

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 977**

21 Número de solicitud: 202130923

51 Int. Cl.:

C02F 3/34 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

04.10.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2022

Fecha de concesión:

07.06.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.06.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**MOSQUERA CORRAL, Anuska;
VAL DEL RIO, Maria Angeles y
SANTORIO ALDARIZ, Sergio**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **TRATAMIENTO DE FLUENTES DE GRAN CAUDAL**

57 Resumen:

Tratamiento de efluentes de gran caudal. La presente invención podrá ser aplicada en granjas acuícolas que tengan que tratar altos caudales de agua de recirculación para la eliminación de contaminantes nitrogenados y materia orgánica, ya sea para cumplir con los límites de vertido o para recircular el agua dentro de la granja.

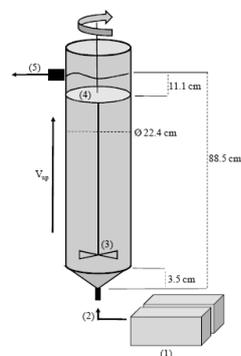


Figura 1

ES 2 893 977 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de fluentes de gran caudal

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un proceso para el tratamiento de agua en producciones
5 de grandes caudales y bajas concentraciones de especies nitrogenadas, en particular en la
producción en acuicultura. Más en concreto se refiere a un proceso de tratamiento de aguas
que permite su recirculación posterior manteniendo una calidad adecuada para la producción
acuícola y evitando la toxicidad para las especies cultivadas. La presente invención también
se refiere a los equipos para dicho tratamiento.

10 Antecedentes

La producción del sector acuícola ha aumentado en los últimos años debido al aumento del
consumo de pescado y al agotamiento de los recursos salvajes, produciendo en la actualidad
más del 50 % del pescado consumido. Sin embargo, las actividades de acuicultura de agua
dulce requieren grandes áreas de implantación y una gran disponibilidad de agua que, en
15 ciertas regiones como los países mediterráneos, es un recurso muy limitado.

La producción de trucha es uno de los sectores de la acuicultura de agua dulce más
importantes de Europa y España. Para reducir el uso de agua dulce en acuicultura se emplean
los sistemas de recirculación (Recirculating aquaculture systems (RAS)) que además
mejoran la gestión de residuos y el reciclado de nutrientes, lo que mejora notablemente la
20 producción. Sin embargo, al ser los RAS circuitos cerrados llevan asociados un aumento de
las concentraciones de los compuestos de nitrógeno, materia orgánica y fósforo que pueden
ser dañinas para los peces, siendo el amonio (excretado por los peces) y el nitrito (producido
a partir de la oxidación del amonio) los compuestos más peligrosos. En los RAS, el amonio
y el amoníaco libre (AL) se encuentran en un equilibrio que depende del pH y la temperatura
25 (Ebeling, J.M., Timmons, M.B., 2012. Recirculating Aquaculture Systems, Aquaculture
Production Systems. <https://doi.org/10.1002/9781118250105.ch11>). Concentraciones de
amonio superiores a 0,78 mg N-NH₄⁺/L son tóxicas para la trucha arco iris pero
concentraciones de AL son tóxicas ya a 0,021 mg N-NH₃/L (Liao, P.B., Mayo, R.D., 1972.
Salmonid hatchery water reuse systems. Aquaculture 1, 317–335.

[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(72\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(72)90033-6)). El nitrito es aún mas tóxico que el amonio. Thurston demostró que concentraciones entre 0,6 - 0,12 mg N-NO₂/L causan un 50% de letalidad en truchas arco iris (Thurston, R. V., Phillips, G.R., Russo, R.C., Hinkins, S.M., 1981. Increased Toxicity of Ammonia to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Resulting from
5 Reduced Concentrations of Dissolved Oxygen. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 983–988. <https://doi.org/10.1139/f81-133>). Su estudio también muestra que el ácido nitroso libre (ANL) era tóxico incluso en concentraciones más bajas debido a su liposolubilidad. Por tanto, los RAS tienen que tener sistemas de tratamiento para eliminar el amonio excretado por las truchas, evitando a la vez la acumulación de nitrito, para garantizar la salud de los
10 peces.

Además del reto de reducir estos contaminantes nitrogenados (que se encuentran en concentraciones muy bajas para los sistemas biológicos convencionales de tratamiento), la principal problemática de este sector es tratar los caudales extremadamente altos, por ejemplo iguales o mayores que 3.600 m³/h. Si estos caudales llegaran a ser tratados en
15 sistemas biológicos convencionales el volumen (y espacio) que ocuparía el sistema de tratamiento sería inaceptable para una industria acuícola.

Para reducir las concentraciones de contaminantes nitrogenados en los RAS, los biofiltros son la tecnología más ampliamente utilizada en el sector de la acuicultura (Martins, C.I.M., Eding, E.H., Verdegem, M.C.J., Heinsbroek, L.T.N., Schneider, O., Blancheton, J.P.,
20 D'Orbcastel, E.R., Verreth, J.A.J., 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquac. Eng.* 43, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2010.09.002>). Los biofiltros son sistemas donde se favorece el crecimiento de la biomasa (lodo) sobre una superficie (soporte) para poder mejorar su retención dentro de la unidad de tratamiento. Así se forma una biopelícula sobre
25 el soporte que contiene los microorganismos que llevan a cabo los procesos de eliminación. Sin embargo, cuando el caudal de agua a recircular es extremadamente alto (como en la producción de trucha arco iris) estos biofiltros no son capaces de eliminar una concentración suficiente de amonio y nitrito. Dentro de los biofiltros destacan los contactores biológicos rotativos (CBR) y los filtros percoladores (FP). Miller and Libey hicieron un estudio para
30 evaluar el potencial de estos filtros en acuicultura (Miller, G.E., Libey, G.S., 1985. Evaluation of Three Biological Filters Suitable for Aquacultural Applications. *J. World*

Maric. Soc. 16, 158–168. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1985.tb00197.x>). En dicho estudio se obtuvieron ratios de eliminación de amonio (REA) de entre 9 - 38 y 2 - 40 mg de N/(L·d) en CBR y FP, respectivamente. Los porcentajes de eliminación de amonio en CBR estaban en el rango de 74 - 82 % y 23 - 51% en FP, sin embargo estos sistemas operaban con
5 tiempos de residencia hidráulico elevados (85 min).

Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos sistemas que mejoren estos ratios de eliminación de amonio y que además el tiempo de residencia hidráulico (TRH) sea lo más corto posible y evitando el lavado de la biomasa, especialmente cuando el caudal es elevado. Además, el diseño debe de ser de tamaño reducido, evitando el uso de sistemas de tratamiento de un
10 tamaño extremadamente grande, lo que facilite su implantación en la industria acuícola y que además reduce el coste. Hay que tener en cuenta que el área de implantación para sistemas de tratamiento en acuicultura es muy limitada.

Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento que permite tratar
15 elevados caudales de efluentes caracterizados por bajas concentraciones de especies nitrogenadas contaminantes y baja concentración de materia orgánica, como son por ejemplo los efluentes procedentes de acuicultura, y eliminar eficazmente dichos contaminantes de manera que ese efluente tratado puede ser recirculado de nuevo en la producción. Para que esos efluentes puedan ser recirculados y utilizados de nuevo en producción, en particular en
20 acuicultura, debe de cumplir que la concentración de nitrógeno amoniacal (concentración de amonio) ha de ser inferior a 0,78 mg N/L, la concentración de nitrógeno como nitrito (concentración de nitrito) ha de ser inferior a 0,06 mg N/L.

En la presente invención, cuando se indica “elevado caudal” se refiere a un caudal igual o superior a 50 m³/h, preferiblemente entre 200 m³/h y 12.000 m³/h, y más preferiblemente
25 entre 400 y 6.000 m³/h.

En la presente invención, cuando se indica “baja concentración de especies nitrogenadas” se refiere a una concentración de amonio inferior a 2.5 mg N/L, y a una concentración de nitrito inferior a 0,5 mg N/L.

En la presente invención, cuando se indica “baja concentración de materia orgánica” se refiere a una concentración de carbono orgánico total inferior a 10 mg C/L.
30

En la presente invención, cuando se indica “aguas o efluentes procedentes de acuicultura de agua dulce” o “aguas residuales procedentes de acuicultura de agua dulce” se refiere a aguas caracterizadas por concentraciones bajas de especies nitrogenadas y de materia orgánica, es decir, concentraciones de amonio inferior a 2.5 mg N/L y concentración de nitrito inferior a 0,5 mg N/L y concentración de carbono orgánico total inferior a 10 mg C/L. Ha de tenerse en cuenta que mientras en aguas residuales industriales se permite una concentración de amonio de hasta 500 mg N/L, y en las aguas residuales urbanas de hasta 50 mg N/L, en los efluentes de acuicultura la concentración de amonio suele ser inferior a 2.5 mg N/L y para su utilización debe de ser entre inferior a 0,78 mg N/L.

Una de las ventajas del procedimiento de la invención es que permite eliminar amonio, nitrito y carbono orgánico cuando éstos ya se encuentran en muy bajas concentraciones.

En particular, el procedimiento de la invención tiene la ventaja de que permite eliminar amonio hasta en un 81% y eliminar nitrito en una proporción próxima a 100% (ver ejemplos y figura 5). Además permite obtener un REA de 20,8 mg N/(L·d) durante los primeros 16 días (ver ejemplos y figura 5). Esta eficacia en la eliminación de estos contaminantes hace que estos efluentes tratados puedan ser utilizados de nuevo en la producción.

Además, el procedimiento de la invención tiene la ventaja de realizar este tratamiento en un tiempo de residencia hidráulica (TRH) muy corto, en particular el TRH es igual o inferior a 1 hora, preferiblemente es un tiempo entre 30 minutos y 1 hora.

Así, en un aspecto la invención se dirige a un procedimiento para el tratamiento de aguas de caudal igual o superior a 50 m³/h y con concentraciones de amonio inferior a 2.5 mg N/L y de carbono orgánico total inferior a 10 mg C/L, que comprende:

a) dar entrada al influente por la parte inferior de un sistema que comprende

i) un reactor granular de flujo continuo que tiene un ratio altura/diámetro de entre 1 y 10 m/m, preferiblemente entre 2 y 6 m/m, y más preferiblemente entre 3,5 m/m y 4 m/m,

ii) una biomasa granular que comprende organismos nitrificantes,

iii) un agitador mecánico, y

iv) una malla horizontal en la parte superior,

b) operar en el sistema a tiempos de residencia hidráulica de entre 30 min y 1 hora,

c) dejar verter el efluente por la parte superior del sistema descrito en la etapa a), y

d) reutilizar el efluente.

- 5 En una realización particular, el procedimiento de la invención es para el tratamiento de aguas procedentes de acuicultura. En particular, el efluente se reutiliza en granjas acuícolas de agua dulce.

En una realización particular, el agitador mecánico es un agitador de palas, lo que mejora la mezcla y aumenta la transferencia de materia.

- 10 Además, el procedimiento de la invención no comprende una etapa de aeración. Esa etapa de aeración haría que se elevaran los costes de consumo eléctrico en el proceso, pero además reduciría la retención de biomasa al operar en estos tiempos de retención tan cortos.

El procedimiento de la invención no comprende materiales de soporte, como por ejemplo zeolitas, circunstancia que encarecería los costes de producción.

15

La biomasa granular y su formación

La biomasa del sistema comprende organismos nitrificantes que permiten la oxidación de amonio y nitrito. En una realización particular, la biomasa comprende bacterias oxidantes de amonio (Ammonium Oxidizing Bacteria, AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB). Los microorganismos AOB oxidan el amonio a nitrito y los NOB oxidan el nitrito a nitrato. El nitrato ya no presenta toxicidad para los organismos acuáticos en estas concentraciones (1,5 - 3,5 mg N/L).

20

La biomasa granular empleada en el procedimiento de la invención se forma por estrés hidrodinámico.

25

Así, en una realización particular, la biomasa granular utilizada en el procedimiento de la invención se obtiene mediante agregación a partir de lodos activos (inóculo) de tipo floculento que se introducen en el sistema descrito en la etapa a), al operar en las condiciones

del procedimiento de la invención, en particular al operar en continuo con elevados caudales y bajos tiempos de residencia hidráulica, es decir, TRHs inferiores a 1 h.

Debido al diseño del reactor, con un ratio altura/diámetro de entre 1 m/m y 10 m/m, preferiblemente entre 3,5 m/m y 4 m/m, y a los elevados caudales a los que se trabaja, se provoca una velocidad ascensional de entre 0,6 m/h y 1,3 m/h, que favorece que la biomasa se agregue en gránulos lo que incrementa su velocidad de sedimentación y queda retenida en el sistema. La malla horizontal en la parte superior del reactor sirve para retener los gránulos.

