

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LUGAR DE ESTUDIO

Esta tesis doctoral se realizó en el Laboratorio de la Sección de Ingeniería Sanitaria y Ambiental de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos de Barcelona de la Universidad Politécnica de Cataluña (UPC). Los trabajos de investigación contaron con la colaboración del Departamento de Química Ambiental del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y del Departamento de Zoología de Invertebrados de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (UB).

4.2. DESCRIPCIÓN DE LAS INSTALACIONES UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO

Las instalaciones utilizadas durante toda la parte experimental de la tesis doctoral constan de los siguientes elementos:

4.2.1. Toma e impulsión del ARU hacia el laboratorio

La captación del ARU se llevó a cabo desde un pozo situado en la calle Gran Capitán y conectado a la red de alcantarillado de la ciudad de Barcelona. Las dimensiones del pozo son 0,7 x 0,7 m² de base y 1 m de profundidad por debajo de la alcantarilla (Escaler 1997). Se puede acceder al interior del pozo por unos escalones clavados en la pared del mismo. En el pozo se halla instalada una electrobomba sumergible conectada a una tubería de PVC que llega hasta el Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. La Figura 4.1 muestra un esquema del pozo de bombeo.

La electrobomba es de la marca ABS (modelo Piranha 17-2), con capacidad para impulsar un caudal de 2 l/s a una altura de 18 m de columna de agua. La potencia del eje del motor es de 2,2 kW, mientras que la potencia absorbida por la bomba es de 1,6 kW. Justo antes del rodete impulsor hay instalado un mecanismo triturador que impide el paso de partículas de cierto grosor. Además dispone de una válvula antirretorno de bola que le permite estar siempre cebada. Esta bomba está conectada a un codo de PVC donde se halla instalada una válvula de esfera para cerrar el paso del agua.

El agua residual bombeada llega hasta un depósito de reserva (dentro del laboratorio) por una tubería de PVC de 63 mm de diámetro nominal y 4 atm de presión admisible. Antes de llegar a este primer depósito, una pieza T permite retornar el ARU por gravedad a la alcantarilla municipal y justo después hay una válvula para abrir o cerrar el paso del agua.

4.2.2. Descripción de las instalaciones previas al RBS

En este apartado se describen las características de las instalaciones situadas antes

del RBS que fueron utilizadas durante el estudio. El estudio tuvo dos fases experimentales, cuyo objetivo común fue optimizar el proceso de eliminación biológica de materia orgánica, nitrógeno y fósforo en un RBS de laboratorio. Esta optimización se realizó a partir de las sugerencias obtenidas de la revisión bibliográfica y de las conclusiones realizadas en una investigación previa en este mismo lugar de trabajo (Escaler, 1997). A continuación se describen las instalaciones utilizadas en cada una de las dos fases.

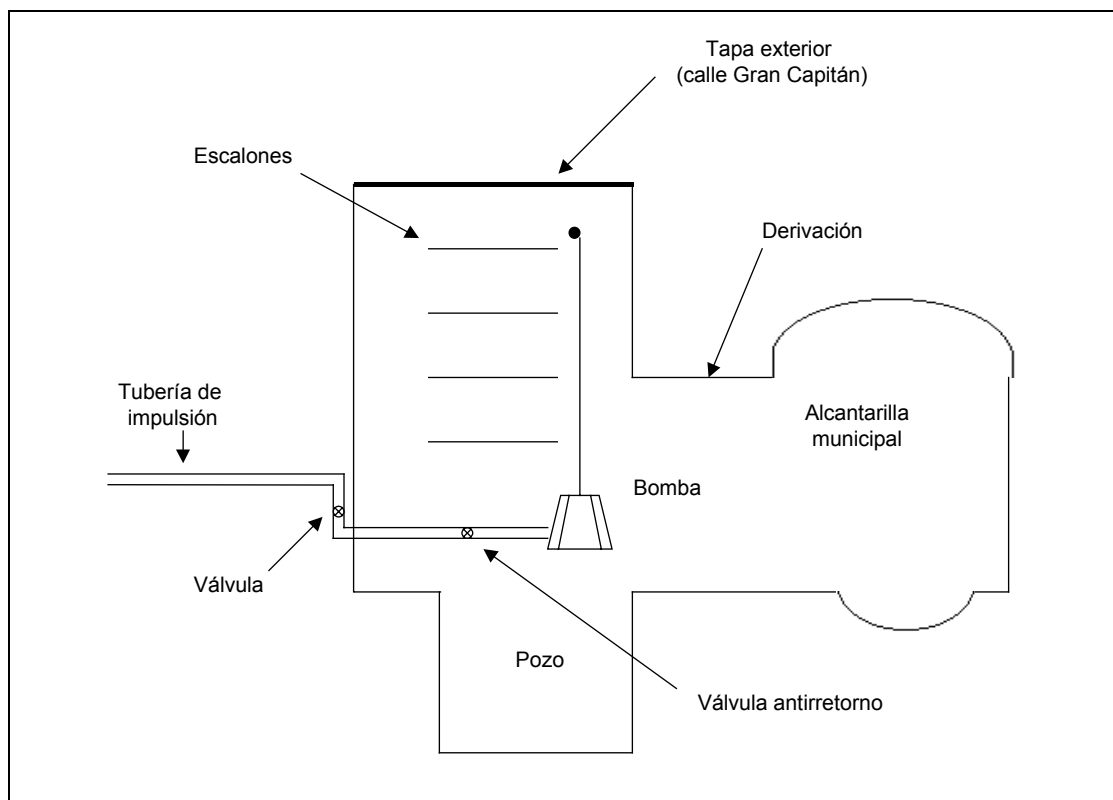


Figura 4.1. Esquema del pozo de bombeo (García, 1996)

Primera fase experimental

La Figura 4.2 presenta un esquema de las instalaciones que constituyeron esta primera fase. El primer depósito al que llegaba el ARU dentro del laboratorio era un depósito receptor rectangular, de poliéster, con una capacidad aproximada de 500 l. En el fondo de este depósito se encontraba una salida de agua regulada por una llave de paso que permitía vaciar y retornar el agua a la alcantarilla. El ARU que entraba en este depósito se mantuvo continuamente agitada. Cuando el nivel de agua residual ocupaba la mitad de la capacidad del depósito, se accionaba la bomba que mandaba el agua residual hacia un depósito de reserva más elevado.

El bombeo hacia el depósito de reserva se realizaba mediante una bomba de calefacción Roca modelo PC-1035, que trabajaba a una velocidad de giro de 2670 rpm, con una potencia de 124 W. La tubería de impulsión era una manguera flexible de poliamida de 20 mm de diámetro interior. El depósito de reserva era también

rectangular fabricado con poliéster y con una capacidad de 200 l. Este depósito estaba cerrado y la entrada de ARU se realizaba por un orificio hecho en la tapa del depósito donde una manguera penetraba unos 5 cm. En este depósito había instalado un dispositivo eléctrico interruptor con una boya de nivel para controlar el llenado. Cuando la boya llegaba a un cierto nivel, la bomba de impulsión dejaba de funcionar, finalizando así el llenado. Asimismo, este depósito disponía de un vertedero y también de una salida de fondo regulada por una llave de paso que permite retornar el agua al depósito receptor. Finalmente, el depósito de reserva dispuso de un sistema de agitación eléctrico permanente, al que se le retiró el sistema de aireación que se había instalado en un estudio previo a la presente tesis.

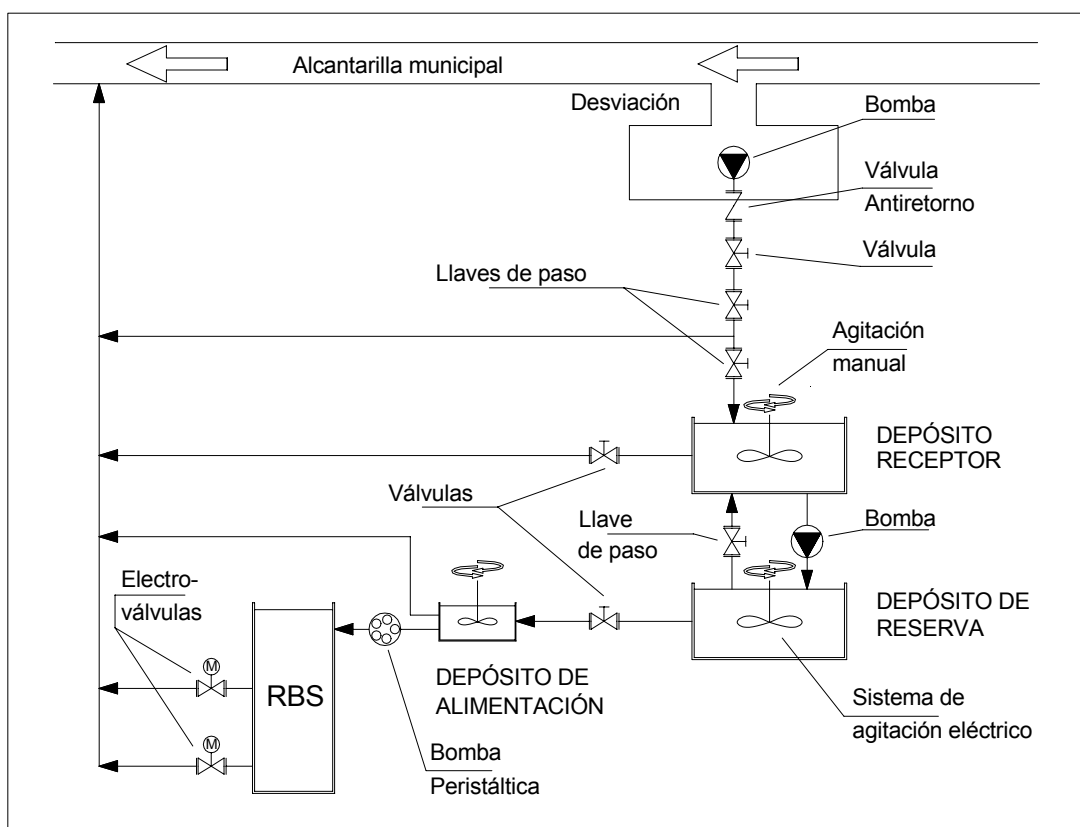


Figura 4.2. Esquema de las instalaciones utilizadas en el estudio de eliminación biológica de nutrientes en un RBS.

