

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 740**

51 Int. Cl.:

<b>C02F 3/30</b>	(2006.01)
<b>C02F 3/34</b>	(2006.01)
<b>C02F 101/12</b>	(2006.01)
<b>C02F 103/08</b>	(2006.01)
<b>C02F 103/24</b>	(2006.01)
<b>C02F 101/16</b>	(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2015 PCT/EP2015/060661**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15173336**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2015 E 15721741 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3142970**

54 Título: **Desnitrificación de aguas residuales industriales salinas**

30 Prioridad:

**14.05.2014 NO 20140606**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.05.2018**

73 Titular/es:

**YARA INTERNATIONAL ASA (100.0%)  
P.O. Box 343 Skøyen  
0213 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**BREINER, HANS-WERNER;  
STOECK, THORSTEN;  
DOPPELBAUER, GÜNTHER;  
FRANKE, WOLFRAM y  
ETTL, MARINA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 667 740 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Desnitrificación de aguas residuales industriales salinas

5 **Introducción**

Los procesos de tratamiento de aguas residuales industriales se centran en diferentes propósitos pero, generalmente, el objetivo es la reducción de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Las corrientes de aguas residuales industriales contienen a menudo pocos compuestos pero en una concentración elevada y, como consecuencia, el proceso de tratamiento necesita ser muy especializado.

El alcance del tratamiento depende de los requisitos legales. Normalmente el municipio define reglamentos de vertido en las redes de alcantarillado, y las autoridades estatales, como la agencia de protección ambiental, habitualmente definen reglamentos de vertido en ríos, lagos y el mar abierto.

Las corrientes de vertido con altas concentraciones de nitrato pueden contener también grandes cantidades de otros compuestos tales como cloruro (de la industria de conservas de pescado, de procesos de desulfurización con yeso-cal en fase húmeda y líquido de regeneración de columnas de intercambio iónico) y sulfato (de desechos de curtiembres).

Especialmente los procesos de intercambio iónico pueden conducir a corrientes de aguas residuales que están altamente contaminadas con inorgánicos. Por ejemplo, un proceso de intercambio iónico para convertir un cloruro de metal alcalino y nitrato de calcio en un nitrato de metal alcalino y cloruro de calcio acarrea un agua residual altamente salina con una elevada contaminación de nitrato. En dicho proceso de intercambio iónico, el metal alcalino puede ser potasio o sodio.

Los procesos de tratamiento de aguas residuales industriales pueden ser de naturaleza física (filtración, separación, intercambio iónico), química (floculación, neutralización, oxidación) o bioquímica. Dependiendo de la toxicidad de los compuestos y de la sostenibilidad, se requiere elegir el proceso de tratamiento más apropiado. En muchos casos, un proceso bioquímico es rentable.

El tratamiento bioquímico de aguas residuales industriales requiere:

- Selección de especies que sean capaces de degradar el contaminante objetivo;
- Establecimiento de las condiciones óptimas para que las especies seleccionadas realicen su metabolismo;
- Suministro de sustancias para complementar la nutrición y el abastecimiento de carbono.

La desnitrificación es un proceso biológico que es común en la naturaleza así como en sistemas de tratamiento de aguas residuales. El proceso en condiciones convencionales de aguas residuales se describe, por ejemplo, en las directrices ATV-DVWK-A (Bemessung von einstufigen Belebungsanlagen. Edición 05/2000. DWA. Alemania. ISBN: 978-3-933707-41-3). En presencia de nitrato y en ausencia de oxígeno, las bacterias anóxicas son capaces de usar el nitrato para la oxidación de compuestos orgánicos con el fin de favorecer su metabolismo. Por consiguiente, el nitrato y los compuestos orgánicos biodisponibles se consumen durante el proceso con el mantenimiento y producción de biomasa y la liberación de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y agua.

El proceso de desnitrificación consiste en cuatro etapas:



El nitrito, uno de los intermediarios en el proceso, es tóxico para muchos organismos. Especialmente en caso de acumulación y tras un aumento en su concentración, el nitrito se puede convertir en una toxina importante para las propias bacterias reductoras de nitrato. En condiciones estándar, la reducción del nitrito se realiza más rápidamente que la reducción de nitrato y, en consecuencia, en condiciones de equilibrio, se evita una acumulación de nitrito. Las altas concentraciones de nitrato y una fuente de carbono fácilmente degradable llevan en primer lugar a una alta liberación de nitrito y, en consecuencia, a una detención de la reducción del nitrato inducida por la toxicidad del nitrito.

Se sabe que las altas concentraciones salinas en las aguas residuales tienen efectos negativos sobre la desnitrificación biológica. Sin embargo, se han aislado e identificado varias bacterias desnitrificantes halotolerantes en aguas hipersalinas. Cuanto mayor sea la salinidad de un hábitat, menor es el número de taxones bacterianos especializados que pueden sobrevivir o prosperar en este hábitat. En ambientes extremos, como estanques de cristalización o salinas solares, pueden sobrevivir relativamente pocas especies adaptadas de bacterias halófilas.

También, la temperatura del agua tiene un alto impacto sobre la tasa de desnitrificación. Hasta un cierto límite, la

actividad microbiana aumenta con la temperatura. Como el nitrato y el nitrito compiten con el oxígeno como aceptor de electrones, se debe evitar el contacto del medio con condiciones atmosféricas ricas en oxígeno para alcanzar tasas óptimas de desnitrificación. Por lo tanto, preferentemente, un proceso de desnitrificación biológica tiene lugar a una temperatura elevada, la cual, sin embargo, está limitada por la temperatura máxima de supervivencia de las respectivas especies de bacterias involucradas. Con pocas excepciones, la desnitrificación es un proceso anaerobio.

Los inventores actualmente han identificado un proceso bioquímico para la desnitrificación de una composición de aguas residuales hipersalinas, que comprende una concentración de por lo menos el 0,1 % (p/v) de nitrato y una concentración de por lo menos el 5 % (p/v) de cloruro, usando bacterias halófilas y/o halotolerantes.

En la presente solicitud, una composición hipersalina tal como un agua residual, una salmuera y similares, se define como que comprenden al menos una concentración del 5 % (p/v) de iones de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ).

En la presente solicitud, una composición que comprende una alta concentración de nitrato se define como que comprende al menos una concentración del 0,1 % (p/v) de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).

En la presente solicitud, cuando se hace referencia a "nitrato" o "cloruro", se hace referencia a la cantidad total de compuestos de "nitrato" o "cloruro" presentes, que están bien en la forma de iones o bien como compuestos no disociados.

En la presente solicitud, de acuerdo con Le Borgne et al. (Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archea, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 2008; 15:74-922008), las bacterias halófilas se clasifican como ligeramente halófilas cuando son activas a una concentración de NaCl del 2 al 5 % (p/v) (el agua de mar tiene una concentración promedio del 3,5 % (p/v), moderadamente halófilas cuando son activas en una concentración de NaCl del 20 al 30 % (p/v). La mayoría de bacterias suplementarias de acuerdo con la presente invención de los inventores se puede clasificar como bacterias halófilas moderadas a extremas. No obstante, la comunidad de microorganismos que se utilizó en los presentes experimentos de los inventores fue una mezcla de especies halófilas, halotolerantes y no especializadas, obtenida de una mezcla de lodo activado de la etapa de desnitrificación de un plan de tratamiento de aguas residuales municipales y de un lodo salino de un estanque de cristalización de una salina solar. Las especies halófilas requieren NaCl para su crecimiento, a diferencia de las especies halotolerantes, las cuales no requieren NaCl pero pueden crecer en condiciones salinas.