10 Sistema

Además, los autores de la presente invención han diseñado un sistema biológico de tratamiento para que el lodo activo, que contiene los microorganismos que llevan a cabo el tratamiento, quede retenido eficazmente, en particular cuando el sistema trabaja a elevados caudales y a bajas concentraciones de especies nitrogenadas contaminantes y de materia orgánica, en particular cuando trabaja con efluentes de acuicultura.

Así, en otro aspecto la invención se dirige a un sistema para el tratamiento de aguas de caudal igual o superior a 50 m³/h, TRH inferior a 1 h y con concentraciones de amonio inferior a 2.5 mg N/L y de carbono orgánico total inferior a 10 mg C/L, que comprende

- i) un reactor granular de flujo continuo que tiene un ratio altura/diámetro de entre 3,5 m/m y 4 m/m,
- ii) una biomasa granular que comprende organismos nitrificantes,
- iii) un agitador mecánico, y
- iv) una malla horizontal en la parte superior.

El sistema de la invención está diseñado para tratar elevados caudales procedentes, por ejemplo, de acuicultura y al mismo tiempo retener eficazmente la biomasa, de manera que sea eficaz en la eliminación de contaminantes nitrogenados como amonio y nitrito, y también eliminar materia orgánica.

En una realización particular, el reactor que se describe en el punto i) es un reactor de una capacidad superior a 25 L, más particularmente la capacidad es de entre 25 L y 40 L. El volumen del reactor viene definido por el caudal a tratar y TRH (inferior a 1h), por lo tanto en otras realizaciones el volumen del reactor será dependiente del caudal a tratar en cada caso específico y podrá ser establecido por el experto en la materia en cada caso.

Descripción de las figuras

La **figura 1** es un esquema del reactor empleado en el método de la invención, donde (1) representa los estanques de trucha, (2) representa el influente, (3) representa el agitador, (4) representa la malla, (5) representa el efluente.

10 La **figura 2** son imágenes de la biomasa del reactor: (a) inóculo; (b) día 85 de operación. La barra de tamaño indica 2 mm.

La **figura 3** representa la evolución de la velocidad de sedimentación de la biomasa. Se representa el descenso de la altura de la interfase biomasa/líquido en la probeta con el tiempo.

15 La **figura 4** representa la evolución de los valores del índice volumétrico de lodos de biomasa en el minuto 10 (■) y el minuto 30 (■) durante la operación del reactor.

La **figura 5** representa ratio REA (ж), concentraciones de influente (■) y efluente (□) de amonio, concentraciones de influente (▲) y efluente (Δ) de nitrito y concentraciones de influente (-) y efluente (+) de nitrato de la operación del CFGR a escala piloto. Las concentraciones inhibitorias de peces son para amonio 0,78 mg N/L (•••) y para nitrito 0,06 mg N/L (—).

La **figura 6** representa valores de pH del influente (◆) y efluente (◇); concentraciones de carbono inorgánico (CI) del influente (●) y efluente (○); y porcentaje de eliminación de amonio (•••) de la operación del reactor a escala piloto.

25 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben de considerarse como limitantes de la misma.

Materiales y métodos

Funcionamiento de la piscifactoría de trucha arco iris Grupo Tres Mares

Este estudio se desarrolló en la piscifactoría de producción intensiva de trucha arco iris Grupo Tres Mares (Figura 1), ubicada en Galicia. En condiciones lluviosas la fábrica toma un caudal de hasta 3 m³/s de un río cercano que pasa por los estanques de peces y se descarga a la orilla del mar conteniendo nitrógeno y materia orgánica. Sin embargo, durante la época de verano la falta de lluvias hace que el caudal del río disminuya siendo necesario respetar el caudal ecológico del mismo. Durante estas épocas de sequía el agua se recircula dentro de la planta para mantener el flujo constante permitiendo la alimentación de las truchas y evitando su estrés. Sin embargo, con esta recirculación, las concentraciones de amonio y materia orgánica aumentan debido al metabolismo de los peces y a los restos de comida que quedan sin digerir. Dado que los estanques están aireados, parte del amonio se oxida a nitrito y nitrato, por lo que también aumentan las concentraciones de óxidos de nitrógeno. El RAS de Grupo Tres Mares cuenta con un sistema de tratamiento basado en biofiltros rotatorios. Sin embargo, al tener que aplicar unos caudales de recirculación extremadamente altos, aunque este tratamiento elimina eficientemente los sólidos en suspensión, las concentraciones de los compuestos de nitrógeno apenas se reducen. Si la recirculación se prolonga en el tiempo, las concentraciones de amonio (aumento diario hasta 0,1 mg N/L) y nitrito aumentan por encima de valores tóxicos provocando la mortalidad de los peces. En consecuencia, la producción de trucha está limitada durante estos períodos ya que, si se mantiene la recirculación, estas concentraciones de amonio y nitrito se incrementarían hasta niveles intolerables para las truchas provocando una alta letalidad.

Métodos analíticos

Se tomaron muestras de las corrientes de influente y efluente con una periodicidad de 2 - 3 días a la semana para seguir el funcionamiento del reactor. Las muestras líquidas se filtraron usando un filtro de celulosa (tamaño de poro de 0,45 µm) para eliminar los sólidos en suspensión. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV), los sólidos suspendidos totales (SST) y el IVL se determinaron de acuerdo con los métodos estandarizados (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Water Works Association/American Public Works Association/Water Environment Federation. <https://doi.org/10.2105/AJPH.51.6.940-a>). El IVL es un método que describe la capacidad de sedimentación de un lodo, se describe como el volumen que ocupa el lodo en un recipiente en un determinado intervalo de tiempo (10 y 30 min, IVL₁₀ e IVL₃₀, respectivamente) sobre el volumen inicial del recipiente, dividido por la

concentración de sólidos de dicho lodo (a menor IVL mejor sedimentación). La velocidad de sedimentación se midió en una probeta de 100 mL (diámetro interno de 25 mm) siguiendo el descenso de la interfase agua-biomasa con el tiempo. El diámetro de los gránulos se determinó utilizando un microscopio (Stemi 2000-C, Zeiss) que incorpora una cámara digital (Coolsnap, Roper Scientific Photometrics), estas imágenes se procesaron utilizando el software Image ProPlus®.

Se aplicó un método espectrofotométrico para determinar las concentraciones de amonio, nitrito:

Determinación de amonio:

El amonio se determina espectrofotométricamente mediante un método basado en la producción de azul de indofenol mediante la reacción de amoníaco con salicilato e hipoclorito, en presencia de nitroprusiato de sodio (Bower, C.E., Holm-Hansen, T., 1980. A Salicylate–Hypochlorite Method for Determining Ammonia in Seawater. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 794–798. <https://doi.org/10.1139/f80-106>). La muestra líquida debe filtrarse antes de su análisis.