En la parte inferior del depósito de reserva había otra salida de agua conectada a un tubo de poliuretano de 10 mm de diámetro, a través del cual el agua almacenada bajaba por gravedad hasta un **depósito de alimentación** de PVC de 20 l de capacidad, situado a la misma altura que el reactor. En un costado del depósito de alimentación, y a 2 cm del fondo, había dos salidas de agua. Por una de ellas se alimentaba al RBS a través de un tubo látex de 10 mm de diámetro interior y por la otra salida se alimentaba a un reactor de configuración VIP el cual se utilizaba en el estudio de otra tesis doctoral. En el depósito de alimentación se instaló también un sistema de agitación del ARU que consistió en un eje con aspas rectangulares de metacrilato acoplado a un motor eléctrico Crouzet modelo 82.344.0 que giraba a 10 r.p.m. Por otra parte, se retiró la boya que controlaba el nivel del agua en este tercer

depósito y en su lugar se instaló una electroválvula. Esta electroválvula se conectó a un temporizador programado para que funcionara automáticamente durante las 24 horas del día.

La estructura básica de estas instalaciones fue la utilizada en el trabajo de Escaler (1997), aunque con dos diferencias significativas en el mecanismo de funcionamiento general. Primero, el esquema original no disponía de agitación del ARU en ninguno de los tres depósitos previos al reactor (receptor, reserva y alimentación), con lo cual la carga de sólidos y DQO afluentes eran reducidos. Segundo, el tanque de reserva disponía de un mecanismo de aireación con el cual se pretendía evitar las condiciones anaeróbicas del afluente. Para la realización de la presente tesis doctoral se decidió modificar ambos mecanismos de funcionamiento con la finalidad de favorecer el crecimiento de la biomasa y de incrementar la DQO biodegradable dentro del sistema de tratamiento.

Segunda fase experimental

La segunda fase experimental mantuvo la estructura y las condiciones de funcionamiento de las instalaciones previas al reactor, descritas anteriormente, con excepción del depósito de alimentación, que fue substituido por las siguientes unidades:

Prefermentador acidogénico.
Depósito receptor del ARU fermentada.

• Diseño y montaje del prefermentador

El primer paso para diseñar un fermentador de sólidos primarios a escala de laboratorio fue realizar una investigación bibliográfica de los tipos de fermentador, sus parámetros de control y los factores de diseño estudiados y recomendados en diferentes referencias (Eastman y Ferguson, 1981; Rabinowitz *et al.*, 1987; Sedlak, 1991; Pitman, 1991, Pitman *et al.*, 1992; Randall *et al.*, 1992; Gonçalves *et al.*, 1994; Skalsky y Daigger, 1995; Christensson, 1997; Münch, 1998). El apartado 3.7. del Capítulo 3 describe detalladamente estos criterios y las cuatro configuraciones de prefermentadores más comúnmente estudiadas. El segundo paso fue llevar a cabo estudios previos sobre las propiedades fermentativas del ARU (potencial de AGV).

El tipo de prefermentador seleccionado fue el de tanque primario activado (TPA). El diseño básico del prefermentador se basó en las características descritas para este tipo de fermentadores (Sedlak, 1991; Randall *et al.*, 1992 y Münch, 1998;). El prefermentador adoptado, fue básicamente un decantador primario operado con un TRS elevado y una recirculación del fango hacia el afluente del TPA, con el fin de realizar la elutriación de los AGV producidos.

Se eligió uno de los decantadores de laboratorio disponibles en el Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental y se modificó de acuerdo a los criterios de configuración de un TPA. El decantador elegido estaba construido de polimetilmetacrilato (PMMA) y tenía una capacidad de 3,3 litros. Constaba de una zona cilíndrica, una zona cónica, un vertedero central con perfil dentado en forma de

sierra y una base maciza. La zona cilíndrica era de 21 cm de altura, 15 cm de diámetro interno y tenía paredes de 3,5 mm de grosor. La zona cónica era de 7 cm de altura, mientras que el vertedero constaba de un diámetro interno de 4 cm. La Figura 4.3 presenta un esquema del alzado de este prefermentador, en el se muestran las partes originales del mismo. La Figura 4.4 muestra un esquema del montaje completo del prefermentador con cada una de las partes que finalmente lo integraron. Las modificaciones y ampliaciones a este diseño básico de decantador fueron las siguientes:

- a) **Construcción y montaje de un rascador giratorio y robusto.** Este rascador se hizo de lámina de caucho con la finalidad de evitar la acumulación de fango en las paredes del decantador. El rascador se acopló a un motor monofásico de la marca Crouzet de 0,5 r.p.m. a través de una pieza de soporte del motor de 4 cm de longitud por 1,5 cm de ancho.
- b) **Distribución de los orificios de circulación de agua y fango.** El prefermentador tenía alimentación periférica. El orificio de entrada del afluente tenía un diámetro interno de 10 mm y se situó por encima de la zona cónica del fermentador. Al orificio de entrada se conectó un tubo de silicona de 8 mm de diámetro interno; este tubo se acopló a una bomba peristáltica de la marca Masterflex (modelo 7021-20). El caudal de entrada del afluente fue 2,5 l/h durante todo el estudio. Los orificios de recirculación de fango y de salida del efluente tenían un diámetro interno de 8 mm. El primero estaba ubicado en la parte superior de la base maciza y el segundo en la parte inferior de esta misma base, en ángulo recto al orificio de recirculación; a ambos orificios se les acopló tubería de silicona de 5 mm de diámetro interno.

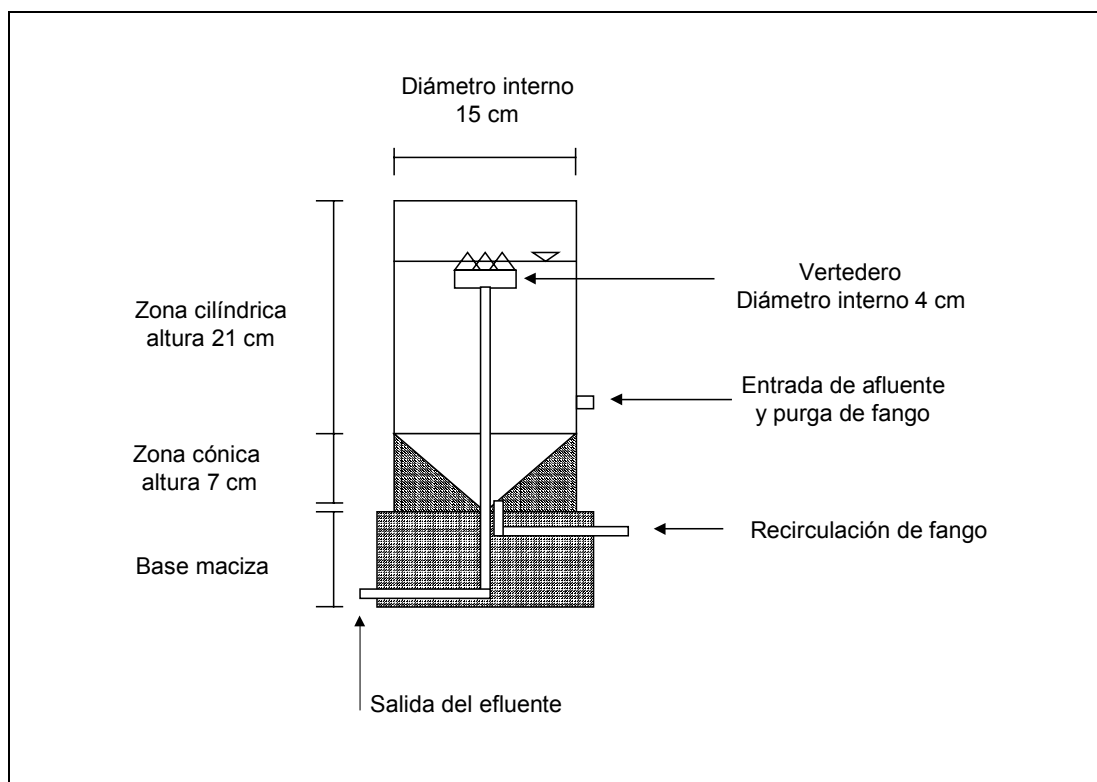


Figura 4.3. Corte en alzado del decantador primario original utilizado como prefermentador en el estudio de eliminación biológica de nutrientes en RBS.

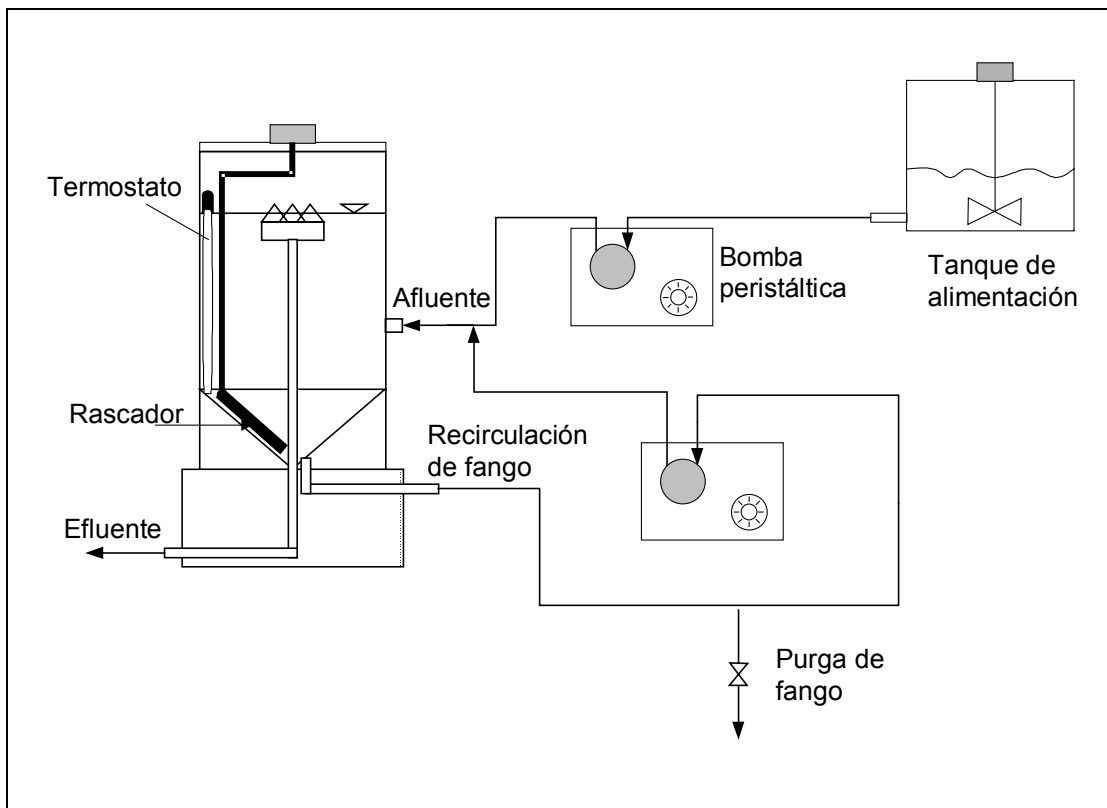


Figura 4.4. Esquema del montaje completo del prefermentador utilizado en el estudio de eliminación biológica de nutrientes en RBS.