#### Técnica anterior

La bibliografía indica la especificidad del objetivo del biotratamiento y la selección resultante de los microorganismos, y que cada objetivo del biotratamiento requiere un ajuste individual de la temperatura, del valor pH, de los micronutrientes y las especies seleccionadas.

Okeke et al. (Reduction of perchlorate and nitrate by salt-tolerant bacteria. Environmental Pollution 118 (2002) 357-363) describen un proceso de biotratamiento de aguas residuales, optimizado para eliminar iones perclorato de un agua residual que contiene 100 mg/l de  $\text{ClO}_4^-$  (el 0,01 % p/v) y 11,7 mg/l de  $\text{NO}_3^-$  (el 0,001 % p/v). La eficacia de eliminación de nitrato fue del 16,4 % para un co-cultivo de una bacteria *Citrobacter*, tolerante a la sal, y una bacteria no tolerante a la sal, denominada "perclace", y el 15,6 % para un monocultivo de *Citrobacter* en 7 días. Se utilizaron acetato y extracto de levadura como fuentes de carbono. La temperatura recomendada para eliminar  $\text{ClO}_4^-$  fue de 30 °C para el 0 - 5 % de NaCl.

Cyplik P. et.al. (Effect of Macro/micro Nutrients and Carbon Source Over the Denitrification Rate of *Haloferax Denitrificans Archaeon*, Enzyme and Microbial Technology 40, 2007, 212- 220) desvelan la desnitrificación de agua salina solo mediante el uso de bacterias halotolerantes, en particular *Haloferax denitrificans archaeon*. La cantidad de NaCl citada es 2,5 a 3,5 M (del 14,5 al 20 % (p/v)) y la cantidad de nitrato es de 100-1000 mg/l. Se prefiere un pH neutro y una temperatura de 37 °C.

Foglar et al. (Nitrate Removal with Bacterial Cells Attached to Quartz Sand and Zeolite from Salty Wastewater, World J Microbiol Biotechnol (2007) 23:1595-1603) desvelan un estudio en donde se emplea un cultivo bacteriano mixto para eliminar nitrato del agua salina. La cantidad de NaCl usada en los experimentos fue del 3 % (p/v) y la cantidad de nitrato fue de 750 mg/l. En algunos ejemplos se añade una fuente de carbono, la temperatura es de 37°C y el pH es neutro. Las bacterias mencionadas incluyen *Pseudomonas* sp. y *Paracoccus* sp. La cantidad de cloruro y la cantidad de nitrato son menores en este estudio que en la presente invención y la disminución de la concentración de nitrato en el transcurso del tiempo dura mucho más tiempo (hasta 10 días y más, a 37 °C) que de acuerdo con la presente solicitud.

Nair et al. (Biological denitrification of high strength nitrate waste using pre-adapted denitrifying sludge. Chemosphere 67 (2007) 1612 -1617) demostraron que la eliminación de nitrato de un agua residual proveniente de una planta productora de fertilizantes se puede realizar usando una tecnología de lodo activado. Los ensayos demostraron que un lodo con contenido de nitrato con concentraciones iniciales de hasta el 4 % de  $\text{NO}_3^-$  se puede tratar completamente en un período de tiempo de 6 horas. No obstante, no estaban presentes cloruros. La

temperatura recomendada para eliminar  $\text{NO}_3^-$  fue de 37 °C.

Le Borgne et al. (Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 2008; 15:74-922008) presentan una visión de conjunto de la biodegradación de contaminantes orgánicos por bacterias halófilas. No se desvela la desnitrificación.

5 Osaka et al. (Effects of Carbon Source on Denitrification Efficiency and Microbial Community Structure in a Saline Wastewater Treatment Process, Water Research 42, 2008, 3709-3718) desvelan un estudio académico de la desnitrificación biológica de agua salina que se centra en seleccionar la fuente correcta de carbono. Se prefiere el acetato cuando la concentración de NaCl es del 0 – 10 %. El cultivo bacteriano se obtiene de un lodo sintético de  
10 agua residual activado con NaCl en condiciones de laboratorio. La cantidad de nitrato es 1,5 g/l. Se desvelan diferentes especies microbianas para para reactores alimentados con metanol (*Azoarcus*, *Hyphomicrobium*, *Methylophage* y *Paracoccus*) o alimentados con acetato (*Azoarcus*, *Marinobacter* y *Halomonas*) que desempeñan un papel en la desnitrificación.

15 Tsang et al. (A novel sludge minimized biological nitrogen removal process for saline treatment. Water Science & Technology, Vol .59, Issue 10, 2009; pp. 1893-1899) describen un proceso multietapa para tratar aguas de alcantarillado que contienen cantidades de sulfato (el 0,05 % p/v) centrado en la eliminación de contaminantes orgánicos. No se mencionan sales de cloruro.

20 Rezaee et al. (Denitrification of high salinity, high nitrate wastewater using clinoptilolite in a packed bed bioreactor. Journal of Environmental Research and Management Vol. 3(2). pp. 031-036, March, 2012) describieron el tratamiento de agua residual con nitrato en concentración elevada y alto grado de salinidad (hasta el 4 % p/v), usando un biorreactor de lecho empacado, relleno con clinoptilolita como portador, y demostraron que un flujo de entrada de nitrato de 500 mg/l (el 0,05 % p/v) se puede tratar con éxito. La temperatura fue de 25 °C.

25 Cyplik et al. (Biological Denitrification of High Nitrate Processing Wastewaters from Explosives Production Plant. Water Air Soil Pollution (2012) 223:1791-1800) desvelan la desnitrificación biológica de aguas residuales de procesamiento con alto contenido de nitrato, provenientes de una planta productora de explosivos, y demostraron que se puede establecer la eliminación de nitrato para un agua residual contaminada con un alto contenido de  
30 nitrato. Se eliminaron 3 g/l de N (proveniente del  $\text{NO}_3^-$ ) en 16 días en presencia de nitroglicerina y una baja concentración (21 mg/l) de cloruros. No se indica un nivel de temperatura, de modo que se pueden asumir condiciones de laboratorio estándar (20 °C).

35 El documento US 4.356.092 (1982) desvela un proceso de tratamiento biológico de aguas residuales, pero no se centra en la eliminación de nitrato. Comprende las etapas de cultivar una nueva cepa, *Alcaligenes faecalis* HRL-1, y añadir las células cultivadas al agua residual que se va a tratar. No se discute la salinidad.

40 También, el documento EP 2018417 B1 (2007) desvela una nueva cepa, CNCM 1-3448 de *Alcaligenes faecalis*, capaz de convertir nitrógeno de Kjeldahl, nitrógeno amoniacal y/u óxidos de nitrógeno en nitrógeno gaseoso, y de convertir la materia que contiene carbono en dióxido de carbono, en donde ambas conversiones tienen lugar bajo condiciones aerobias. No se discute la salinidad.

45 El documento CN 101054232 A (2007) desvela un proceso de tratamiento biológico de aguas residuales altamente eficaz para aguas residuales hipersalinas, que genera un lodo granular aeróbico en un reactor de lotes secuencial sin el uso de bacterias halófilas, de manera que el agua residual hipersalina se puede procesar de forma eficaz y se mejora la resistencia al choque salino del sistema.

50 El documento WO 2010/076794 A1 (2010) desvela un método para desnitrificar salmuera añadiendo bacterias anaerobias, halotolerantes. La desnitrificación tiene lugar en condiciones de pH neutro y se añade una fuente de carbono, a una temperatura de alrededor de 37 °C. El proceso se realiza en un biorreactor de lecho fluidizado. La salmuera tratada contiene únicamente del 0,5 a 4 % de sal, 2 g/l de cloruro, y 0,05 g/l de nitrato (como N), lo cual es mucho menos que en la presente invención.