- 15 • Reactivos:
 - Reactivo A: 0,28 g/L de nitroprusiato de sodio y 440 g/L de salicilato de sodio se mezclan en agua destilada.
 - Reactivo B: Se mezclan 18,5 g/L de NaOH y 120 g/L de citrato de sodio en agua destilada.
 - 20 • Reactivo C: solución comercial de hipoclorito de sodio.
 - Reactivo D: mezcla de 7 partes de reactivo B y 1 parte de reactivo C. El reactivo D es estable durante 1 hora después de su preparación
- Curva de calibrado: En primer lugar, se prepara una solución madre de 10 mg de NH_4^+ /L. En segundo lugar, se preparan muestras más diluidas para generar una curva de calibración, en un rango de 0-0,9 mg NH_4^+ /L. Luego, se mide la absorbancia de cada muestra con el espectrofotómetro y se relaciona con la concentración de amonio (en términos de mg N/L) mediante la curva de calibración.
- 25 • Procedimiento experimental: En primer lugar, se añaden 600 μL de reactivo A y 1 mL de reactivo D a 5 mL de muestra filtrada a cada tubo de ensayo. El tiempo de reacción se fija entre 2 y 3 horas. Las muestras deben protegerse de la luz. La medición de la muestra
- 30

coloreada se realiza con un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800) a una longitud de onda de 640 nm. La concentración se obtiene por comparación de la absorbancia obtenida con los valores de la curva de calibración.

Determinación de nitrito:

- 5 El nitrito se determina espectrofotométricamente mediante un método basado en la producción de un colorante azo púrpura rojizo a pH 2,0 - 2,5 mediante la combinación de sulfanilamida con diclorhidrato de N- (1-naftil) -etilendiamina (NED diclorhidrato). Este procedimiento corresponde al método 4500-NO₂-B (Método Colorimétrico) de los métodos estandarizados (Standard Methods for the Examination of Water and
- 10 Wastewater, American Water Works Association/American Public Works Association/Water Environment Federation. <https://doi.org/10.2105/AJPH.51.6.940-a>).
- Reactivos:
 - Sulfanilamida: se disuelven 10 g de sulfanilamida en 100 mL de HCl concentrado y 600 mL de agua destilada. Después de enfriar, el volumen se llena hasta 1 L con
 - 15 agua destilada.
 - NED: se disuelven 0,5 g de NED en 500 mL de agua destilada
 - Curva de calibrado: En primer lugar, se prepara una solución madre de 10 mg de NO₂⁻/L. En segundo lugar, se preparan muestras más diluidas para generar una curva de calibración confiable, en el rango de 0-0,25 mg N-NO₂⁻/L. Luego, se mide la absorbancia
 - 20 de cada muestra con el espectrofotómetro y se relaciona con la concentración de nitrito (en términos de mg N/L) mediante la curva de calibración
 - Procedimiento experimental: Se agrega un volumen de 0.1 mL de cada reactivo a 5 mL de muestra en el tubo de ensayo. El tiempo mínimo de reacción para la estabilización del color es de 20 minutos. La medición de la muestra coloreada se realiza en el
 - 25 espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800) a una longitud de onda de 543 nm. La concentración se da por comparación de la absorbancia obtenida con los valores de la curva de calibración.

Carbono orgánico total (COT) y carbono inorgánico (CI):

El COT es independiente del estado de oxidación de la materia orgánica y no mide otros

30 elementos ligados orgánicamente, como nitrógeno, hidrógeno e inorgánicos que pueden

contribuir a la demanda de oxígeno. Para determinar la cantidad de carbono unido orgánicamente, las moléculas orgánicas deben descomponerse y convertirse en una forma molecular de carbono único que se pueda medir cuantitativamente. La concentración de COT se determinó mediante un analizador Shimadzu (TOC-LCSN) como la diferencia entre las concentraciones de carbono total (CT) y carbono inorgánico (CI). El instrumento se conectó a un muestreador automático (Shimadzu, ASI-L). La concentración de CT se determinó a partir de la cantidad de CO₂ producido durante la combustión de la muestra a 720 °C, utilizando platino inmovilizado sobre esferas de alúmina como catalizador. La concentración de CI se obtuvo a partir del CO₂ producido en la descomposición química de la muestra con HCl (1 M) a temperatura ambiente.

5 El CO₂ producido se midió ópticamente con un analizador de infrarrojos no dispersivo (NDIR) después de enfriarlo y secarlo. Se utilizó aire de alta pureza como gas portador con un flujo de 150 mL/min. Una curva que comprende al menos cuatro puntos de calibración en el rango de 0 a 1 g C/L, usando ftalato de potasio (C₈H₅KO₄) como estándar para CT y una mezcla de carbonato y bicarbonato de sodio (Na₂CO₃ / NaHCO₃, 3: 4 p / p) para CI, se utilizó para la cuantificación.

15 Determinación microbiológica:

El ADN genómico total se extrajo usando el Stool DNA Isolation KIT (Norgen. Thorold, Canadá). Las concentraciones totales de ADN se cuantificaron en un fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, EE. UU.) Y se verificó la integridad del tamaño mediante electroforesis estándar. La región hipervariable de V3V4 para bacterias se amplificó usando

20 Bakt_341F (5 'CCT ACG GGN GGC WGC AG 3') y Bakt_805R (5 'GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC 3') (Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., Andersson, A.F., 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. The ISME Journal 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>). AllGenetics & Biology SL (www.allgenetics.eu) llevó a cabo análisis de metabarcoding de ADN

25 de la región.

El análisis bioinformático de los datos de NGS (Next Generation Sequencing) se realizó utilizando el módulo Microbial Genomics (versión 21.1) del banco de trabajo CLC Genomics (versión 21.0.3). Las secuencias sin procesar se filtraron para eliminar las lecturas de baja calidad y luego se agruparon en Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) con un límite del 97% para

30 la similitud de secuencia y se clasificaron frente a la versión no redundante de la base de datos de taxonomía de referencia SILVA SSU (versión 132; [http:// www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)). Se realizaron

ensayos adicionales para las OTU bacterianas más abundantes (por encima del 0,5% del total de OTU observadas). Las variaciones de la estructura de la comunidad se visualizaron utilizando el análisis de componentes principales (PCoA). Se aplicó el análisis de redundancia restringida basado en la distancia (db-RDA) para encontrar los parámetros operativos que explicaban mejor la diversidad observada en el PCoA no restringido, con base en la matriz de distancias UniFrac ponderada por pares.