- c) **Sistema de recirculación de fango.** El sistema de recirculación de fango consistía en bombear continuamente el fango depositado en la zona cónica hasta la entrada del afluente. La recirculación del fango se realizaba mediante una bomba peristáltica de la marca Masterflex (modelo 7021-20) con capacidad de giro entre 1 y 5 rpm. El porcentaje de recirculación del fango por hora era de 52 % y el caudal de recirculación de 1,3 l/h.
- d) **Control de la temperatura del sistema.** Como se explica en el apartado 3.7.3 del Capítulo 3, el rango de temperatura óptimo para la fermentación acidogénica se encuentra entre 21 y 24 °C. Para mantener esta temperatura, sobre todo al nivel de la capa de lodo depositada en la zona cónica del prefermentador, se optó por instalar una resistencia termostatazada marca Skies, de 50 W, así como un termómetro de mercurio fijado en ángulo recto a la resistencia. El punto de consigna de la resistencia se estableció en 30 °C debido al efecto de estratificación de la temperatura que se producía en el prefermentador. Esta estratificación de temperatura se generaba sobre todo por la ausencia de mezcla en el sistema. Se observó que este valor del punto de consigna ayudaba a mantener el fondo del prefermentador dentro del intervalo de temperaturas requerido.

- e) **Tapas no herméticas.** Por último, al prefermentador se le añadieron un par de tapas no herméticas con la finalidad de minimizar la entrada de oxígeno al sistema y de mantener el calor en el mismo. Se prefirió no utilizar tapas herméticas para impedir la metanogénesis durante la fermentación. La Tabla 4.1 muestra un resumen de las características más importantes de diseño y explotación del prefermentador.

Tabla 4.1. Principales características y parámetros operacionales del prefermentador utilizado en el estudio de eliminación biológica de nutrientes en RBS.

Configuración del prefermentador	Característica
Proceso	Tanque activado primario
Material de construcción	PMMA
Volumen	3,3 l
Caudal afluente	2,5 l/h
Velocidad de giro del sistema de rascado	0,5 rpm
Régimen de flujo	Continuo
Porcentaje de recirculación por hora	52%
Caudal de recirculación	1,3 l/h
TRS	Pruebas con 5 d y 10 d.
TRH	1,3 h

- **Montaje del depósito receptor de ARU prefermentada**

El depósito receptor de ARU prefermentada (ARUpf) era de forma rectangular y tenía un volumen útil de 16 l. El ARUpf entraba por gravedad en este depósito y se mantenía mezclada mediante un par de ejes provistos de aspas rectangulares de metacrilato, acoplados a un motor eléctrico marca Crouzet, modelo 82.344.0, con velocidad de giro de 10 rpm. La Figura 4.5 muestra un esquema general de este depósito y la Tabla 4.2. presenta sus características.

La entrada de ARUpf se encontraba a un costado del depósito y a 4,6 cm por debajo de la parte superior del mismo. El ARU entraba por gravedad desde el fermentador a través de un tubo de silicona de 8 mm unido al tubo de salida del prefermentador. El caudal de entrada era de 2,5 l/h de los cuales se perdían 0,5 l/h, el vertedero se encontraba ubicado a la misma altura que la entrada pero en una de las paredes laterales del depósito.

Tabla 4.2. Características del depósito receptor de ARUpf en el estudio de eliminación biológica de nutrientes en RBS.

Características	Valor
Largo	45 cm
Ancho	21,6 cm
Altura total	25,7 cm
Altura efectiva	21,2 cm
Volumen efectivo	16 litros

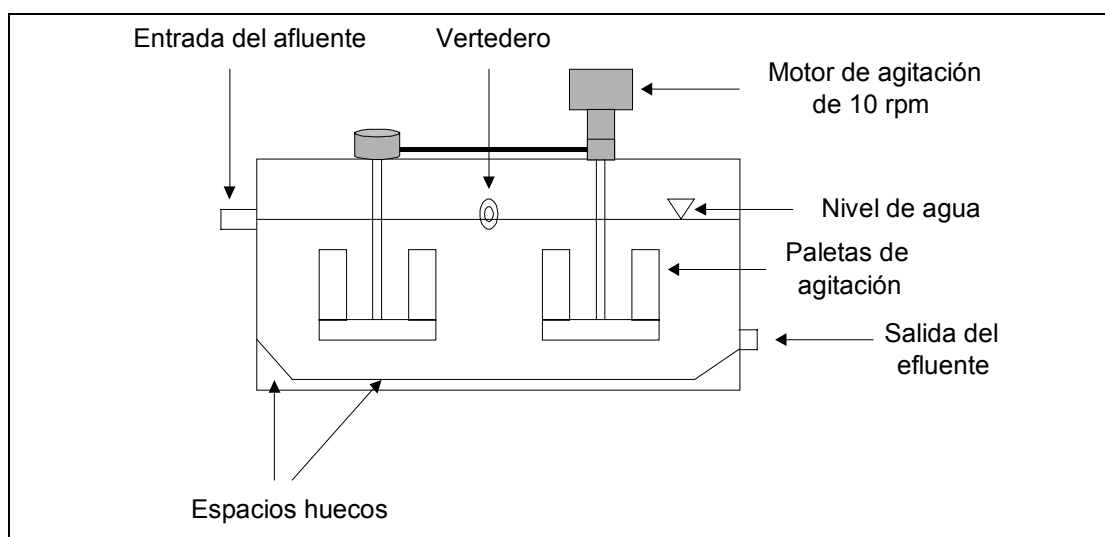


Figura 4.5. Vista en alzado del depósito receptor de ARUpf utilizado en el estudio de eliminación biológica de nutrientes en RBS.

La salida del agua fermentada se realizaba por un orificio ubicado en un costado del depósito, a 4,8 cm de la base. A este orificio se acopló un tubo de silicona Masterflex modelo 96400-25 seguido por otro tubo del mismo material, pero de 5 mm de diámetro, para acoplarse a la misma bomba peristáltica que bombeaba el afluente en la primera fase experimental. Esta bomba se encargaba de impulsar un caudal de 4 l/h de agua residual desde el depósito receptor de ARUpf hasta el reactor. Finalmente, en este depósito se instalaron un par de tapas no herméticas para minimizar la entrada de aire al sistema.

En resumen, las instalaciones de almacenaje previas al reactor se mantienen sin modificaciones durante la segunda fase experimental. Sin embargo, el ARU procedente del depósito de alimentación agitado era bombeado con un caudal de 2,5 l/h, hacia un prefermentador. Finalmente, el efluente del prefermentador llegaba por

gravedad hasta el depósito receptor de ARUpf y, desde este depósito, se bombeaba hasta el RBS con un caudal de 4 l/h. La Figura 4.6 muestra una vista general de todo el circuito descrito.

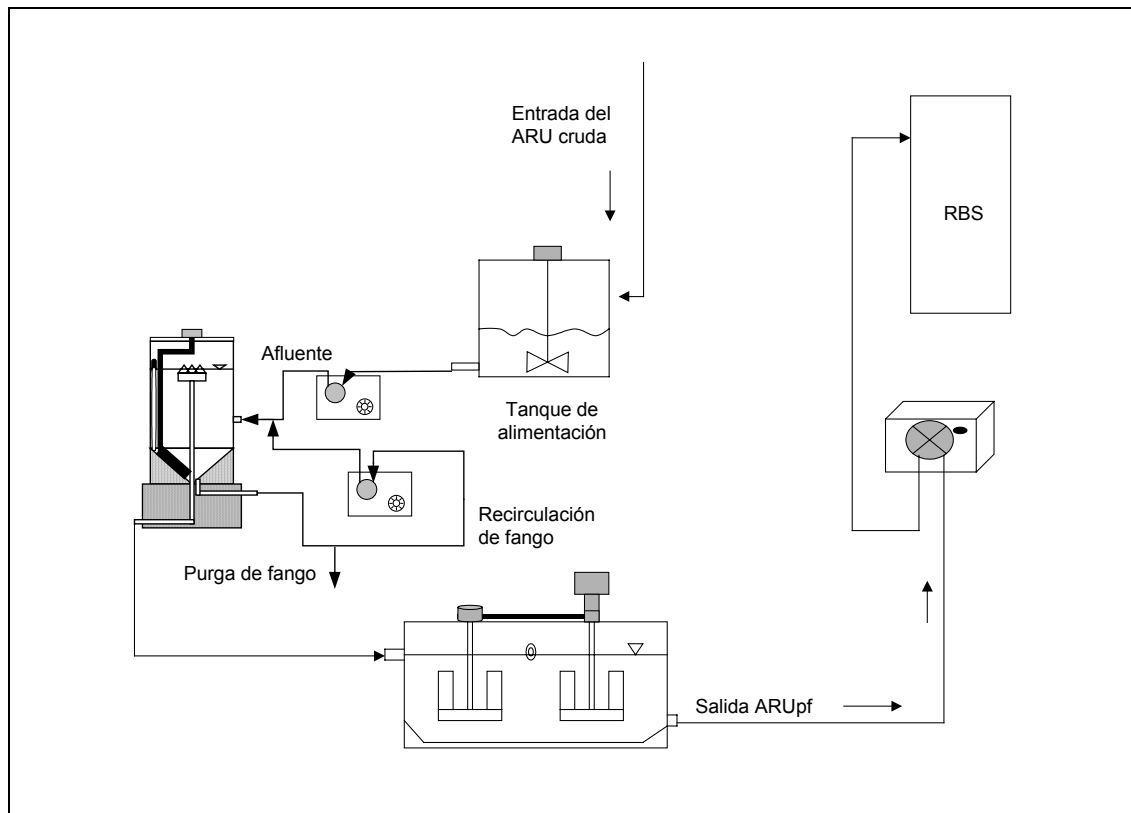


Figura 4.6. Esquema completo del proceso utilizado en la segunda fase experimental del estudio de eliminación biológica de nutrientes en RBS.

