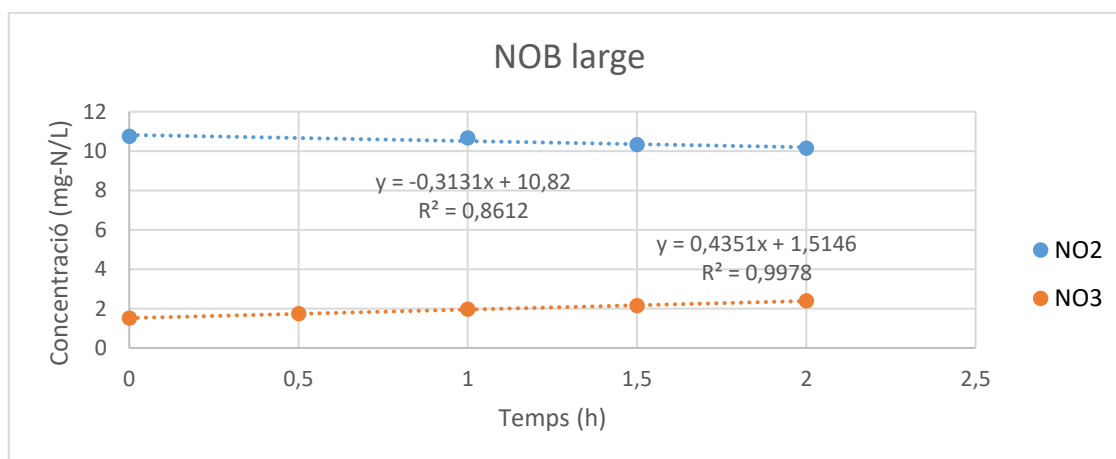
	Condicions a temps zero
SST (g/L)	0,07±0,02
SSF (g/L)	0
SSV (g/L)	0,07±0,01
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg-N/L)	10,7488
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg-N/L)	1,5025

A la taula 18 es presenten les concentracions de nitrit i nitrat durant l'assaig. Es descarta la concentració de nitrit al cap d'una hora d'experiment perquè es desvia en la linealització.

**Taula 18.** Valors de les concentracions de nitrit i nitrat obtingudes en l'assaig d'activitat dels bacteris NOB amb un diàmetre superior als 500 µm.

Mostra	Temps (h)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/L)
T0	0	10,7488	1,5025
T1	0,5	-	1,7429
T2	1	10,6664	1,968
T3	1,5	10,3186	2,1466
T4	2	10,1386	2,3885

La figura 14 mostra gràficament l'evolució de la concentració de les dues espècies nitrogenades analitzades i la seva linealització.



**Figura 14.** Evolució del consum de nitrit i la producció de nitrat durant l'assaig d'activitat dels bacteris NOB amb un diàmetre superior als 500 µm. La linealització de les concentracions al llarg del temps de l'assaig permet determinar les velocitats de consum o producció.

Tal i com es mostra a la Taula 19, l'activitat de consum de nitrit és força igual a l'activitat de producció de nitrat essent 0,107 i 0,149 Kg N/Kg SSV-dia, respectivament. Malgrat això, les activitats específiques de consum de nitrit i producció de nitrat en l'assaig d'activitat dels NOB en partícules petites és aproximadament 4 vegades superior (Taula 10) per la qual cosa es considera que l'activitat NOB en les partícules de diàmetre >500 µm és molt baixa.

**Taula 19.** Activitats específiques de l'assaig dels bacteris NOB amb un diàmetre superior als 500µm i una concentració de biomassa de 0,07g SSV/L pel que fa al consum de nitrit i a la producció de nitrat.

	Velocitat (mg-N/L·h)	Velocitat (mg-N/L·dia)	Biomassa (g/L)	Activitat específica (Kg N/Kg SSV·dia)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,313	7,512	0,07	0,107
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,4351	10,4424	0,07	0,149

Així doncs, l'assaig dels NOB confirma que l'activitat per part d'aquests microorganismes en les partícules grans no té gaire influència i que, per tant, hi ha coexistència de bacteris AOB i Anammox.

En quant a l'activitat Anammox en les partícules grans, l'assaig en batch per duplicat es va iniciar amb una concentració d'amoni de 34,65 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L i de nitrit de 11,73±0,01 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/L. El sistema tenia una concentració de biomassa de 0,12±0,06 g SSV/L i no era airejat per mantenir el metabolisme anaerobi. Les condicions inicials de l'experiment es recullen a la Taula 20.

**Taula 20.** Condicions inicials en l'assaig d'activitat Anammox per partícules de més de 500 µm. S'expressen els valors dels sòlids en suspensió total (SST), sòlids en suspensió fixes (SSF), sòlids en suspensió volàtils (SSV) i les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat a temps zero.