55 Peyton et al (Nitrate reduction with *Halomonas campisalis*. Kinetics of denitrification at pH 9 and 12.5% NaCl. Water Res. 2001 Dec;35(17):4237-42.) describen la cinética de la desnitrificación con *Halomonas campisalis* a pH 9 y con el 12,5 % de NaCl.

60 El documento KR 2013 010873 a (2013) desvela una nueva cepa de *Pseudomonas sp.* y un método de eliminación de nitrógeno amoniacal usando la cepa.

65 Kai Shi et al (Performance of halophilic marine bacteria inocula on nutrient removal from hypersaline wastewater in an intermittently aerated biological filter. Bioresour Technol. 2012 Jun;113:280-7) introducen bacterias halófilas marinas en un filtro biológico aireado de manera intermitente (IABF, siglas del inglés *intermittently aerated biological filter*) y describe la realización mejorada de la eliminación de nutrientes en el intervalo de salinidad del 4-10 % en comparación con el IABF de control.

La técnica anterior no desvela un proceso bioquímico que se centra en una rápida eliminación de nitrato en presencia de una elevada concentración de cloruros para un tratamiento de aguas residuales inorgánicas usando una combinación específica de bacterias.

## 5 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un proceso bioquímico para la desnitrificación de una composición de aguas residuales hipersalinas que comprenden una alta concentración de nitrato en presencia de una alta concentración de cloruro.

10 De acuerdo con la invención, una composición de aguas residuales hipersalinas, que comprende una alta concentración de nitrato se somete a un tratamiento bioquímico, en donde dicha alta concentración de nitrato, en la presencia de una alta concentración de cloruro, se reduce a una concentración menor, preferentemente en un corto período, exponiendo dicha composición de aguas residuales hipersalinas a bacterias halófilas y/o halotolerantes.

15 De acuerdo con la invención, se desvela un proceso bioquímico para la desnitrificación de una composición de aguas residuales hipersalinas, que comprenden una concentración de al menos el 0,1 % (p/v) de nitrato y una concentración de al menos el 5 % (p/v) de cloruro, usando bacterias halófilas y/o halotolerantes.

20 De acuerdo con una realización, se desvela un proceso bioquímico para la desnitrificación de una composición de aguas residuales hipersalinas, que se originan a partir de un proceso de intercambio iónico, que comprenden una concentración de al menos el 0,1 % (p/v) de nitrato y una concentración de al menos el 5 % de cloruro (p/v), usando bacterias halófilas y halotolerantes.

25 De acuerdo con una realización, la concentración de nitrato es al menos del 0,20 % (p/v), más preferentemente del 0,25 % (p/v).

El tratamiento se realiza mediante una comunidad de bacterias y no mediante por un único género de bacterias. Considerando la alta salinidad, es razonable asumir que todos los miembros de la comunidad activa son por lo menos halotolerantes, muy probablemente halófilos o halotolerantes, preferentemente tanto halófilos como halotolerantes, y opcionalmente la comunidad activa también contiene miembros no especializados. Se seleccionó una comunidad en el transcurso del tiempo de una mezcla de lodos activados desnitrificantes habituales, de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales, y lodo de sedimento salino del estanque de cristalización de una salina solar en Ses Salines, España. Aproximadamente del 85 al 95 % en peso, más preferentemente alrededor del 90 % del lodo consiste en lodo activado de la etapa de desnitrificación de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. Aproximadamente del 5 al 15 % en peso, más preferentemente alrededor del 10 % en peso del lodo consiste en sedimento del estanque de cristalización de una salina solar, incluyendo bacterias naturales desnitrificantes halófilas. El proceso de cultivo y selección se hace aumentando ligeramente la concentración de cloruro de calcio y nitrato de potasio en el transcurso del tiempo hasta el nivel deseado a una temperatura constante de 35 °C a 40 °C, y preferentemente a 37 °C.

40 Aunque una gran proporción (el 69 % en peso) de las bacterias de la salina solar permanecen sin identificar con genes marcadores taxonómicos cortos (V4-V6 de SSU ADN<sub>r</sub>), usando la secuenciación de extremos pareados MySeq Illumina, se podrían asignar con certeza numerosas bacterias a los siguientes géneros: *Pseudomonas* (abundancia: el 19 % en peso), *Bacillus* (abundancia: el 4 % en peso) y *Halomonas* (abundancia: el 3 % en peso), y opcionalmente se detectaron con menor abundancia (el 1 % en peso o menos) *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Flexibacter*, *Propionibacterium*, Enterobacteriaceae, *Flavobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium*, *Lysobacter*, *Sinorhizobium*, *Azospirillum*, *Thiobacillus*, *Sphingobacter*, *Paracoccus*, *Aeromonas*, *Ochrobacterium*, *Nitrosomonas*, *Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*, *Lactobacillus*, *Nitrobacter*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Thiomicrospira*, *Beggiatoa*, *Cellvibrio*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Kingella*, *Aquaspirillum*, *Norcadia* y *Azoarcus*.

50 Considerando las altas concentraciones de sal en las que tuvo lugar la desnitrificación, es razonable asumir que todos los desnitrificantes activos eran halotolerantes o halófilos.

El proceso opera entre 35°C a 40°C, preferentemente a aproximadamente 37 °C cuando se registró un rendimiento óptimo.

55 Preferiblemente, el proceso usa acetato de potasio como fuente de carbono, pero el metanol o el etanol también son opciones, aunque menos preferidas en una instalación industrial, debido a los costes más elevados.

60 No se añaden nutrientes al sistema, ya que el proceso específico de selección de los desnitrificantes requiere predominantemente nitrato. Los elementos traza, así como los fosfatos, estaban lo suficientemente presentes en el lodo de entrada. En una aplicación a gran escala con tratamiento constante del agua residual y el lodo de entrada únicamente al comienzo para establecer el proceso, puede ser necesaria una entrada adicional de elementos traza y fosfato.

65 Con el proceso de acuerdo con la invención, se demostró que una concentración inicial de nitrato de 1,5 a 3,0 g/l podría reducirse a una concentración de aproximadamente 0,001 g/l entre 24 a 48 horas, especialmente cuando se

usó una mezcla de lodos que consiste en aproximadamente el 85 al 95 % en peso, más preferentemente alrededor del 90 % en peso de lodo activado de la etapa de desnitrificación de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales y alrededor del 5 al 15 % en peso, más preferentemente alrededor del 10 % en peso, de lodo salino del estanque de cristalización de una salina solar.

5 El proceso de acuerdo con la invención se realiza en un biorreactor de forma convencional, conocido por el experto en la materia. El biorreactor puede ser un tipo de reactor de lodo suspendido o de lecho flotante. En este proceso, la fuente de carbono se agrega como nutriente principal para cumplir las condiciones de una reducción bioquímica de nitrato. La operación puede efectuarse por lotes o en modo continuo.

10 El agua residual que se va a tratar se puede producir en una planta de intercambio iónico. En el proceso de producción, cloruro de potasio o cloruro de sodio reaccionan con nitrato de calcio y dan nitrato de potasio o nitrato de sodio como productos y una solución de cloruro de calcio como material residual. La corriente de agua residual necesita un tratamiento distinto, ya que la contaminación de nitrato es demasiado alta para un vertido sin tratar.