4.2.3. Prototipo experimental del Reactor Biológico Secuencial

El Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental dispone de un prototipo de Reactor Biológico Secuencial de forma cilíndrica de 24 litros de capacidad. Este reactor está construido de metacrilato, con unas paredes y una base de 3,5 y 10 mm de grosor, respectivamente. Las soldaduras se hicieron con cloruro de cianocrilato. La Figura 4.7 muestra un esquema del corte en alzado del RBS utilizado.

Para introducir y extraer el agua, el reactor cuenta con una serie de orificios situados a diferentes alturas:

1. Entrada del afluente a 4 cm por debajo de la parte superior del tanque.
2. Vertedero situado a 4,5 cm por debajo de la parte superior del tanque y diametralmente opuesto al orificio de entrada. Por este orificio se evacua el agua, en caso de que el sensor de nivel no funcione de forma correcta.
3. Salida del efluente situada a 41,5 cm del fondo del reactor, lo que permite mantener 12 l de líquido en el reactor.

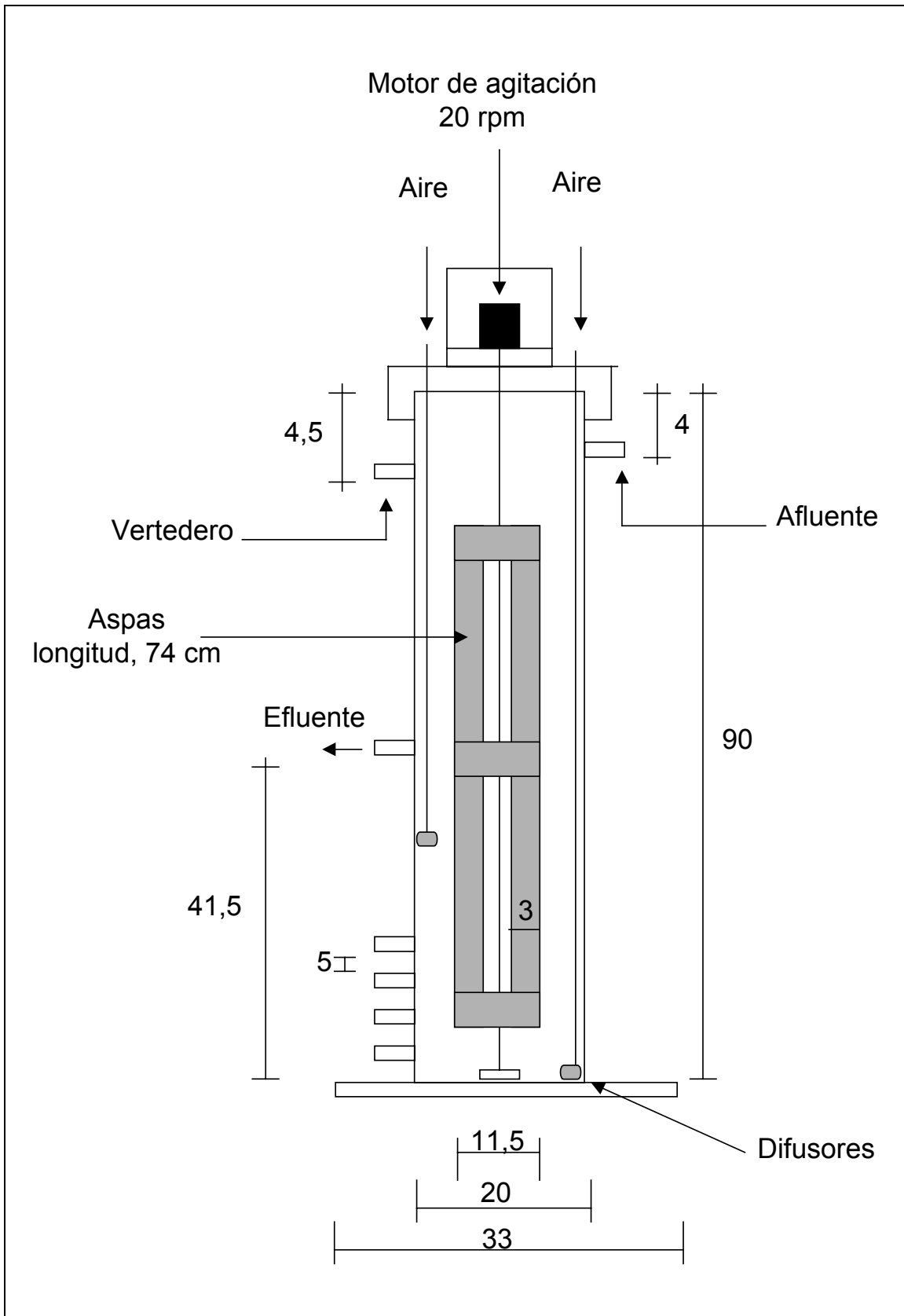


Figura 4.7. Corte en alzado del RBS utilizado (Escaler, 1997).

4. Cuatro orificios de salida situados cada 5 cm desde el fondo del reactor. Estos orificios se empleaban para diferentes objetivos. Los dos primeros orificios, de arriba para abajo, eran por donde regularmente se tomaban las muestras. El tercer orificio estaba destinado a la purga de fango y el último se mantuvo cerrado con una llave Hofmman.

La entrada del afluente se realizaba a través de un tubo de látex, de 10 mm de grosor, unido al orificio de entrada, el cual estaba empalmado a un tubo de silicona Masterflex, de diámetro más pequeño (5 mm), que iba acoplado a una bomba peristáltica. Esta bomba se encargaba de bombear un caudal de 4 l/h de ARU desde el depósito de alimentación hasta el reactor.

Tanto el orificio de salida del efluente como el de purga de fango se acoplaron también a unos tubos látex de 10 mm de diámetro, interrumpidos por electroválvulas marca Arika modelo 063. Las electroválvulas se accionaban a través de temporizadores programados.

La agitación del LM se realizaba mediante dos aspas rectangulares de metacrilato de 30 x 740 mm², soldadas a un eje acoplado a un motor eléctrico marca Crouzet modelo 82.344.0 que giraba a 20 rpm. En la parte inferior había unas prolongaciones de goma que al girar limpiaban el fondo del tanque y evitaban la acumulación de fango en esta zona.

La aireación del LM se realizaba mediante dos bombas Sirocco modelo D-2, cada una de ellas conectada a un tubo de poliuretano de 5 mm de diámetro que llegaba hasta el interior del reactor. Los dos tubos se adosaban a la pared gracias a su incorporación dentro de otro tubo de metacrilato de diámetro mayor (10 mm). Los dos tubos de poliuretano tenían conectados, en su parte final, un par de difusores tipo pecera por donde salían pequeñas burbujas que ascendían y se distribuían por el LM hasta la superficie del reactor. La Tabla 4.3. muestra un resumen de los equipos de proceso utilizados.

Tabla 4.3. Características técnicas de los diferentes mecanismos del prototipo RBS.

Aparato	Marca	Modelo	Características
Motor de agitación	Crouzet	82.344.0	20 rpm, 220V, 50 Hz, 3 W
Bombas de aire	Sirocco	D-2	220V, 50 Hz, 3 W
Controlador de bomba peristáltica y bomba peristáltica.	Masterflex	7554-60 7021-20	10-120 rpm, 220V, 50 Hz
Electroválvulas	Arika	063	Presión de trabajo: 0-0,7 bar Pas ½", 220V, 50 Hz, 20W

Una pareja de difusores estaba situada en el fondo del tanque y la otra a unos 30 cm de altura, con objeto de facilitar la distribución y dilución del oxígeno en el LM. Las

burbujas de aire que salían de los difusores seguían un movimiento helicoidal ascendente, debido a la combinación del movimiento de rotación provocado por la agitación y el movimiento ascendente de las mismas burbujas. Para impedir que estas burbujas llegaran hasta el sensor de oxígeno y provocaran interferencias, éste se colocó adosado a la pared del reactor y a unos 20 cm de su fondo (ver Figura 4.7).

Un temporizador programado ponía en marcha el controlador de oxígeno durante las fases de aireación. El controlador estaba conectado a un oxímetro y a las dos bombas de aire descritas anteriormente. El punto de consigna del controlador se fijó en 2 mg O₂/l. En estas condiciones, cuando el PID detectaba, durante la fase de aireación, que el nivel de OD en el LM era inferior al punto de consigna, se ponían en marcha las bombas de aireación. Del mismo modo, cuando el controlador detectaba un nivel de OD por encima del punto de consigna, las bombas dejaban de airear. De esta manera el nivel de OD en el LM del sistema se mantenía relativamente constante en torno a 2 mg O₂/l.

Sistemas de control y sensores

Con el fin de asegurar el funcionamiento automático del prototipo durante las 24 horas del día, se dispuso de un panel de control provisto de temporizadores programables que controlan el funcionamiento de los diferentes dispositivos del reactor:

1. Bomba peristáltica de alimentación.
2. Bomba de aire.
3. Motor de agitación.
4. Electroválvula de purga.
5. Electroválvula de vaciado.

Cada temporizador disponía de un reloj digital con el cual se programaban los momentos (hora y minuto) en que se tendría que conectar o desconectar la toma de corriente correspondiente a ese temporizador. De esta manera, enchufando a cada toma de corriente el aparato que le correspondía se mantuvo automatizado su funcionamiento. El tipo de relojes usado tiene un ámbito de programación diario, por lo que los ciclos tuvieron una duración submúltiple de 24 h. El tiempo mínimo de programación del funcionamiento de estos aparatos es de 1 minuto. Además del panel de control, el reactor disponía de diversos equipos de instrumentación que facilitaban el funcionamiento del sistema. Algunos de estos equipos se han descrito ya en el apartado anterior. La Tabla 4.4 presenta las características más sobresalientes de la instrumentación utilizada en el control del proceso.