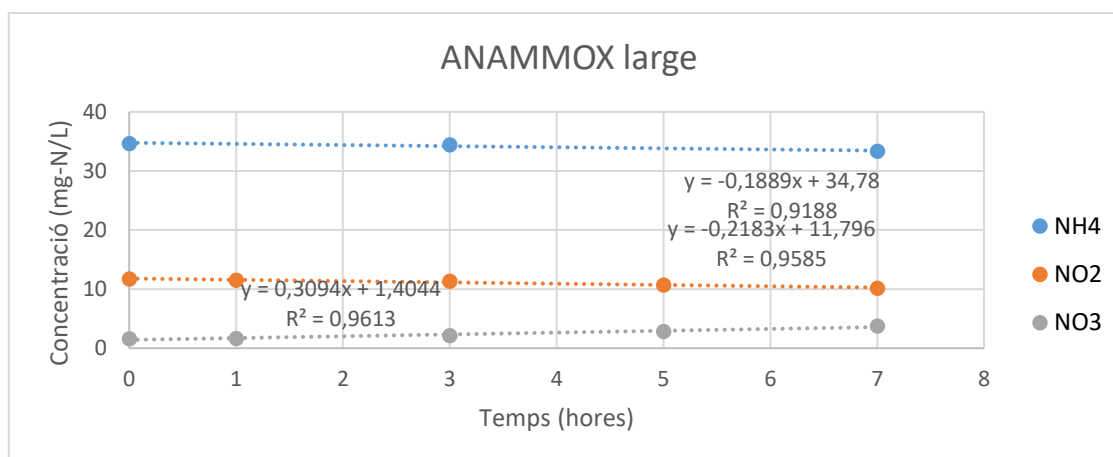
	Condicions a temps zero
SST (g/L)	0,15±0,08
SSF (g/L)	0,03±0,02
SSV (g/L)	0,12±0,06
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg-N/L)	34,65
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg-N/L)	11,73±0,01
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg-N/L)	1,59±0,17

Les mostres es recullen a diferents temps durant 7 hores, tal i com es mostra a la Taula 21.

**Taula 21.** Valors de les concentracions d'amoni, nitrit i nitrat obtingudes en l'assaig d'activitat dels bacteris Anammox amb un diàmetre superior als 500 µm.

Mostra	Temps (h)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg-N/L)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N (mg-N/L)
T0	0	34,65	11,7287	1,5933±0,17
T1	1	-	11,5054±0,26	1,6679±0,08
T2	3	34,44	11,3646±0,01	2,1349±0,01
T3	5	-	10,71±0,23	2,8239±0,09
T4	7	33,36	10,1783±0,23	3,7528±0,09

L'evolució de les tres espècies nitrogenades en l'assaig Anammox es representa a la Figura 15. Alguns valors s'han descartat a l'hora de quantificar l'activitat per evitar una desviació en la linealització.



**Figura 15.** Evolució del consum d'amoni i nitrit i de la producció de nitrat durant l'assaig d'activitat dels bacteris Anammox amb un diàmetre superior als 500µm. La linealització de les concentracions al llarg del temps de l'assaig permet determinar les velocitats de consum o producció de cada espècie.

Els resultats de l'activitat específica dels bacteris Anammox superiors els 500 µm es mostren a la Taula 22.

**Taula 22.** Activitats específiques de l'assaig dels bacteris Anammox amb diàmetre >500µm i una concentració de biomassa de 0,12 g SSV/L pel que fa al consum d'amoni i nitrit i a la producció de nitrat.

	Velocitat (mg-N/L·h)	Velocitat (mg-N/L·dia)	Biomassa (g/L)	Activitat específica (Kg N/Kg SSV·dia)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,1889	4,5336	0,12	0,038
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,2183	5,2392	0,12	0,044
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,3094	7,4256	0,12	0,062

Les activitats específiques de consum d'amoni i nitrit i de producció de nitrat són molt baixes, essent 0,038, 0,044 i 0,062 Kg N/Kg SSV·dia, respectivament. Aquests valors permeten calcular la ràtio NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> el qual és 1,15Kg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/Kg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N. En relació a la ràtio NO<sub>3</sub><sup>-</sup> produït/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> eliminat, es detecta una relació de 1,63Kg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N/Kg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N. Segons l'estequiometria de la reacció Anammox, la ràtio molar nitrit/amoni és de 1,32. En aquest cas, el valor experimental no s'allunya gaire del valor teòric. Tot i així, la relació nitrat produït/amoni eliminat hauria de ser 0,11, valor molt allunyat a l'experimental.

Per tant, malgrat que sí que es detecta activitat Anammox perquè s'assoleix una ràtio NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> molt pròxim al teòric, les activitats són massa baixes probablement perquè hi ha poca concentració de biomassa (0,12 g SSV/L). Així doncs, es confirma que en les partícules grans hi ha coexistència de bacteris AOB i Anammox i que no hi ha activitat NOB, però caldria augmentar la biomassa d'aquesta mida per tal d'augmentar les activitats específiques i així el rendiment del sistema PN-A.



## CONCLUSIONS

In conclusion, the study of Anammox autotrophic removal in a mainstream system with partial nitrification that has been developed in a piston flow reactor of a pilot plant has not achieved the expected efficiency. Despite the fact that there is ammonium oxidation, nitrogen removal rate (NRR) is not enough due to it does not exceed 25 mg-N/L-day during all the process tracking.