15 En la presente descripción se hace alusión a las siguientes Figuras.

- Figura 1: Desnitrificación bajo condiciones estándar (sin adición de una fuente de carbono, a temperatura ambiente) en la instalación de microcosmo 2-L tal como se describe (Experimento A).
- 20 Figura 2: Desnitrificación en la instalación de microcosmo 2-L con adición de MeOH (10 ml/l) como fuente de carbono a temperatura ambiente (Experimento B).
- Figura 3: Desnitrificación en la instalación de microcosmo 2-L con una concentración de nitrato de 260 mg/l (Experimento C).
- Figura 4: Desnitrificación en la instalación de microcosmo 2-L con una concentración de nitrato de 2.200 mg/l (Experimento D).
- 25 Figura 5: Evaluación del efecto de la temperatura sobre la tasa de desnitrificación en una instalación de microcosmo 2-L experimental (Experimento E).
- Figura 6: Evaluación del efecto de KAc como una fuente de carbono (Experimento F).
- Figura 7: Desnitrificación en condiciones de alta salinidad (Experimento G) sin bacterias halófilas y/o halotolerantes significativas (no de acuerdo con la invención).
- 30 Figura 8: Abundancia total de bacterias (x) y abundancia relativa de bacterias desnitrificantes (□) en el Experimento G, tal como se mide por fotometría (izquierda) y usando tinciones DAPI (derecha).
- Figura 9: Tasas de desnitrificación para diferentes proporciones de sustitución de sedimentos de acuerdo con la invención (Experimento H).
- 35 Figura 10: Abundancia total de bacterias (x) y abundancia de bacterias desnitrificantes (Δ) en el Experimento H, tal como se mide por fotometría (izquierda) y usando tinciones DAPI (derecha).

### Sección Experimental

#### 40 General

Se realiza un proceso de producción de nitrato de potasio mediante intercambio iónico a partir de cloruro de potasio y nitrato de calcio, dando el proceso una corriente de agua residual de alta salinidad debida al cloruro de calcio y la elevada contaminación de nitrato. Había que determinar un tratamiento biológico de esta corriente de agua residual con una conversión máxima del nitrato a nitrógeno gaseoso.

El fin de este experimento era la evaluación y el establecimiento de un ambiente microbiano capaz de una desnitrificación completa a altas concentraciones de sal. Las especificaciones del agua residual incluyen 2,5 g de nitrato/l de agua residual (0,25 % p/v), 91 g de CaCl<sub>2</sub>/l (5,7 % p/v de iones Cl<sup>-</sup>) y temperaturas que superan los 50 °C y ausencia de la fuente de carbono en el agua residual industrial de entrada. Como fuente adicional de carbono se añadió acetato de potasio a 30 ml/l.

La estrategia propuesta para llevar a cabo el experimento fue el establecimiento de un sistema cerrado controlado en laboratorio (microcosmo de 2 litros, en lo sucesivo, microcosmo 2-L) que simula las condiciones de biorreactor con lodo activado. La instalación experimental del microcosmo 2-L incluyó las posibilidades de controlar las concentraciones de oxígeno (mantener la anoxia), los valores pH (un intervalo de entre 6,5 y 8,5 es obligatorio para una desnitrificación eficaz) y la temperatura. Por lo tanto, la instalación se diseñó con sensores de pH, oxígeno y temperatura permanentes en línea, una unidad de agitación, acceso para submuestreo sin contaminación de oxígeno, y acceso para lavado con argón en el caso de eventos accidentales de oxigenación.

60 El lodo activado proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (WWTP, siglas del inglés *Wastewater Treatment Plant*) de Kaiserslautern (Alemania) se usó como base para un ambiente microbiano (2,5 litros de volumen en cada experimento). Para el sedimento que contenía las bacterias desnitrificantes halófilas naturales, se usó sedimento del estanque de cristalización de una salina solar de Ses Salines, España.

65 Durante los experimentos, se tomaron muestras en diferentes intervalos de tiempo para las mediciones de nitrato y

5 nitrato (cromatografía iónica y fotometría), para las abundancias totales de bacterias (usando tinciones DAPI), en relación con la abundancia relativa de genes de nitrato reductasa (*nir*), que indican la abundancia de bacterias desnitrificantes, y perfilado molecular de comunidad microbiana (secuenciación de ARN ribosómico de Illumina y análisis estadísticos de la estructura de la comunidad). Durante los experimentos, el pH se tuvo que ajustar con KOH debido a la ligera acidificación del ambiente microbiano.

Se midieron mediante fotometría las concentraciones de nitrato en cargas bajas de sal, y usando cromatografía iónica en cargas elevadas de sal.

10 Experimento A: Desnitrificación estándar sin manipulación de muestras en una instalación controlada con microcosmo 2-L.

15 Este experimento sirvió como control para el funcionamiento del sistema de microcosmo 2-L en condiciones estándar a temperatura ambiente (sala). La desnitrificación se realizó en condiciones estándar (sin adición de fuente de carbono, a temperatura ambiente) en la instalación de microcosmo 2-L. Se añadieron 20 mg de nitrato/l, correspondientes a concentraciones de nitrato que normalmente prevalecen en el agua residual de entrada en la WWTP.

20 Los resultados se muestran en Figura 1. En la instalación experimental establecida, se desnitrificaron 20 mg de nitrato/l de agua residual en 85 minutos. La tasa de desnitrificación fue de 14,1 mg/l/h.

25 Conclusión: La instalación experimental se adapta de manera ideal para llevar a cabo los experimentos porque la desnitrificación en el microcosmo 2-L es tan eficiente como en condiciones normales en una WWTP de funcionamiento óptimo.

30 Experimento B: Adición de metanol (MeOH, 10 ml/l) como fuente de carbono adicional para evaluar el efecto de esta fuente de carbono sobre la tasa de desnitrificación.

35 Las condiciones experimentales son como en el Experimento A con concentraciones de nitrato ligeramente elevadas (33 mg/l). Los resultados se muestran en Figura 2. La desnitrificación completa de 33 mg de nitrato/l se completa después de 50 minutos. La pendiente de la línea de tendencia es más pronunciada, comparada con el experimento en condiciones estándar (sin adición de fuente de carbono adicional). La tasa de desnitrificación es de 39,8 mg/l/h.

40 Conclusión: La fuente de carbono adicional (metanol) mejora claramente la desnitrificación. La variación de la concentración de la fuente de carbono no afectó positivamente a la tasa de desnitrificación en los experimentos posteriores.

45 Experimento C: Aumento de la concentración de nitrato a 260 mg/l (excediendo las condiciones naturales en aprox. 10 veces)

50 Los resultados se muestran en Figura 3. La desnitrificación completa es aún posible a una concentración de nitrato altamente elevada. No obstante, el tiempo para la desnitrificación completa de 260 mg nitrato/l asciende a 34 horas. La tasa de desnitrificación es de 7,4 mg/l/h.

55 Conclusión: Los procesos microbianos a tales concentraciones elevadas de nitrato son claramente menores en comparación con el Experimento A con concentraciones de nitrato similares a un ambiente microbiano. Parece probable que la abundancia de bacterias de origen natural en la instalación experimental es demasiado baja para una desnitrificación eficaz.

60 Experimento D: Aumento de la concentración de nitrato a 2.200 mg/l

65 Los resultados se muestran en Figura 4. La desnitrificación completa es aún posible a una concentración de nitrato altamente elevada. No obstante, el tiempo para la desnitrificación completa de 2.200 mg de nitrato/l asciende a 200 horas. La tasa de desnitrificación es de 9,3 mg/l/h.

Conclusión: La tasa de desnitrificación está en el mismo orden de magnitud que en el Experimento C con una concentración de nitrato aproximadamente 10 veces menor. Esto es demasiado bajo para una aplicación estándar en un proceso de WWTP para la eliminación de cargas de nitrato tan elevadas. Asimismo, a partir de este experimento parece probable que la abundancia de bacterias de origen natural en la instalación experimental es demasiado baja para una desnitrificación eficaz. Por consiguiente, se llevaron a cabo experimentos adicionales con el fin de aumentar la abundancia y la actividad bacterianas.