En primer lugar, un sensor de nivel Nivelgar modelo C1N-MH permitía detectar el momento en el que se sobrepasaba el nivel máximo de líquido en el interior del tanque. El sensor constaba de dos sondas una situada en su extremo superior y otra en el inferior. Cuando el agua llegaba a la sonda situada en el nivel máximo, con la otra sonda ya sumergida, se establecía una corriente eléctrica entre ellas que hacía que se desconectara la bomba peristáltica que bombeaba el agua residual afluente.

También se instaló un sensor de oxígeno disuelto YSI modelo 57 equipado con un electrodo Clark, que tenía una precisión de ± 3 % (porcentaje de desviación). Este electrodo estaba permanentemente sumergido en el agua, excepto cuando se realizaba su mantenimiento de limpieza o cuando se utilizaba para realizar registros de oxígeno en ensayos que serán posteriormente explicados. El electrodo se

sujetaba al reactor por un soporte construido con metacrilato y de esta manera se podía obtener una lectura continua del OD en el LM. Con este mismo aparato se media la temperatura del LM con una reproducibilidad de $\pm 0,3$ °C (desviación media).

El sensor de OD se conectaba a un controlador Desin, modelo PM 1830, formato 1/16 DIN (48 x 48 mm), con consigna principal de acción directa y salida discontinua por relé conmutado con función PID autoajustable.

Tabla 4.4. Características de la instrumentación usada en el control del estudio de eliminación biológica de nutrientes en un RBS.

Aparato	Marca	Modelo	Características
Sensor de nivel	Nivelgar	C1N-MH	220V, 50Hz, 2W
Sensor de OD	YSI	57	Electrodo de Clark (precisión $\pm 3\%$ de lectura de OD para un rango de 5-45 °C)
Controlador de OD	Desin	PM1830	Regulador en formato 1/16 DIN (48 x 48 mm). Consigna principal de acción directa y salida discontinua por relé conmutado con función PID autoajustable.
Placa de adquisición de datos	Lipsoft Electronics		Módulo AD12

Este controlador se encargaba de mantener el nivel de OD en torno a 2 mg O₂/l. Por último, con el fin de registrar el rango de variación del OD durante las etapas aireadas, se conectó al PID una placa de adquisición de datos. Esta placa estaba compuesta de un módulo y una interfase AD12 de Lipsoft Electronics, con conversión analógico-digital de 12 bits, conectado al puerto paralelo de un ordenador personal. El ordenador personal, compatible IBM, modelo 486 DX a 66 MHz, estaba dotado de un programa escrito en QBASIC, para la adquisición y registro de datos en formato ASCII

La Figura 4.8 contiene un diagrama del proceso, en el que se muestran todas las partes técnicas descritas anteriormente y usadas para controlar su funcionamiento. Las letras en rojo de este diagrama representan los componentes:

- A. Bombas de aire
- B. Sensor de nivel de agua
- C. Sensor de oxígeno
- D. Electroválvula de vaciado
- E. Electroválvula de purga
- F. Panel de control
- G. Controlador de nivel de agua

- H. Bomba peristáltica
- I. Oxímetro
- J. Controlador de oxígeno PID
- K. Placa de adquisición de datos
- L. PC-modelo 386

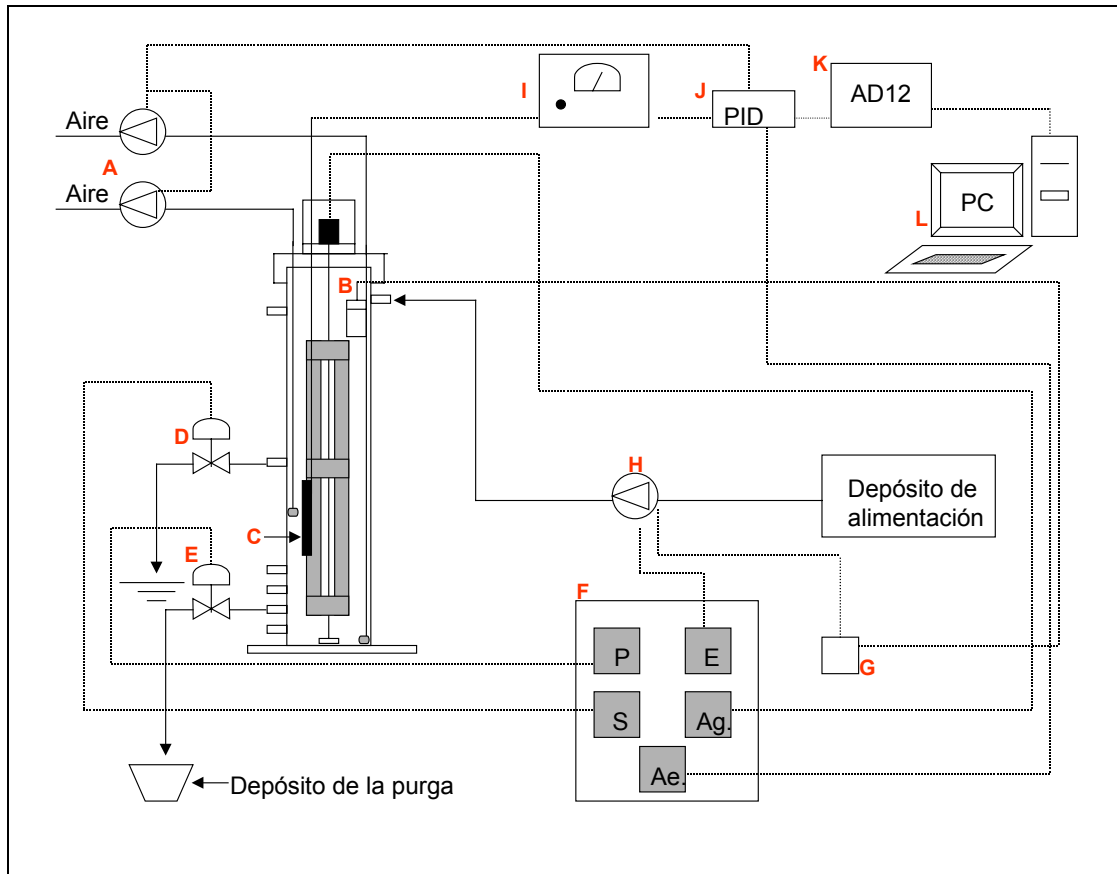


Figura 4.8. Diagrama completo del control de proceso del RBS utilizado para el estudio de la eliminación biológica de nutrientes.

Mantenimiento de las instalaciones utilizadas

Para garantizar el buen funcionamiento de las instalaciones utilizadas durante cada fase experimental, se realizó un seguimiento rutinario de cada componente del proceso estudiado. En términos generales, este seguimiento incluyó la limpieza de los componentes que estaban en contacto directo con el LM, el calibrado de los aparatos, el arreglo o remplazo de los componentes averiados y la revisión rutinaria de los equipos de proceso. A continuación se enumeran detalladamente todas las tareas de mantenimiento y su frecuencia de realización:

Tareas diarias.

- Purga y limpieza del depósito de reserva y llenado con ARU procedente de la alcantarilla.
- Limpieza de las sondas del sensor de nivel.

- Cambio de la membrana de teflón del electrodo de OD modelo YSI-57, y limpieza de su electrodo y soporte.
- Calibración del sensor de OD.
- Revisión de la electroválvula y temporizador del depósito de alimentación.
- Revisión de los diferentes equipos de proceso (bombas peristálticas, electroválvulas, motores de agitación, conexiones eléctricas, temporizadores).
- Revisión de las velocidades de llenado y vaciado.
- Revisión de los tubos que transportaban el ARU.

Tareas semanales

- Limpieza de las electroválvulas utilizadas en el proceso.
- Limpieza de las paredes del reactor.
- Limpieza de las paredes del depósito de alimentación.
- Reemplazo de los tubos de silicona unidos a las bombas peristálticas.
- Revisión de los difusores de aire.

Tareas mensuales

- Reemplazo de los difusores de aire por unos en buen estado.
- Revisión y desarenado del pozo de captación de ARU.

4.3. VARIABLES MEDIDAS Y MÉTODOS DE ANÁLISIS.

La mayor parte de los métodos de análisis empleados en esta investigación están incluidos en el Standard Methods (1995). Se indican expresamente aquellos parámetros que fueron tomados de otras fuentes bibliográficas. A excepción de las determinaciones de MES y MESV, todos los demás análisis que requerían filtración previa de la muestra se realizan mediante filtros de membrana de 0,45 μm de diámetro de poro.

4.3.1. Medidas Físicas

Temperatura

La temperatura dentro del LM del RBS era medida mediante el mismo sensor de oxígeno disuelto YSI modelo 57 equipado con un electrodo Clark, el cual fue descrito en el apartado anterior. Por otro lado, para registros puntuales fuera del RBS se empleaba un termopar tipo K, portátil (DT10K).

Materia en suspensión

La MES de las muestras, se determinó haciendo pasar un volumen conocido de muestra, suficientemente homogeneizado y representativo, por un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C de 47 mm de diámetro. El filtro era previamente lavado, secado y pesado. Una vez filtrada la muestra, el filtro se introducía en una estufa a 105 °C y al cabo 24 h el filtro se sacaba de ella y se colocaba dentro de un desecador hasta que se enfriaba para pesarlo nuevamente. En Metcalf y Eddy (1991) se recomienda tener en cuenta que el diámetro mínimo de los sólidos en suspensión es de 1 μm ; los poros de los filtros Whatman tienen un diámetro de 0,7 μm .

Materia en suspensión volátil

La MESV de una muestra representa un valor aproximado del contenido de materia orgánica en los sólidos totales de un volumen de agua residual. Es una medida utilizada para estimar la cantidad de microorganismos presentes en el LM de un tratamiento de fangos activados. Este parámetro se determina introduciendo el filtro utilizado para determinar la MES en una mufla a 550 °C, durante media hora. En estas condiciones los sólidos orgánicos se volatilizan quedando únicamente en el filtro los sólidos fijos; la diferencia entre los sólidos totales y los fijos representa la MESV.