Activity tests with size fractionated biomass have allowed to confirm that there is combined aerobic activity in small granules ( $\varnothing < 500 \mu\text{m}$ ) since AOB and NOB activities are similar. On the contrary, Anammox activity is not detected. With regard to large granules ( $\varnothing > 500 \mu\text{m}$ ), AOB and Anammox activity is detected, but NOB activity is not. In consequence, aerobic and anoxic fractions work concurrently. However, Anammox activity is very low, even though it is detected.

Therefore, it is confirmed that granules with a larger diameter have more efficiency in the PN-A process. Nevertheless, it would be necessary to increase large biomass concentration considering is very low. In this specific way, PN-A process performance in the pilot plant would improve.

## BIBLIOGRAFIA

- American Public Health Association. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA*.
- Balaguer, M., Puig, M., Salgot, M., Sánchez-Marrè, M. I Turon, C. (2007). *Gestió i tractament d'aigües residuals* (1a edició). Girona: Universitat de Girona.
- Cao, Y., van Loosdrecht, M. C., & Daigger, G. T. (2017). Mainstream partial nitritation–anammox in municipal wastewater treatment: status, bottlenecks, and further studies. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(4), 1365-1383.
- Carvajal-Arroyo, J. M., Vitor Akaboci, T. R., Rusalleda, M., Colprim, J., Courtens, E., & Vlaeminck, S. E. (2016). Biofilms for one-stage autotrophic nitrogen removal. In *Aquatic biofilms: ecology, water quality and wastewater treatment/Romaní, AM [edit.]; et al.* (pp. 205-222).
- Gabarró, J. (2014). *Effects of operational conditions on the performance of a partial nitritation SBR treating high nitrogen loads* (1a edició) Girona: Universitat de Girona.
- Ganigué, R., Gabarró, J., Sánchez-Melsió, A., Rusalleda, M., López, H., Vila, X., ... & Balaguer, M. D. (2009). Long-term operation of a partial nitritation pilot plant treating leachate with extremely high ammonium concentration prior to an anammox process. *Bioresource technology*, 100(23), 5624-5632.
- Hu, Z., Lotti, T., de Kreuk, M., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M., Kruit, J., ... & Kartal, B. (2013). Nitrogen removal by a nitritation-anammox bioreactor at low temperature. *Applied and environmental microbiology*, 79(8), 2807-2812.
- Kimura, Y., Isaka, K., & Kazama, F. (2011). Effects of inorganic carbon limitation on anaerobic ammonium oxidation (anammox) activity. *Bioresource technology*, 102(6), 4390-4394.
- Kouba, V., Widiayuningrum, P., Chovancova, L., Jenicek, P., & Bartacek, J. (2016). Applicability of one-stage partial nitritation and anammox in MBBR for anaerobically pre-treated municipal wastewater. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 43(7), 965-975.
- Laureni, M., Falås, P., Robin, O., Wick, A., Weissbrodt, D. G., Nielsen, J. L., ... & Joss, A. (2016). Mainstream partial nitritation and anammox: long-term process stability and effluent quality at low temperatures. *Water research*, 101, 628-639.
- Malovanyy, A., Yang, J., Trela, J., & Plaza, E. (2015). Combination of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and partial nitritation/anammox moving bed biofilm reactor (MBBR) for municipal wastewater treatment. *Bioresource technology*, 180, 144-153.
- Miao, Y., Zhang, L., Yang, Y., Peng, Y., Li, B., Wang, S., & Zhang, Q. (2016). Start-up of single-stage partial nitrification-anammox process treating low-strength swage and its restoration from nitrate accumulation. *Bioresource technology*, 218, 771-779.
- Puyol, D., Carvajal-Arroyo, J. M., Garcia, B., Sierra-Alvarez, R., & Field, J. A. (2013). Kinetic characterization of *Brocadia* spp.-dominated anammox cultures. *Bioresource technology*, 139, 94-100.
- Rusalleda Beylier, M. (2011). *Treatment of mature urban landfill leachates by anammox process* (1a edició). Girona: Universitat de Girona.

Shi, Y., Wells, G., & Morgenroth, E. (2016). Microbial activity balance in size fractionated suspended growth biomass from full-scale sidestream combined nitrification-anammox reactors. *Bioresource technology*, *218*, 38-45.

Vlaeminck, S. E., Terada, A., Smets, B. F., De Clippeleir, H., Schaubroeck, T., Bolca, S., ... & Verstraete, W. (2010). Aggregate size and architecture determine microbial activity balance for one-stage partial nitrification and anammox. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(3), 900-909.

Yi, Y., Yong, H., & HuiPing, D. (2011). Effect of salt on anammox process. *Procedia Environmental Sciences*, *10*, 2036-2041.

Zhang, L., Narita, Y., Gao, L., Ali, M., Oshiki, M., & Okabe, S. (2017). Maximum specific growth rate of anammox bacteria revisited. *Water Research*, *116*, 296-303.