70 Experimento E: Evaluación del efecto de la temperatura sobre la tasa de desnitrificación en una instalación experimental con microcosmo 2-L.

75 Se llevaron a cabo varios experimentos con una concentración inicial de nitrato de aproximadamente 1000 mg/l para

evaluar el efecto de la temperatura sobre la tasa de desnitrificación en una instalación experimental con microcosmo 2-L. Los resultados se muestran en Figura 5. Las tasas de desnitrificación más altas se alcanzaron a 37 °C. Tasa de desnitrificación: 20,4 mg/l/h. La desnitrificación se inhibe con temperaturas más altas.

5 Conclusión: Una temperatura de 37 °C da como resultado densidades y actividades bacterianas elevadas en una instalación experimental. Como consecuencia, las tasas de desnitrificación están en el mismo orden de magnitud que en "condiciones estándar" (véase los Experimentos A y B), incluso a concentraciones de nitrato extremadamente elevadas. No obstante, esta tasa es aún demasiado baja para una eliminación eficaz de nitrato de concentraciones tan altas en procesos industriales. Se llevaron a cabo experimentos adicionales.

10

Experimento F: Evaluación del efecto de la fuente de carbono.

El MeOH no es apropiado como fuente de carbono en aplicaciones industriales (por motivos de costes y de seguridad). Por lo tanto, se lleva a cabo el Experimento F con el fin de evaluar el acetato de potasio (KAc) como una fuente alternativa de carbono. En todos los experimentos se añadió KAc a una proporción definida: C:N = 1,5:1. Los resultados se muestran en la Figura 6. La tasa de desnitrificación es de 102 mg/l/h, con KAc como fuente de carbono, temperatura a 37 °C y concentración extrema de nitrato.

15

Conclusión: Esta es la tasa de desnitrificación más alta obtenida hasta ahora y excede de manera significativa los valores estándar para la desnitrificación en una WWTP documentados en la bibliografía científica. En consecuencia, los inventores concluyen que el KAc como fuente de carbono y una temperatura óptima de 37 °C son muy eficaces para mejorar la desnitrificación microbiana.

20

Experimento G: Desnitrificación en condiciones de alta salinidad sin bacterias halófilas y/o halotolerantes significativas (no de acuerdo con la invención).

25

La desnitrificación en condiciones de alta salinidad se realizó con una concentración de CaCl<sub>2</sub> de 91 g/l (el 5,7 % p/v de iones Cl<sup>-</sup>), una concentración de nitrato de 2,5 g/l (el 0,25 % p/v), KAc como fuente de carbono y a una temperatura de 37 °C.

30

Los resultados se muestran en Figura 7. La tasa de desnitrificación es 43,7 mg/l/h. Se observó un incremento significativo en la abundancia bacteriana y la abundancia del desnitrificante en el agua residual durante el transcurso del experimento. Esto se determinó usando PCR cuantitativa en tiempo real del gen *nir* (nitrito reductasa, véase Sagar et al. Sci. Total Environ), que codifica una parte del proceso de desnitrificación, y carga bacteriana total, tal como se determinó mediante la abundancia de DAPI, calculada a partir de 5 réplicas por muestra. Los resultados se muestran en la Figura 8. La figura presenta datos de abundancia (relativa) en la instalación experimental para el Experimento G.

35

Conclusión: La biomasa de las bacterias específicamente desnitrificantes aumenta 2,5 veces durante el transcurso del experimento.

40

Experimento H: Sustitución de lodo activado con sedimento de salina solar que incluye desnitrificantes halófilos.

El lodo activado de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (WWTP) de Kaiserslautern (Alemania) se sustituyó con sedimento proveniente del estanque de cristalización de una salina solar de Ses Salines, España, que incluía desnitrificantes halófilos. Los resultados se muestran en Figura 9. La sustitución con 10 % en volumen de sedimento que contenía desnitrificantes halófilos naturales aumentó la tasa de desnitrificación, en comparación con el Experimento G. La tasa de desnitrificación fue de 51,8 mg/l/h. Sorprendentemente, aumentar la proporción relativa de sedimento que contenía desnitrificantes halófilos naturales (se realizaron experimentos para el 20 y el 30 % en volumen, véase Figura 9) no aumentó la tasa de desnitrificación, sino que, en su lugar, inhibió significativamente la desnitrificación.

45

50

Además, la biomasa de las bacterias específicamente desnitrificantes aumentó 3,5 veces durante el transcurso del experimento (véase Figura 10). Se puede ver que con el proceso de acuerdo con la invención, usando el 10 % de sedimento salino, se reduce una concentración de nitrato inicial de 2,5 g/l a una concentración de aproximadamente 1 g/l después de 24 horas, y a una concentración de alrededor de 0,001 g/l después de 48 horas.

55



## REIVINDICACIONES

1. Proceso bioquímico para la desnitrificación de una composición de aguas residuales hipersalinas, que comprenden una concentración de al menos el 0,1 % (p/v) de nitrato y una concentración de al menos el 5 % (p/v) de cloruro, que comprende la etapa de usar una comunidad de bacterias halófilas y/o halotolerantes, y que opcionalmente contiene además miembros no especializados, para la desnitrificación de dicho agua residual hipersalina, en donde dicho proceso comprende seleccionar dicha comunidad de una mezcla de lodos que consiste en el 85 al 95 % en peso de lodo activado de la etapa de desnitrificación de un plan de tratamiento de aguas residuales municipales, y aproximadamente del 5 al 15 % en peso de lodo salino del estanque de cristalización de una salina solar, y en donde el lodo comprende bacterias de al menos los siguientes géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Halomonas*.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de aguas residuales hipersalinas que se originan a partir de un proceso de intercambio iónico, que comprenden una concentración de al menos el 0,1 % (p/v) de nitrato y una concentración de al menos el 5 % (p/v) de cloruro.
3. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la concentración de nitrato es al menos el 0,20 % (p/v), más preferentemente el 0,25 % (p/v).
4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el tratamiento de aguas residuales hipersalinas que se originan a partir de un proceso de producción, que utiliza cloruro de potasio y nitrato de calcio para producir una corriente de aguas residuales que contiene cloruro y nitrato de calcio.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el tratamiento de aguas residuales hipersalinas que se originan a partir de un proceso de producción que utiliza cloruro de sodio y nitrato de calcio para producir una corriente de aguas residuales que contiene cloruro y nitrato de calcio.
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha comunidad se selecciona a partir de una mezcla de lodos que consiste en aproximadamente el 90 % en peso de lodo activado de la etapa de desnitrificación de un plan de tratamiento de aguas residuales municipales y aproximadamente el 10 % en peso de lodo salino del estanque de cristalización de una salina solar.
7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las bacterias halófilas se seleccionan de los géneros *Pseudomonas* (abundancia: 19 % en peso), *Bacillus* (abundancia: 4 % en peso) y *Halomonas* (abundancia: 3 % en peso) y, opcionalmente, con una abundancia menor (1 % en peso o menos), *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Flexibacter*, *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium*, *Lysobacter*, *Sinorhizobium*, *Azospirillum*, *Thiobacillus*, *Sphingobacter*, *Paracoccus*, *Aeromonas*, *Ochrobacterium*, *Nitrosomonas*, *Herbaspirillum*, *Janthinobacterium*, *Lactobacillus*, *Nitrobacter*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Thiomicrospira*, *Beggiatoa*, *Cellvibrio*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Kingella*, *Aquaspirillum*, *Norcadia* y *Azoarcus*.
8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho proceso funciona a entre 35 °C a 40 °C, preferentemente a 37 °C.
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el acetato de potasio se usa como una fuente de carbono.
10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde una concentración inicial de nitrato de 1,5 a 3,0 g/l se reduce a una concentración de 0,001 g/l en 24 a 48 horas.
11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el proceso se realiza en un biorreactor de un tipo de reactor de lodo suspendido.
12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el proceso se realiza en un biorreactor de un tipo de reactor de lecho flotante.