Índice volumétrico de fangos

El IVF es un parámetro utilizado para valorar la decantabilidad de los fangos. Representa el volumen en mililitros que ocupa 1 g de sólidos en suspensión del LM, después de 30 minutos de decantación. Valores de IVF entre 80 y 120 ml/g indican que los fangos están formados por flóculos que contienen una proporción equilibrada de organismos filamentosos y no filamentosos, con lo cual el fango decanta bien. Valores superiores a 150 ml/g indican generalmente un exceso de organismos filamentosos, que producen una mala decantación de los fangos. Este fenómeno se denomina *bulking* (Jenkins y Daigger, 1993).

Para la determinación del IVF se necesita determinar previamente la concentración de MESV en el LM. Asimismo, se debe determinar el volumen que ocupa el fango después de 30 minutos de decantación en el ensayo denominado V_{30} . El procedimiento consiste en colocar 1 l de LM en una probeta graduada y dejar la muestra en reposo durante 30 minutos en su interior. Al finalizar este período de tiempo, se registra el volumen ocupado por los fangos que han decantado, el resultado se da en ml/l. Finalmente el valor del IVF se obtiene introduciendo los resultados así obtenidos en la siguiente ecuación.

$$\text{IVF}(\text{ml/g}) = \frac{V_{30} (\text{ml/l})}{\text{MESV} (\text{g/l})} \quad (4-1)$$

4.3.2. Medidas Químicas

Componentes inorgánicos

- pH

El pH es la forma más utilizada para expresar la concentración del ion hidrógeno en el agua. Se define como el logaritmo cambiado de signo de la concentración del ion hidrógeno:

$$\text{pH} = -\log [H^+] \quad (4-2)$$

Las aguas residuales urbanas presentan normalmente valores próximos a la neutralidad (pH=7,0) y, por tanto, cualquier cambio significativo puede indicar la presencia de vertidos de tipo no doméstico. Es un parámetro de calidad importante para los tratamientos biológicos, ya que el intervalo idóneo para el desarrollo de gran parte de los organismos acuáticos es estrecho y crítico (Escaler, 1997). En esta

investigación el pH se midió con un medidor de pH portátil 506 de la marca Crison equipado con un electrodo LB combinado estándar con resolución 0,01 y precisión de $\pm 2\%$ (porcentaje de desviación). Este aparato se calibraba diariamente según el procedimiento del manual de instrucciones. La compensación de temperatura durante la calibración y las medidas se efectuaba manualmente.

- **Alcalinidad**

La alcalinidad (Alc) es un parámetro esencial de la calidad de un agua y está relacionada con los procesos de nitrificación y desnitrificación (Escaler, 1997). Es una medida de la capacidad que tiene un agua para mantener estable su pH cuando se le añade un ácido fuerte. La alcalinidad se determinaba añadiendo ácido sulfúrico 0,02 N a un volumen conocido de muestra, al cual se le había añadido previamente una gota del indicador anaranjado de metilo. El punto final de la valoración se registra para un valor de pH 4,4, momento en el cual el indicador pasa de un color naranja a rosado.

- **Potencial oxido-reducción**

Este parámetro es un indicador del carácter oxidante o reductor del medio. Está directamente relacionado con las concentraciones de oxígeno disuelto y de nitratos. El ORP se emplea comúnmente en el control y optimización de las plantas de eliminación de nutrientes. El ORP se utilizó en esta investigación para detectar el paso entre los diferentes grados de oxidación del sistema de fermentación acidogénico estudiado (anóxico, anaerobio, acidogénico y metanogénico).

- **Oxígeno disuelto**

La concentración de OD en el LM es un parámetro muy importante en los procesos de eliminación de nutrientes. Como se comentó anteriormente, para la medida del OD en el RBS y en los ensayos que requerían un registro continuo de OD, se utilizó un oxímetro YSI modelo 57 equipado con un electrodo Clark (detector polarográfico con membrana de teflón). Este aparato es capaz de compensar automáticamente los cambios de solubilidad del OD y de la permeabilidad de la membrana del electrodo debidos a las variaciones de temperatura. Las compensaciones de las medidas de OD se efectuaron con una precisión del $\pm 1\%$ (porcentaje de desviación) cuando la temperatura del ARU estuvo entre 5 y 45 ° C y del $\pm 2\%$ cuando osciló entre 0 y 5 ° C. Las medidas puntuales del OD se realizaron con un oxímetro portátil OXI 330 (detector galvánico) de la marca Crison.

- **Nitrógeno amoniacal**

El nitrógeno amoniacal es un parámetro esencial en los estudios de eliminación de nutrientes, ya que es una de las formas en que normalmente se encuentra el nitrógeno en el agua. Las aguas residuales pueden contener grandes cantidades debido a la descomposición de la materia orgánica de carácter proteico y de la urea.

Para analizar el contenido de amoníaco en las muestras se utilizó el método colorimétrico denominado "Método de Solorzano". Este método se basa en la formación de un compuesto coloreado, el indofenol, a partir de la oxidación del amoníaco. El indofenol tiene un color azul intenso y su intensidad es proporcional a la cantidad de amoníaco presente en la muestra, medida a una longitud de onda de 640 nm. El intervalo de validez del método oscila entre 0,1 y 1,0 mg N-NH₄⁺/l. La principal causa de errores en la determinación del amoníaco proviene de las diluciones y de las características intrínsecas de la muestra.

- **Nitrito**

El nitrito representa un estado de oxidación intermedio del N inorgánico en su oxidación de amoníaco a nitrato. Su determinación se realiza siguiendo fundamentalmente la metodología de Shinn (Ros *et al.*, 1979). En un medio fuertemente ácido, el nitrito reacciona con la sulfanilamida para formar un compuesto diazónico. El compuesto diazónico se acopla después con la N-naftil-etilendiamina diclorhidrato para dar un compuesto de color rosa. La intensidad de este compuesto es proporcional a la concentración de nitrito en la muestra. La lectura de la absorbancia se realiza a 543 nm después de 15 min de haber añadido el reactivo. Es un método capaz de detectar muy pequeñas concentraciones de nitrito, con una precisión y reproducibilidad excelentes (< 0.005 desviación media). Similarmente al amoníaco, la principal fuente de errores proviene de las diluciones y de las características intrínsecas de la muestra.

- **Nitrato**

El nitrato es el compuesto inorgánico del ciclo del nitrógeno donde éste alcanza su mayor grado de oxidación. Representa el producto final de la nitrificación. En las aguas residuales municipales se suele encontrar en baja concentración a causa del carácter anaeróbico de esta agua. El nitrato no se puede determinar mediante colorimetría directa, de manera que el método más generalizado consiste en reducirlo a nitrito para después cuantificarlo mediante la metodología de Shinn. La reducción se realiza pasando la muestra por una columna de gránulos de cadmio que previamente han sido tratados con sulfato de cobre. Una vez reducidos los nitratos se agrega el reactivo utilizado en el ensayo de los nitritos. Obviamente, los nitritos presentes en la muestra reaccionarán con el reactivo, produciendo una interferencia positiva. Para conocer el contenido de nitratos sólo hay que restar la concentración de nitritos previamente obtenida a la concentración resultante de la muestra que ha pasado por la columna.

Fósforo reactivo soluble

Cuando se analiza el fósforo inorgánico disuelto –ortofosfato- de una muestra, es inevitable que una pequeña fracción de los fosfatos condensados sean hidrolizados y reaccionen a causa de la acidez que requiere el ensayo. La suma del ortofosfato realmente presente y de esta fracción hidrolizada es lo que se denomina fósforo reactivo soluble (PRS). No obstante, el PRS se puede considerar como una medida de los ortofosfatos (APHA, 1989). Para determinar el PRS se utilizó un método colorimétrico que utiliza el ácido vanadomolibdofosfórico. Este método se basa en la reacción en medio ácido del molibdato amónico con los ortofosfatos disueltos en la muestra para formar ácido molibdofosfórico. La presencia de vanadio hace que se forme ácido vanadomolibdofosfórico. Este compuesto obedece la ley de Beer-Lambert y, por tanto, la intensidad de su color amarillo es proporcional a la concentración de ortofosfatos. La lectura de la absorbancia se efectúa a una longitud de 400 nm después de 10 minutos de haber añadido el reactivo.

- **Fósforo Total**

El fósforo total (PT) se determinó mediante la transformación previa de todos los compuestos de fósforo de las muestras en ortofosfato y su posterior cuantificación colorimétrica por el método del ácido vanadomolibdofosfórico. La digestión se realizó en medio ácido, con persulfato de amonio como agente oxidante y mediante una olla a presión a fuego lento durante 45 minutos.

Componentes orgánicos

- **Nitrógeno orgánico por el método Kjeldahl**

La aplicación principal de este método, es determinar el N en su estado de oxidación de -3 . El método consta de dos pasos, una digestión y una destilación. La digestión se realiza en medio ácido y en presencia de sulfato potásico y sulfato de mercurio para convertir el N-org en N amoniacal. Este nitrógeno amoniacal y el inicialmente presente en la muestra son inmovilizados en forma de sulfato de amonio. Posteriormente, la solución digerida es alcalinizada mediante una solución de sosa y mediante una destilación se separa el N amoniacal en forma de amoniaco gas, cuyos vapores son recogidos en una solución de ácido bórico que se valora posteriormente con H_2SO_4 , 0,02 N. El resultado obtenido es denominado N Kjeldahl, el cual incluye el N amoniacal más el N orgánico. La concentración de N-org se obtiene por diferencia entre la concentración de N Kjeldahl y la de N amoniacal determinado colorimétricamente o por destilación directa.

- **Demanda Química de Oxígeno**

La DQO se determinó en este estudio mediante la cantidad de dicromato de potasio reducido por la muestra durante dos horas de digestión en medio ácido, con reflujo y en presencia de sulfato de plata como catalizador. Este procedimiento permite alcanzar una oxidación casi completa de la MO. El dicromato potásico residual se valora con sulfato de ferroxiamonio, utilizando ferroína como indicador. La Tabla 4.5 muestra un análisis comparativo de los resultados experimentales y los valores teóricos, del que se deduce que se trata de un ensayo con buena precisión y reproducibilidad (García, 1996).