Descripción de la operación del reactor

Dado que la piscifactoría sólo recircula agua durante la época seca, la planta piloto se operó durante los 100 días correspondientes a la estación seca. La planta piloto se operó como un reactor granular alimentado en continuo (continuous flow granular reactor, CFGR). El reactor CFGR consiste en un cilindro metálico de 30 L con un ratio altura diámetro de 3,8 m/m (Figura 1). La alimentación entra al reactor por la parte inferior y el efluente se vierte por la parte superior por rebose. En su interior dispone de un agitador mecánico y una malla en la parte superior. Por lo tanto el mecanismo de mezcla era la propia fuerza ascensional del agua más la agitación del agitador mecánico. La malla actúa como sistema de retención de la biomasa. El TRH al que se operó el reactor fue muy corto (33 - 68 min) y por tanto la velocidad ascensional era elevada (0,6 - 1,3 m/h).

No se controlaron la temperatura y el pH. El pH del agua estaba entre 5,6 - 6,4 y la temperatura entre 17 y 26 °C. La concentración de oxígeno disuelto (OD) fue muy variable debido a la oxigenación de los tanques de trucha y estuvo entre 2,9 y 9,6 mg O₂/L. Las concentraciones de carbono orgánico total (COT) y amonio eran muy bajas y variaron entre 2,2 - 8,4 mg C/L y 0,12 - 1,84 mg N/L.

El reactor piloto fue inoculado con lodo secundario del tratamiento biológico de la misma depuradora (EDAR de Silvouta, cercana a Santiago de Compostela) con una concentración inicial de biomasa de 4,94 g SST/L. Este lodo se caracterizó antes de la puesta en marcha del reactor presentando un IVL de 461 mL/g SST y una velocidad de sedimentación de 0,02 m/h .

El reactor fue alimentado *in situ* con el agua de recirculación de la empresa Grupo Tres Mares (Lires-Cee A Coruña). Dicho influente contenía concentraciones muy bajas de amonio (0,3 - 1,4

mg N/L), nitrito (0,04 - 0,35 mg N/L) y materia orgánica (3,5 - 7,7 mg COT/L). Cabe destacar que estas concentraciones de contaminantes nitrogenados suponen un riesgo por superar los valores de toxicidad para los peces de la granja (trucha arco iris). El pH del agua estaba entre 5,6 - 6,4 y la temperatura entre 17 y 26 °C.

5

Resultados

Granulación del lodo y retención en el reactor

La aplicación de TRH cortos es obligatoria para tratar los altos caudales de la acuicultura de agua dulce. La aplicación de un TRH de entre 52 - 68 min favoreció la formación de los primeros
10 agregados floculantes, los cuales aparecieron antes del día 7. Sin embargo, fueron necesarios 55 días para observar los primeros gránulos independientes, bajando el TRH a 45 min durante este periodo. Dicho TRH se siguió disminuyendo hasta 33 min, obteniéndose el día 85 un valor medio del diámetro de los gránulos de $0,47 \pm 0,18$ mm (Figura 2). El alto caudal de alimentación debido a los cortos TRH aplicados implicó una velocidad ascensional rápida (0.6 - 1.3 m/h) que mejora
15 la capacidad de sedimentación del lodo granular aerobio en condiciones de baja carga.

La biomasa con la que se inoculó el reactor era de tipo floculenta, así fueron el estrés debido a la velocidad ascensional más la agitación los que propiciaron la agregación de la misma. Esto hizo que la sedimentación de la biomasa mejorara considerablemente favoreciendo su retención en el reactor. Esto se demostró midiendo el índice volumétrico de lodos (IVL) que se redujo de 480
20 mL/g SST en el inóculo a 98 mL/g SST el día 72 de operación. También mejoró la velocidad de sedimentación que pasó de 0,02 m/h en el inóculo a 3,06 m/h el día 78 de operación. La biomasa se agregó en forma de gránulos bien definidos (Figura 2) que presentaban un diámetro de 0,47 mm el día 85 de operación. El sistema fue capaz de retener la biomasa a pesar de las concentraciones tan bajas de nitrógeno y carbono con las que se alimentó, siendo la concentración
25 de biomasa en el reactor entre 1 y 2 g TSS/L durante toda la operación.

La mejora de la sedimentación de la biomasa fue muy rápida lo que permitió que se retuviese en el reactor. El lodo con el que se inoculó presentaba una velocidad de sedimentación de tan sólo 0,02 m/h. Sin embargo, en el día 30 fue de 0,26 m/h. La velocidad de sedimentación continuó mejorando hasta 3,39 m/h en el día 84 de operación (Figura 3).

El índice volumétrico de lodos (IVL) siguió la misma tendencia de mejora. Mientras que el inóculo tenía un IVL_{30} de 461 mL/g SST el día 36 fue de 153 mL/g SST. Esta mejora continuó hasta 79 mL/g SST el día 84 (Figura 4). Además, es importante destacar el ratio IVL_{30}/IVL_{10} que indica el estado de formación de gránulos y las propiedades de sedimentación de la biomasa, ya que en el inóculo este ratio fue de 0,53 y el día 84 aumentó a 0,95. Estos resultados coinciden con la velocidad de sedimentación más rápida lograda en estos períodos. Por lo tanto, los resultados mostraron la capacidad del reactor CFGR para retener la biomasa y así poder realizar un tratamiento de la corriente de recirculación en acuicultura de agua dulce a valores de TRH muy bajos.

10 Conversiones de nitrógeno

El amonio y nitrito son las especies contaminantes más tóxicas en sistemas RAS de acuicultura. Concentraciones de amonio superiores a 0,78 mg N/L son tóxicas para la trucha arco iris y se reportó que las concentraciones de nitrito entre 0,06 a 0,12 mg N/L causan un 50% de mortalidad (Salmonid hatchery water reuse systems. *Aquaculture* 1, 317–335. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(72\)90033-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(72)90033-6); Russo, R.C., Smith, C.E., Thurston, R. V., 1974. Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J.FISH.RES.BOARD CANADA* 31, 1653–1655. <https://doi.org/10.1139/f74-208>). Por lo tanto, aunque las concentraciones de contaminantes nitrogenados sean bajas en RAS, su eliminación es crucial para el correcto funcionamiento de la piscifactoría. Por otra parte el nitrato se encuentra en concentraciones superiores ya en el agua del río, pero este compuesto no supone un peligro para los peces. El reactor se adaptó rápidamente a estas condiciones de acuicultura de agua dulce logrando porcentajes de eliminación de amonio de hasta 81 % y un ratio de eliminación de amonio (REA) de 20,8 mg N/(L·d) durante los primeros 16 días (Figura 5). Desde el día 16 al día 48, la eliminación de amonio fluctuó entre el 11 y el 51%. Esta disminución podría estar relacionada con concentraciones más bajas de oxígeno disuelto y carbono inorgánico (Figura 6) en el influente ya que ambos son sustratos necesarios para el proceso de nitrificación. Desde el día 48 hasta el final de la operación, la eliminación de amonio aumentó hasta un 81%. Este aumento puede estar asociado con mejores propiedades de sedimentación de la biomasa (Figura 3) y menores concentraciones de amonio en el influente (0,32 - 0,95 mg N/L) siendo el REA alcanzado de 16,4 mg N/(L·d).