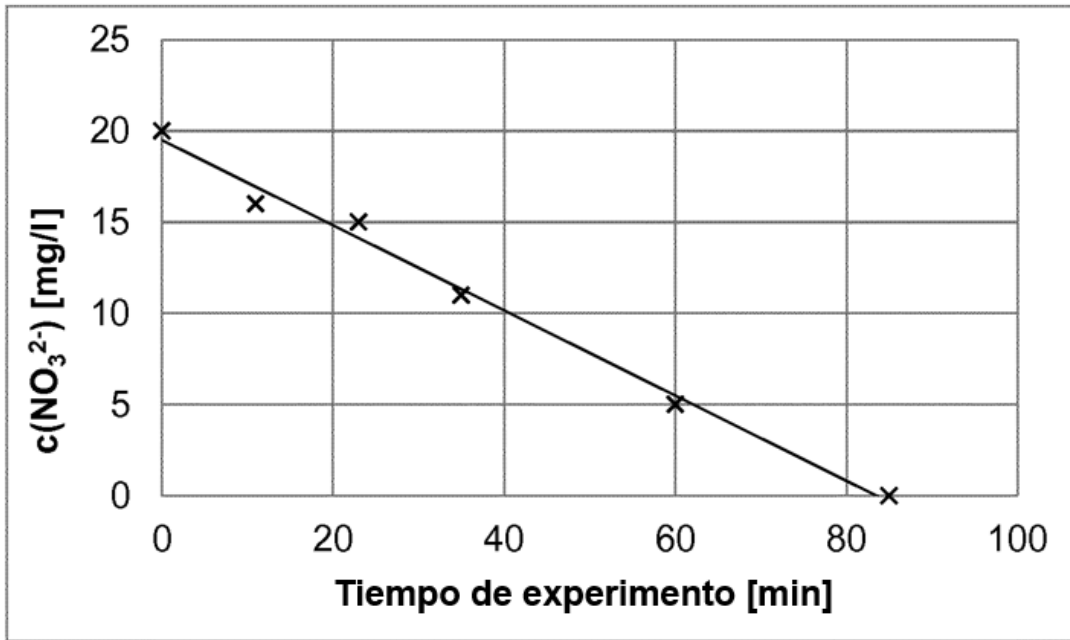


Figura 1

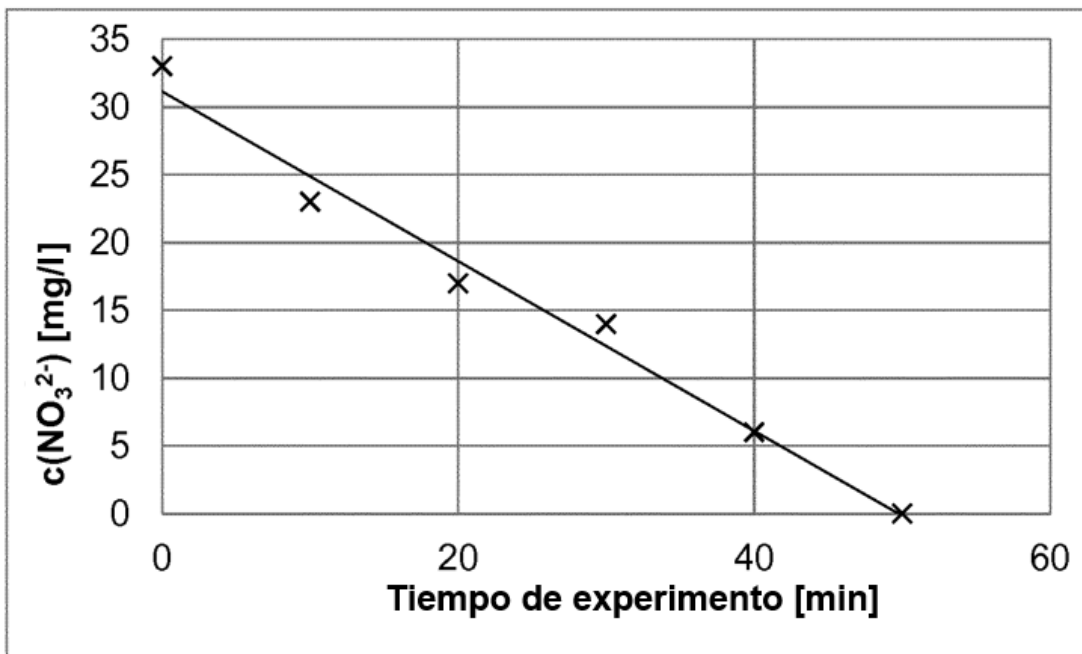


Figura 2

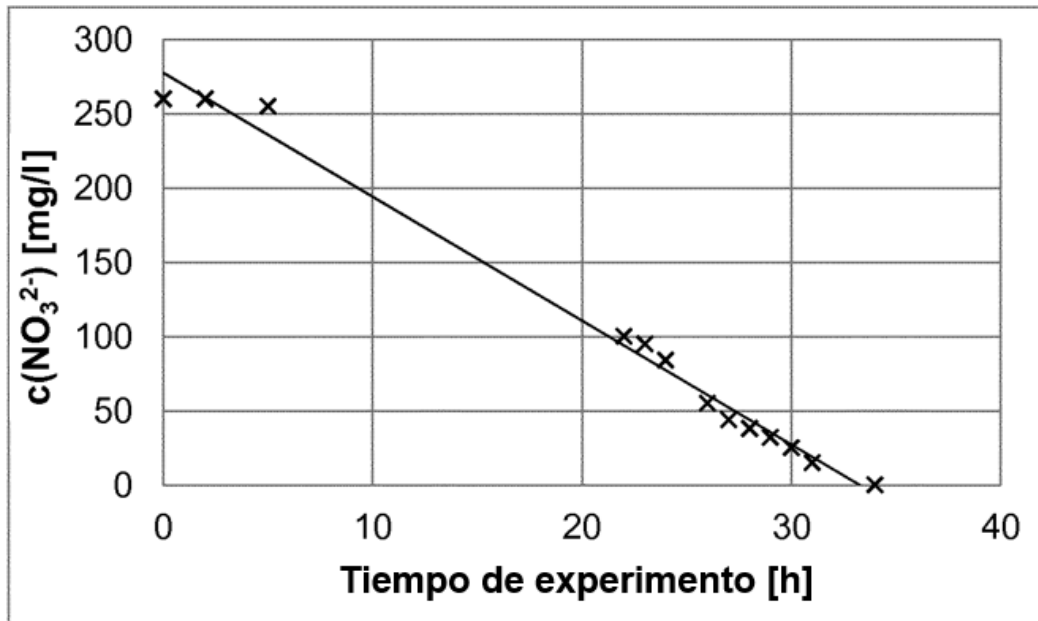


Figura 3