Tabla 4.5. Comparación entre los valores experimentales y los teóricos de la DQO en dos muestras estándar con 300 mg/l de glucosa y 425 mg/l de ftalato monopotásico (García 1996).

Muestra	n	DQO mgO ₂ /l		Precisión % de desviación	Reproducibilidad, desviación media
		Teórico	Experimental		
Glucosa	9	320	313	-2	8,7
Ftalato	2	500	497	-1	15,5

- **DQO soluble**

La materia orgánica disuelta se determinó con la misma metodología utilizada para la determinación de la DQO total, pero usando muestras filtradas a través de un filtro de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μ m.

- **Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles**

La mayoría de las formas de carbono fácilmente biodegradable en un ARU son AGV, de los cuales el ácido acético es el que se encuentra en mayor proporción. Los ácidos grasos volátiles han sido considerados como el principal substrato de los OAF (Fuhs y Chen, 1975; Wentzel *et al.*, 1991). Asimismo, la cantidad de AGV presentes en los

estados anaeróbicos es un parámetro crítico del proceso de EBIF (Abu-ghararah y Randall, 1991).

La determinación de la concentración de AGV en las muestras estudiadas fue realizada por un equipo externo de investigación en el Departamento de Química Ambiental del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Los AGV determinados fueron: acético, propiónico, butírico, isovalérico y valérico. La metodología de esta determinación utiliza la microextracción en fase sólida (SPME) y la cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. Su descripción se encuentra en Abalos *et al.* (2000).

Las muestras analizadas por SPME recibieron un tratamiento previo en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental, consistente en filtrar la muestra con filtros de membrana con un diámetro de poro de 0,45 μm y recogerla en tubos FALCON de 50 ml; el tubo así preparado se pesaba y posteriormente se le añadía 1 ml de una disolución estándar de 1 g de ácido ciclopentanóico (*surrogate*). Se procuraba que no quedara espacio de cabeza en los tubos para minimizar las pérdidas de AGV por volatilización. La muestra con el *surrogate* se volvía a pesar y se guardaba a -20°C , en la obscuridad, hasta su análisis por SPME (Abalos *et al.*, 2000).

- **Potencial de ácidos grasos volátiles**

La cantidad real de ácidos grasos volátiles disponibles para los OAF en la zona anaeróbica de un proceso de EBIF ha sido denominada **potencial de AGV** (Lie y Welander, 1997) y es uno de los parámetros más importantes a la hora de evaluar la capacidad de eliminación de fósforo de una determinada ARU.

Lie y Welander (1997) propusieron un método para estimar el potencial de AGV en el ARU de dos plantas continuas con EBIF de Suecia. La cantidad máxima de AGV producidos por hidrólisis y fermentación espontánea del ARU, en botellas de suero, guarda relación con la cantidad real esperada de AGV que estará disponible para los OAF en la zona anaeróbica del proceso de EBIF, este método experimental se describió en el apartado 3.4.5 del Capítulo 3.



Fotografía 4.1. Preparación del ensayo para determinar el potencial de AGV.

En la presente investigación, el método original de Lie y Welander, fue modificado con el fin de evitar la necesidad de usar nitrógeno gas (Barajas *et al.*, 2000a). La metodología desarrollada es la siguiente:

Muestreo de ARU y análisis previos. Las muestras compuestas de ARU fueron tomadas y analizadas para determinar MES, MESV, DQO, DQOs, AGV, OD, pH, Alc, PRS, N-NH₄ y DQO fraccionada.

Determinación del potencial AGV. Para cada muestra compuesta se utilizaron varios frascos de DBO de 300 ml. Los frascos fueron llenados hasta el rebose con ARU, evitando hacer burbujas. Cada frasco fue tapado cuidadosamente con tapones esmerilados y rotulado con el número de horas que permanecería en reposo e incubado a 20 °C. La Fotografía 4.1 muestra los frascos preparados y listos para iniciar el ensayo del potencial de AGV.

Al finalizar la incubación de cada muestra, el frasco era sacado de la estufa y analizado para determinar nuevamente las concentraciones de MES, MESV, DQO, DQOs, AGV, OD, pH, Alc, PRS, N-NH₄ y DQO fraccionada. Al finalizar el análisis de todas las muestras se obtenía, entre otras cosas, la cinética de formación de los AGV y el potencial de AGV correspondiente a la máxima cantidad de AGV producida. Otros aspectos de consideración son los siguientes:

1. El máximo tiempo de incubación considerado fue de 168 h.
2. Cada muestra que se sacaba de la estufa era procesada de la siguiente manera:
 - a) Homogeneización de la muestra mediante un agitador magnético
 - b) Separación de la muestra en dos volúmenes para analizar muestras totales y filtradas (filtros de membrana de 0,45 µm).
 - c) Para la determinación de AGV se tomaba una muestra de 50 ml, se procesaba como se indica en el apartado anterior y se congelaba hasta su análisis.

La técnica desarrollada en esta investigación difiere del método de Lie y Welander (1997) en que, el análisis de una muestra se realiza mediante la utilización de varios frascos, en vez de uno, con lo cual se evita la contaminación de la muestra y el uso de nitrógeno gas.

Fraccionamiento de la DQO

Para realizar el fraccionamiento completo de la DQO, se pusieron a punto los métodos físicos propuestos por Park *et al.* (1997) y Mamais *et al.* (1993). Asimismo, se aplicaron las sugerencias de Ekama *et al.* (1986) respecto a la preparación de la muestra de ARU. Los fundamentos de estos métodos están descritos con detalle en el apartado 3.4, del Capítulo 3.

Formación de inóculo para los ensayos de fraccionamiento

Tanto los métodos físicos como los biológicos, requieren una mezcla de un volumen seleccionado del ARU (V_{ARU}), con concentración de DQO conocida, y un volumen de LM (V_{LM}) con concentración de MESV también conocida. El LM puede ser obtenido de varias fuentes, como por ejemplo una planta de tratamiento real; sin embargo, en este trabajo se decidió formar un cultivo de LM que fuese utilizado exclusivamente en los ensayos de fraccionamiento de la DQO. Con la formación de este inóculo, a partir de

la propia ARU que se deseaba caracterizar, se buscaba evitar las interferencias que causan los fangos no aclimatados.

Para estos fines, se construyó un reactor biológico discontinuo de forma cilíndrica, con 7 litros de volumen útil. En este reactor se instaló un sistema de agitación permanente constituido por un eje, con aspas rectangulares de metacrilato, acoplado a un motor eléctrico Crouzet modelo 82.344.0 que giraba a 10 rpm. El reactor estaba continuamente aireado por medio de una bomba Sirocco modelo D-2, a la cual iba conectado un difusor tipo pecera a través de un tubo de poliuretano de 5 mm de diámetro, que llegaba hasta el interior del reactor.

El reactor se llenaba y se vaciaba manualmente cada día. Para mantener un θ_c de 5 días se purgaba un volumen diario de 1,4 l, que se remplazaba con ARU proveniente del depósito de reserva. Las respirometrías realizadas en el LM de este sistema, al finalizar el primer mes de seguimiento, reflejaron una baja velocidad de consumo de oxígeno (< 8 mg/l.h) con concentraciones alrededor de 350 mg/l de MESV. Se pensó en la conveniencia de incrementar el crecimiento de los heterótrofos, pero sin aumentar θ_c , con lo cual la carga másica era la variable a modificar. Para lograr la modificación antes mencionada se procedió a purgar el reactor discontinuo de la siguiente manera:

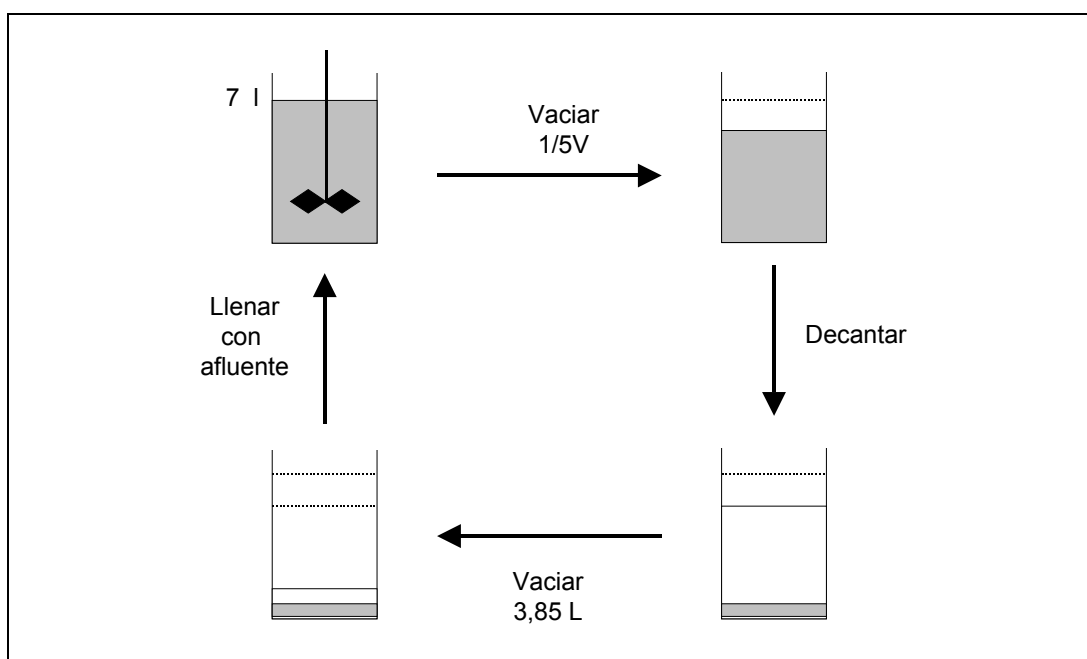


Figura 4.9. Esquema del procedimiento de purga del inóculo utilizado para el estudio del fraccionamiento de la DQO.

1. Se purgaban 1,4 l del LM del reactor discontinuo.
2. Se paraba la agitación y la aireación.
3. Se dejaban decantar los sólidos durante 20 minutos.
4. Se vaciaba un volumen de sobrenadante de 3,85 l.
5. Se procedía al llenado del reactor con el afluente hasta completar los 7 l.
6. Se conectaban de nuevo los sistemas de agitación y de aireación.