El nitrito se produce por la oxidación del amonio dentro de los estanques de peces, pero su acumulación sólo es relevante cuando se aplica recirculación. En los primeros días de operación, la concentración de nitrito en el influente de la planta piloto fue casi nula. Sin embargo, a medida que pasaban los días utilizando la recirculación, la concentración de nitrito en la alimentación al reactor de la planta piloto comenzó a aumentar (día 8). Hasta el día 30 hubo un aumento en la concentración de nitrito en el influente con contracciones entre 0,2 y 0,8 mg N/L, durante este período la eliminación del reactor fue de entre 72 - 100 %. A partir del día 30 la concentración de nitrito en el influente se estabilizó entre 0,1 y 0,2 mg N/L y se alcanzaron eliminaciones de nitrito cercanas al 100 %.

La concentración de nitrato aumentó en el efluente indicando que en el CFGR se desarrollaron los procesos de nitrificación. Los balances de materia indican que todo el amonio y nitrito que se elimina coincide con el nitrato producido. El descenso de pH entre el influente y el efluente también corrobora la existencia de nitrificación, ya que durante dicho proceso se consume alcalinidad con la consecuente bajada del valor del pH. Durante casi toda la operación los valores de pH disminuyeron alrededor entre 0,15 y 0,30 en el efluente. Además, el carbono inorgánico se consumió en el CFGR indicando procesos autótrofos. Estos resultados indicaron que los perfiles de pH y oxígeno pueden usarse para monitorizar el desempeño del reactor (Figura 6).

Se lograron eliminaciones de amonio y nitrito de hasta 81 (amonio) y 100% (nitrito), presentando, durante la mayor parte de la operación del CFGR, concentraciones inferiores a los valores tóxicos para las truchas (Figura 5). Dado que el amonio y nitrito son unos de los compuestos más peligrosos para la trucha arco iris en RAS, este resultado aumenta el potencial de esta tecnología para el tratamiento del agua de recirculación en acuicultura de agua dulce.

El CFGR pudo reducir la concentración de amonio entre 0,20 - 0,70 mg N/L durante la operación. Por otra parte, el aumento diario de la concentración de amonio en la corriente de salida de los tanques de peces cuando se aplica recirculación fue de alrededor de 0,05 - 0,20 mg N/L (Figura 5). Por lo tanto, el reactor a escala real sería capaz de proporcionar un efluente capaz de mantener la concentración de amonio por debajo de 0,78 mg N/L, que es la concentración tóxica máxima aceptable en una exposición prolongada para la trucha arco iris.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el tratamiento de aguas de caudal igual o superior a 50 m³/h y con concentraciones de amonio inferior a 2.5 mg N/L y de carbono orgánico total inferior a 10 mg C/L, que comprende:

- 5 a) dar entrada al influente por la parte inferior de un sistema que comprende
- i) un reactor granular de flujo continuo que tiene un ratio altura/diámetro de entre 1 m/m y 10 m/m,
 - ii) una biomasa granular que comprende organismos nitrificantes,
 - iii) un agitador mecánico, y
- 10 iv) una malla horizontal en la parte superior,
- b) operar en el sistema a tiempos de residencia hidráulica de entre 30 min y 1 hora,
- c) dejar verter el efluente por la parte superior del sistema descrito en la etapa a), y
- d) reutilizar el efluente.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la biomasa comprende bacterias oxidantes de amonio (Ammonium Oxidizing Bacteria, AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (Nitrite Oxidizing Bateria, NOB).

15

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la biomasa se obtiene mediante agregación a partir de lodos activos (inóculo) de tipo floculento que se introducen en el sistema descrito en la etapa a), al operar en las condiciones del procedimiento de la

20 reivindicación 1.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el agitador mecánico es un agitador de palas.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el efluente de la etapa d) se reutiliza en granjas acuícolas.

25 6. Sistema para el tratamiento de aguas de caudal igual o superior a 50 m³/h y con concentraciones de amonio inferior a 2.5mg N/L y de carbono orgánico total inferior a 10 mg C/L, que comprende

i) un reactor granular de flujo continuo que tiene un ratio altura/diámetro de entre 1 m/m y 10 m/m,

ii) una biomasa granular que comprende organismos nitrificantes,

iii) un agitador mecánico, y

5 iv) una malla horizontal en la parte superior.

7. El sistema según la reivindicación 6, donde la biomasa comprende bacterias oxidantes de amonio (Ammonium Oxidizing Bacteria, AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (Nitrite Oxidizing Bateria, NOB).