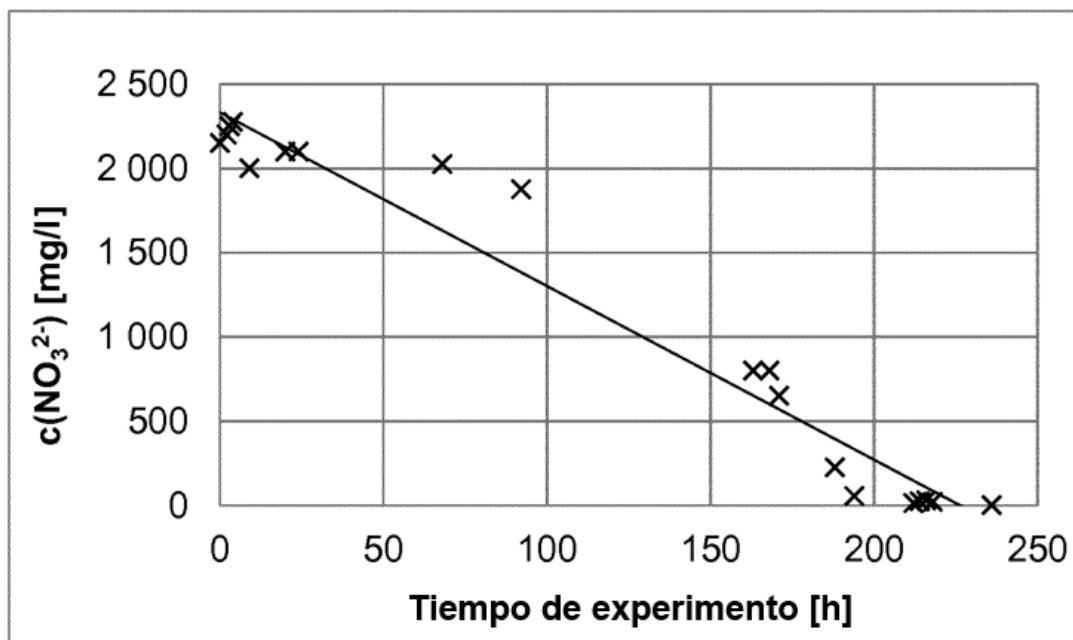


Figura 4

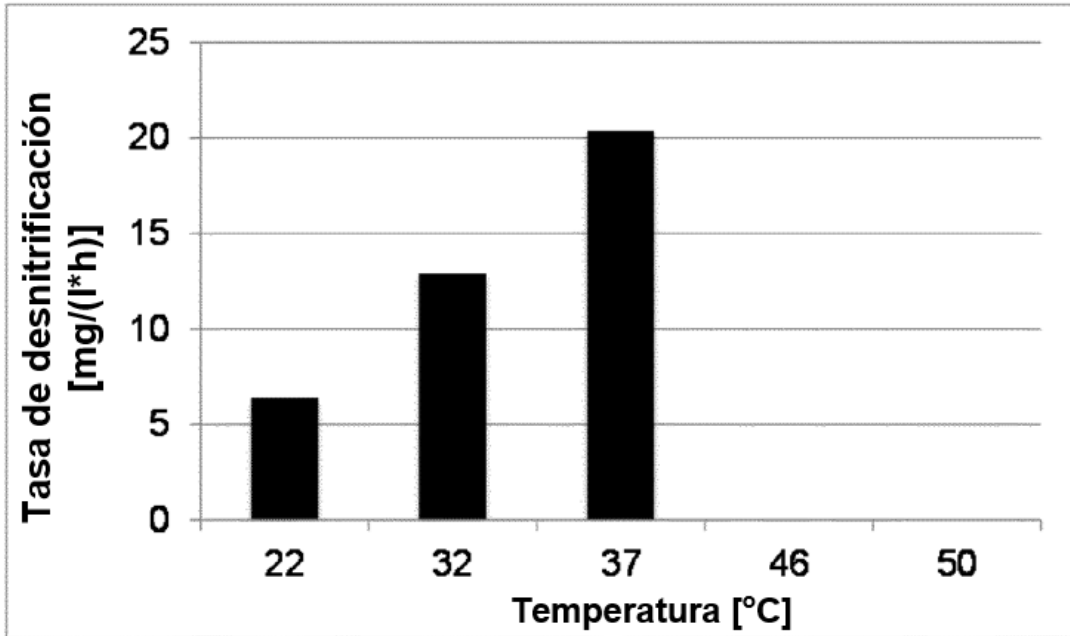


Figura 5

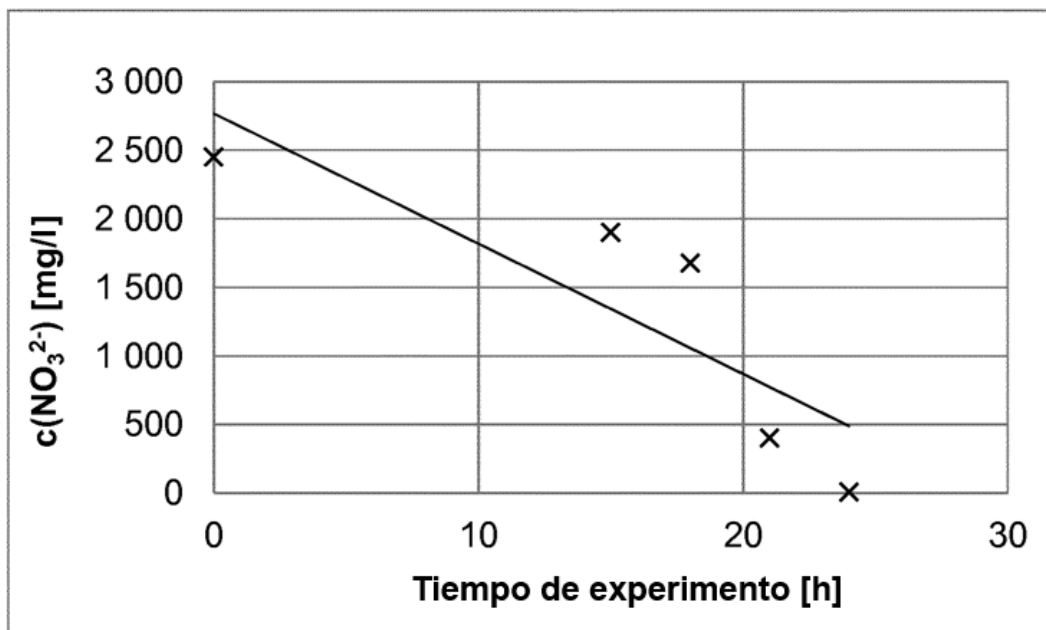


Figura 6

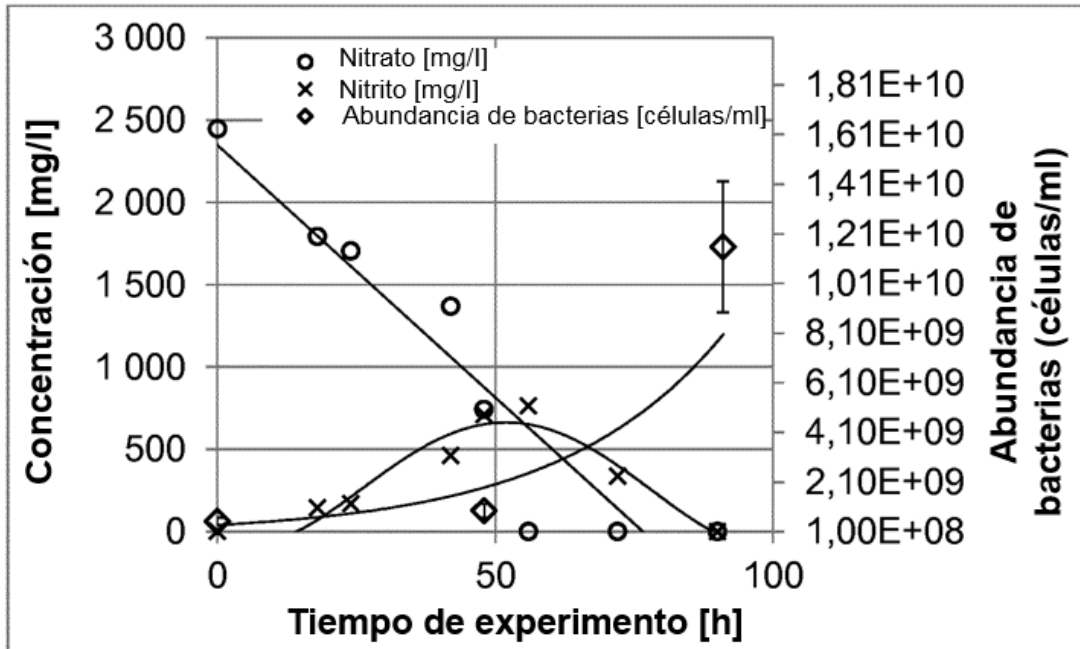