8. El sistema según la reivindicación 6 o 7, donde el agitador mecánico es un agitador de
10 palas.

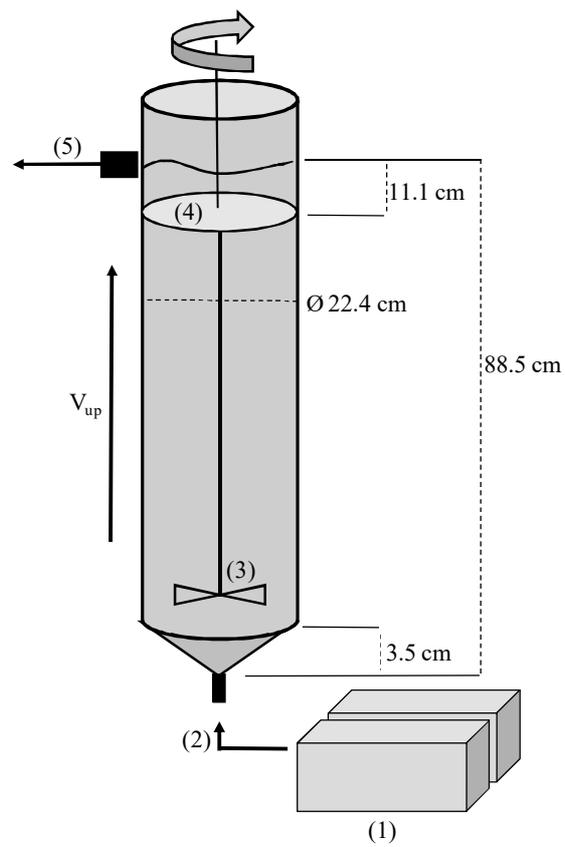


Figura 1

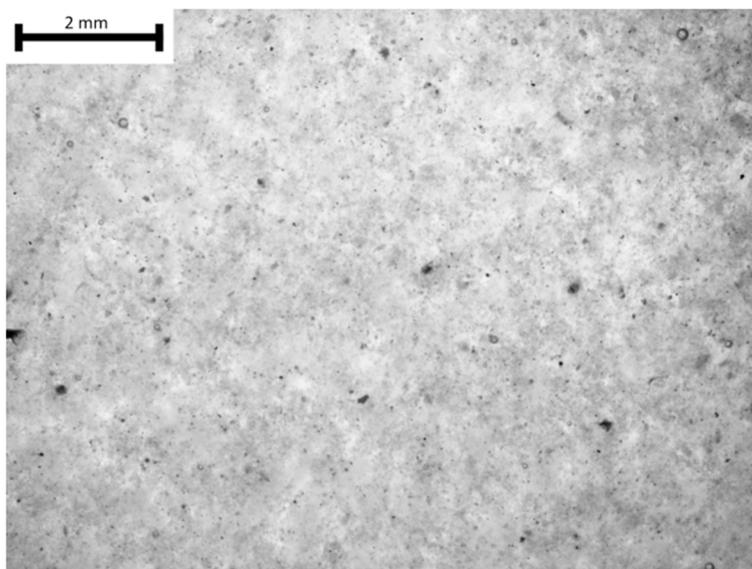


Figura 2a

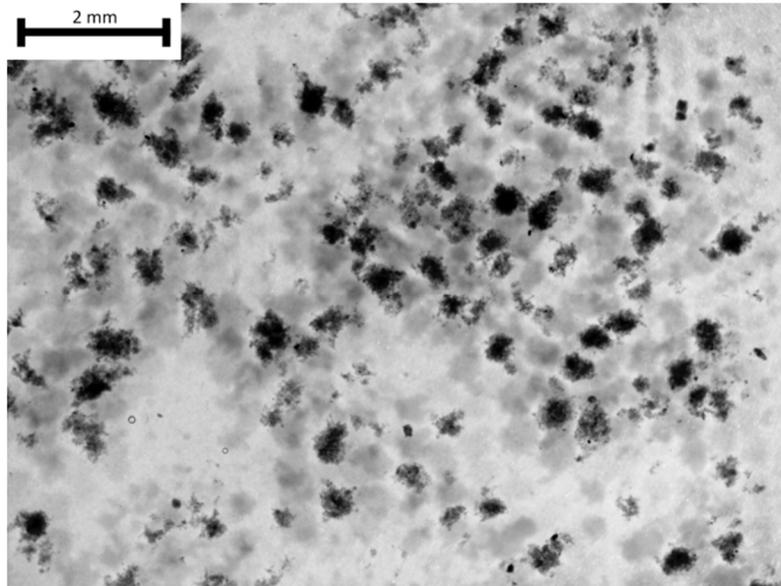