Figura 7

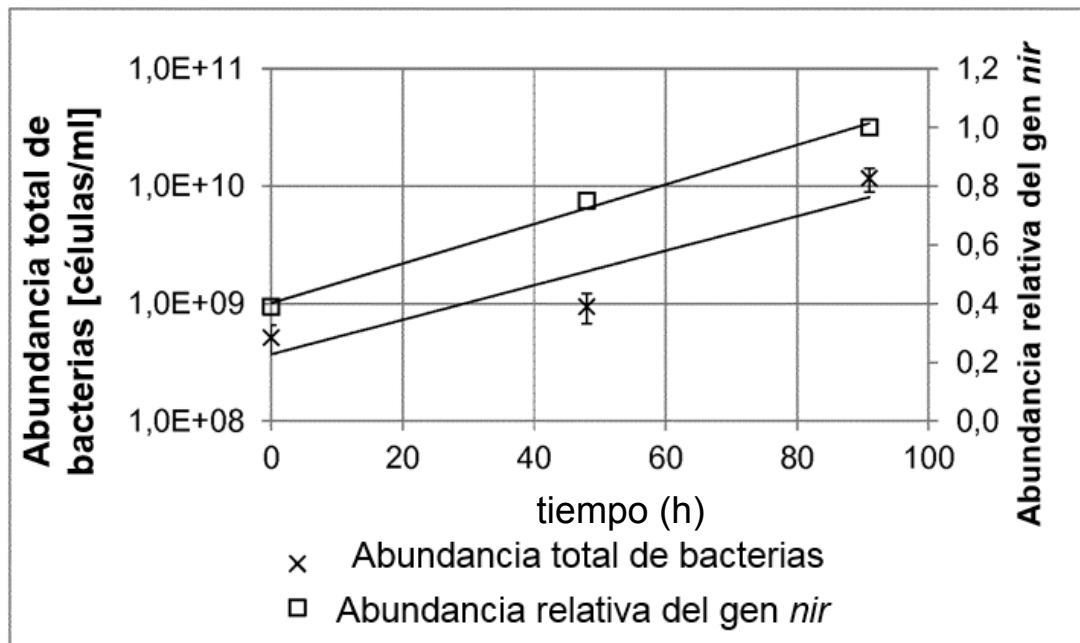


Figura 8

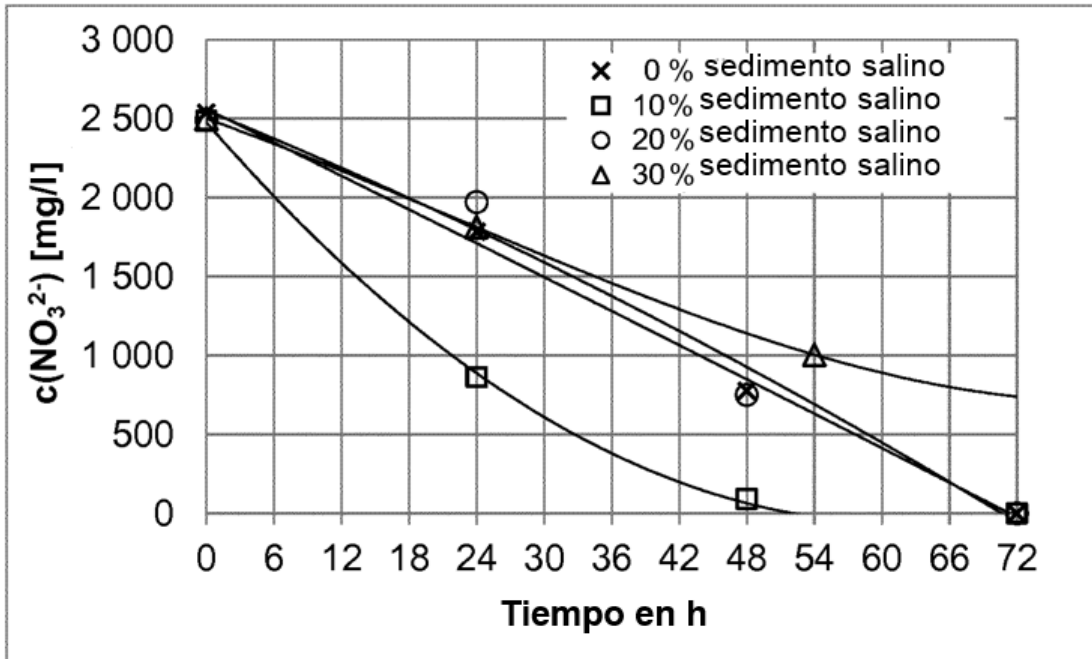


Figura 9

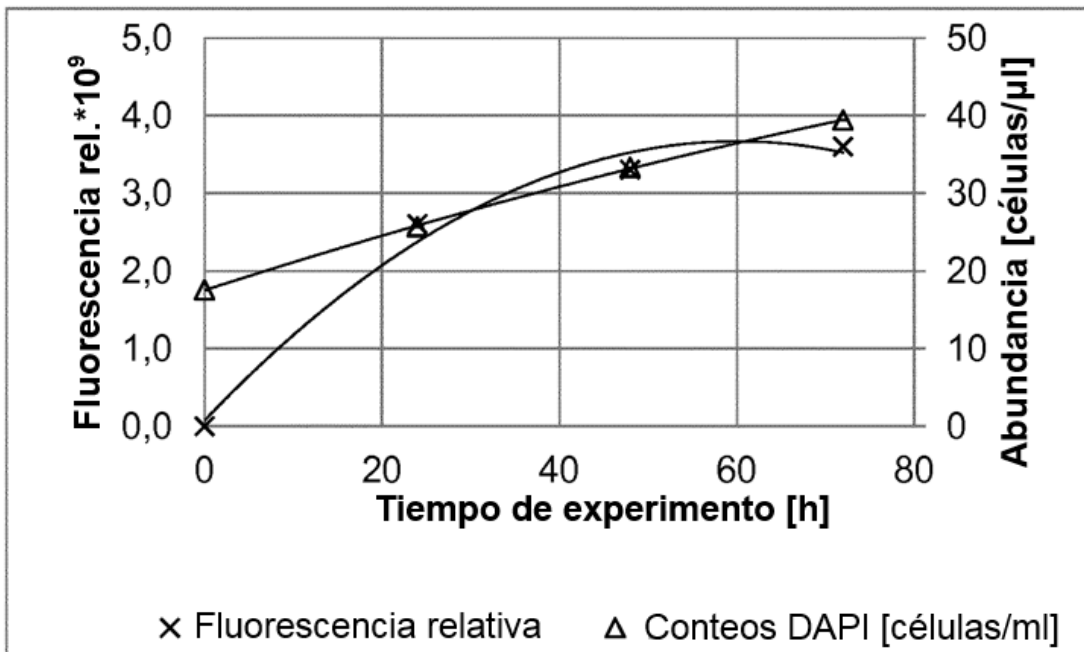


Figura 10