Figura 2b

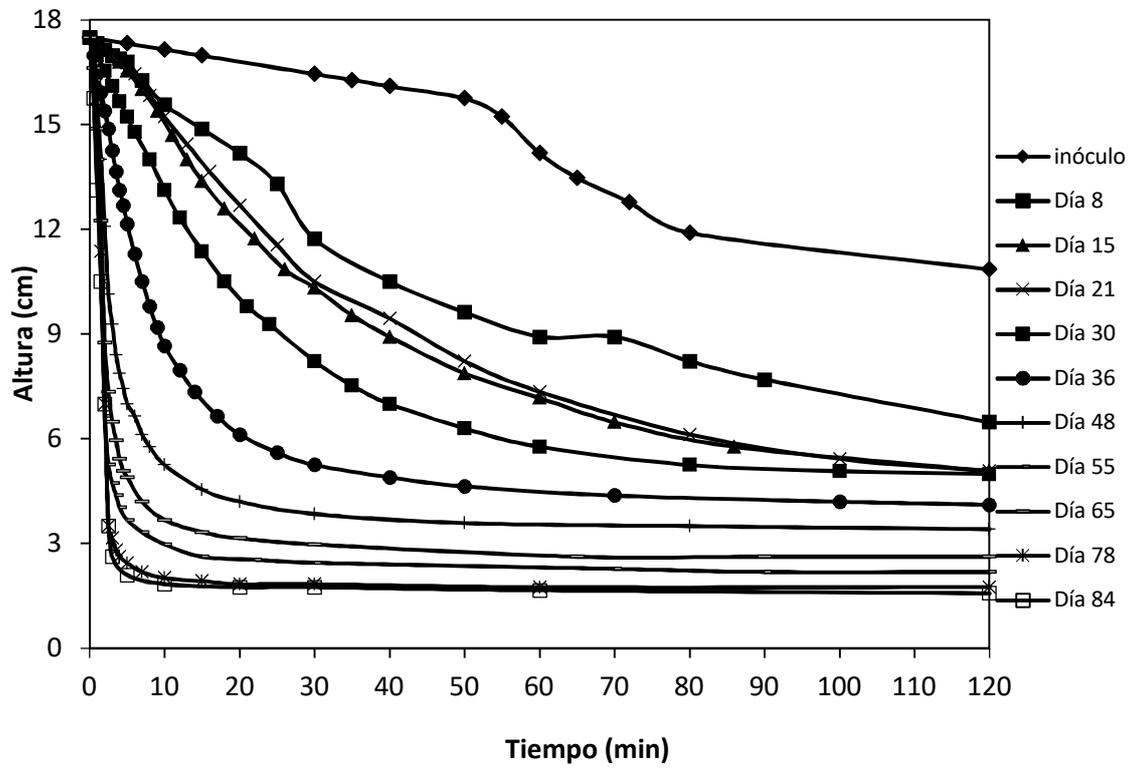


Figura 3

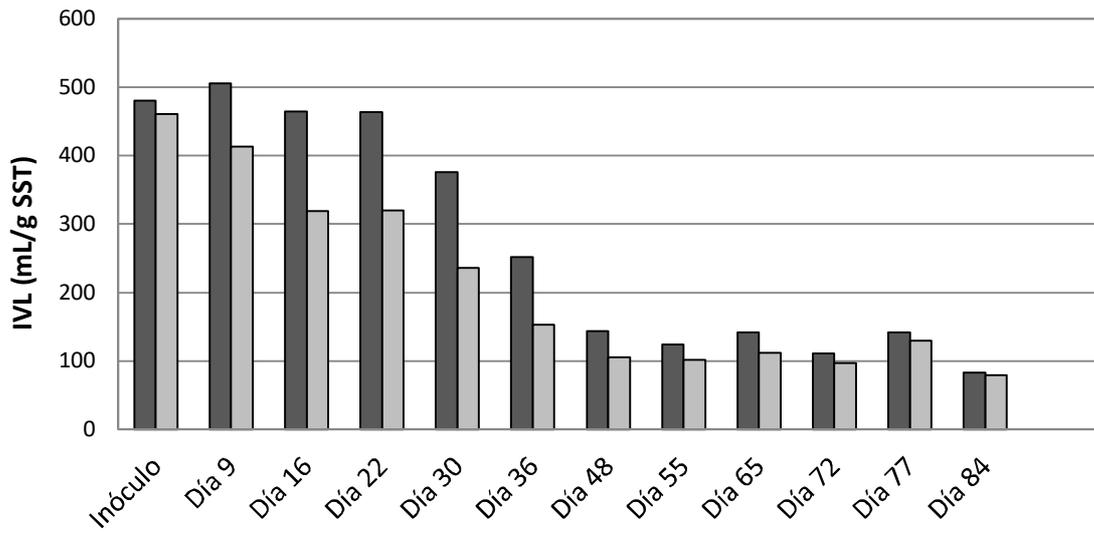


Figura 4

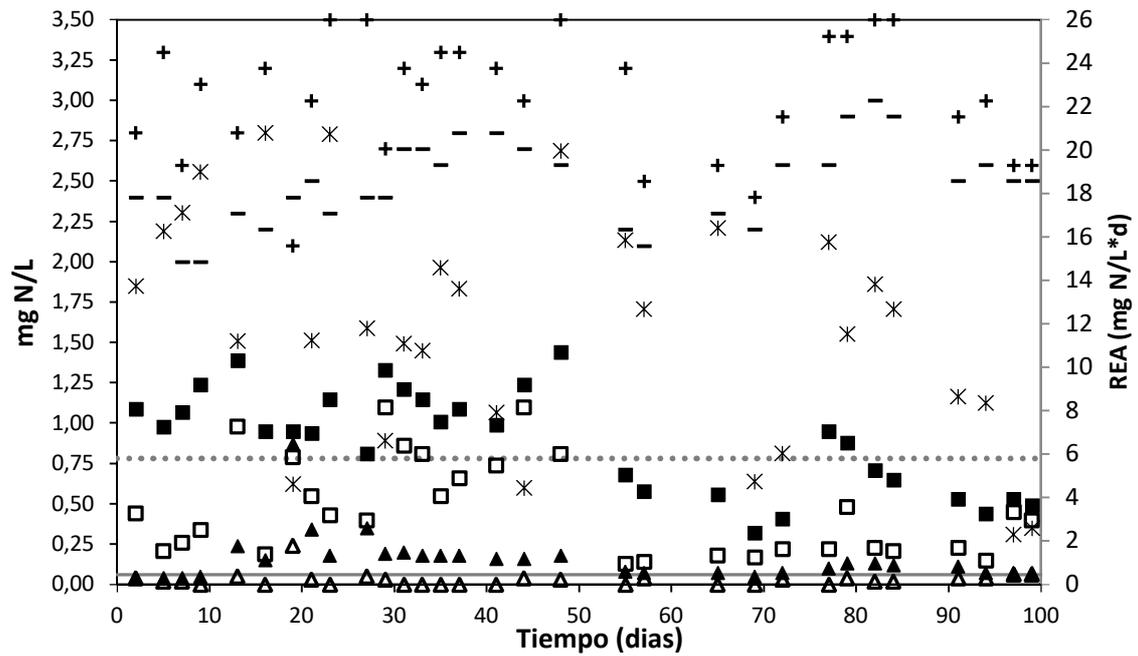


Figura 5

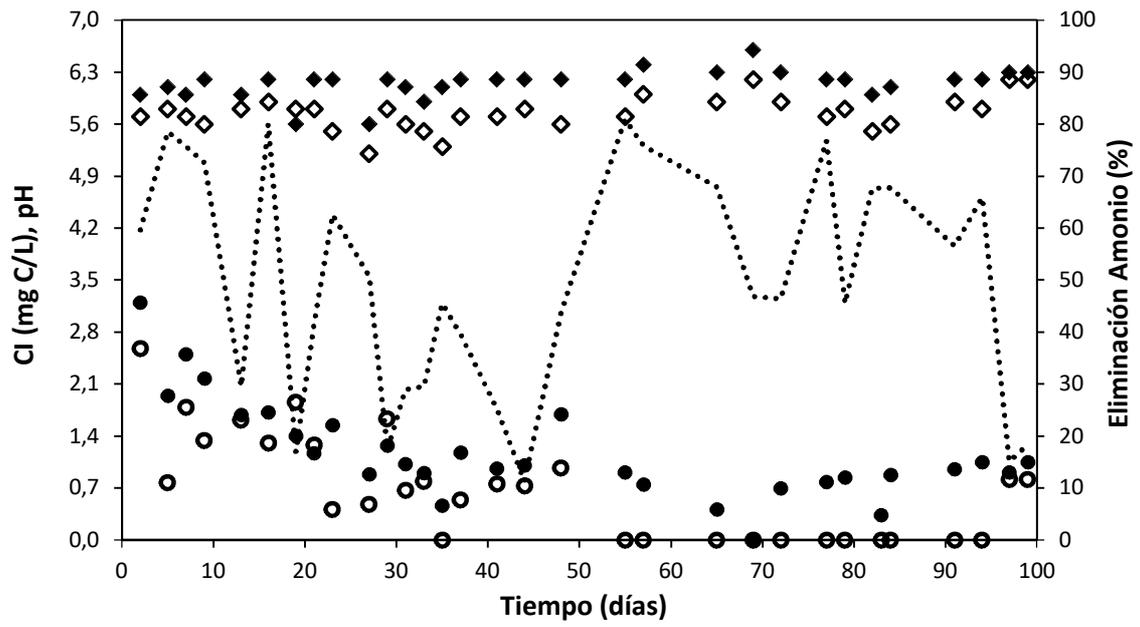


Figura 6