Mediante la adopción de este procedimiento, durante toda la parte experimental de la tesis se logró obtener velocidades de consumo de oxígeno en torno a los 15 mg/l.h y

concentraciones de MESV de alrededor de 650 mg/l. La Figura 4.9. muestra un esquema del procedimiento de purga descrito.

Determinación de la DQOBT

Como se indicó en el Capítulo 3, la DQOBT se puede determinar mediante el concepto desarrollado por Mullis y Shroeder (1971) y relacionado con la demanda de oxígeno total (T_bOD). Este concepto considera que los materiales orgánicos particulados se hidrolizan cuando el proceso de oxidación biológica se completa (generalmente después de 24 h). Por lo tanto, la T_bOD es conceptualmente igual a DQOBT e incluye la DQOFB y la DQOLB. De acuerdo con Park *et al.* (1997), la T_bOD puede ser determinada en ensayos discontinuos.

En esta tesis se utilizó el método descrito por Park *et al.* (1997) para determinar la DQOBT, a partir de la mezcla de un volumen de ARU con un volumen de fango aclimatado. La mezcla fue realizada de acuerdo con las sugerencias de Ekama *et al.* (1986) y utilizando el LM del cultivo obtenido en el subapartado anterior.

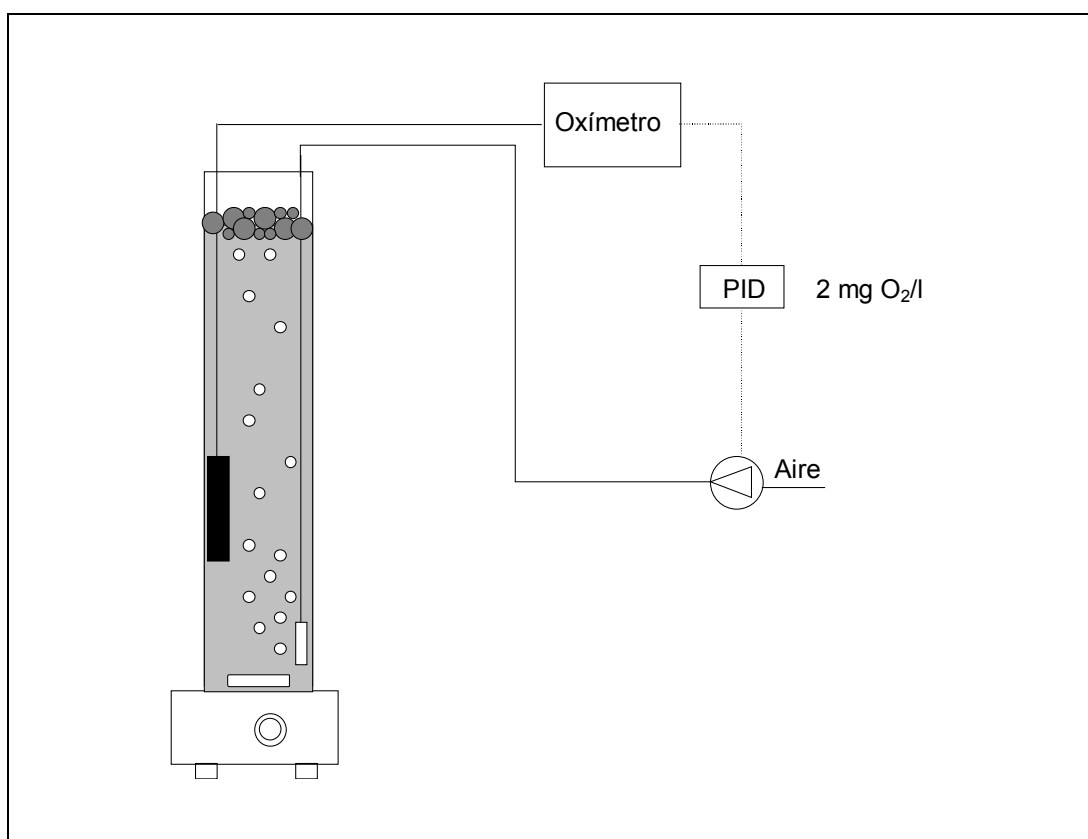


Figura 4.10. Esquema del dispositivo utilizado para la obtención de la DQOBT en el estudio del fraccionamiento de la DQO.

Los ensayos se realizaron en un reactor discontinuo con un volumen útil de 2 litros. El reactor era de forma alargada y cilíndrica con una longitud de 50 cm y un diámetro interno de 8,6 cm. La mezcla se mantenía en agitación constante por medio de un agitador magnético y la aireación se llevaba a cabo por medio de una bomba Sirocco modelo D-2, a la cual iba conectado un difusor tipo pecera a través de un tubo de poliuretano (adosado a la pared) de 5 mm de diámetro, que llegaba hasta el interior del reactor. La mezcla se aireaba constantemente durante 24 horas y el nivel de OD

se mantenía en 2 mg O₂/l mediante un controlador PID, al que se conectaba la bomba de aire y el oxímetro YSI 57. La Figura 4.10. muestra un esquema del dispositivo utilizado en la determinación de la DQOBT por el método Park *et al.* (1997).

La metodología adoptada para optimizar el ensayo fue la siguiente:

Cálculo de los volúmenes de ARU y LM utilizados para realizar la mezcla

Los volúmenes de ARU y LM se estimaron en función de la carga másica (F/M). De acuerdo con Ekama *et al.* (1986), se estableció una F/M de 1,2 veces la fracción activa (f_{av}) estimada de la MESV del ARU, es decir:

$$F/M = (1,2)(f_{av}) \text{ (mgDQO/mgMESV)} \quad (4-3)$$

La f_{av} se consideró como una función de θ_c del reactor discontinuo utilizado para formar el LM de la mezcla (5 días). Según el tipo de agua estudiada se utilizaron los siguientes valores (Ekama, *et al.*, 1986).

$$f_{av} = 1,41 (\theta_c) - 0,53 \quad \text{para ARU no sedimentada}$$

$$f_{av} = 1,57 (\theta_c) - 0,43 \quad \text{para un ARU sedimentada}$$

Una vez calculada la F/M, se calcularon los volúmenes buscados:

$$F/M = \left(\frac{V_{ARU} * DQO_{ARU}}{V_{LM} * X_V} \right) \quad (4-4)$$

donde

V_{ARU}	= Volumen de ARU
V_{LM}	= Volumen de LM
DQO_{ARU}	= DQO del ARU analizada
X_V	= MESV del LM usado como inóculo

Los volúmenes buscados se pueden determinar teniendo en cuenta la Ecuación 4.5:

$$V_{ARU} = (V_{RU} - V_{LM}) \quad (4-5)$$

donde:

$$V_{RU} = \text{Volumen de reactor útil}$$

Disminución de la transferencia de oxígeno entre el sistema y la atmósfera

Durante las fases no aireadas del ensayo, los microorganismos de la mezcla deben consumir exclusivamente el OD del sistema, por lo que debe evitarse la posible interferencia del oxígeno atmosférico en un sistema abierto.

El balance de OD dentro del reactor, durante las fases no aireadas, puede resumirse así:

$$\text{Entrada neta de OD} - \text{Respiración del fango} = \text{Variación OD} \quad (4-6)$$

Es decir:

$$V \times K_L a (OD_{\text{sat}} - OD) - V \times OUR = V \times \frac{dOD}{dt} \quad (4-7)$$

Donde

V = Volumen del reactor.

$K_L a$ = Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en fase líquida.

OD_{sat} = Concentración de oxígeno disuelto en saturación.

La OUR se puede a partir de la Ecuación 4.7

$$OUR = -\frac{dOD}{dt} + K_L a (OD_{\text{sat}} - OD) \quad (4-8)$$

Donde

$-dOD / dt$ = Velocidad de disminución del OD respecto al tiempo.

$K_L a (OD_{\text{sat}} - OD)$ = Transferencia de oxígeno en el reactor.

En un sistema ideal, el término de transferencia de oxígeno puede ser despreciable. Sin embargo, en el sistema abierto utilizado en el presente estudio fue necesario idear algunas estrategias para minimizar este término. Estas estrategias fueron las siguientes:

1. Disminuir la agitación al mínimo necesario para evitar la decantación ($K_L a$ aumenta con la agitación).
2. Minimizar la superficie agua-aire utilizando un reactor de forma alargada.
3. Disponer de una barrera física entre la superficie del sistema y la atmósfera, para lo que se utilizaron bolitas de plástico (flotantes) de 1 cm de diámetro y bolitas de poliespán.

Ensayos realizados con **sulfito de sodio** demostraron que estas estrategias eran suficientes para poder despreciar el término de transferencia de oxígeno en el reactor. La Ecuación 4.8 se simplifica entonces en la Ecuación 4.9

$$OUR = -\frac{dOD}{dt} \quad (4-9)$$

Los ensayos de DQO llevados a cabo para realizar la estimación de la TbOD fueron los siguientes:

- DQO total del ARU cruda (DQOT_{ARU}).
- DQOs del ARU cruda (DQOs_{ARU}).
- DQO total de la mezcla realizada inicialmente (0-h) (DQOTm₀).
- DQOs de la mezcla realizada inicialmente (0-h) (DQOsm₀).
- DQO de la mezcla final, igual a la DQOs de la mezcla al cabo de 24 h (DQOsm₂₄),

El cálculo de la TbOD se realiza mediante adiciones y sustracciones de cada una de las DQO obtenidas. En el presente trabajo fue necesario realizar algunas correcciones referentes a los factores de dilución, que en el trabajo de Park *et al.* (1997) no se tenían en cuenta. El procedimiento de cálculo utilizado en este trabajo fue el siguiente:

Los cinco valores de la DQO mencionados anteriormente permiten hallar los siguientes datos, como fase previa para determinar el valor de la TbOD o la DQOBT:

- 1) DQO de la MES del ARU (DQOMES_{ARU}).
- 2) DQO de la MES de la mezcla inicial (DQOMESm₀).
- 3) DQO de la biomasa de la mezcla inicial (DQObiomasam₀).
- 4) DQO del substrato de la mezcla inicial (DQOsubstratom₀).

Las ecuaciones de cálculo son las siguientes:

$$DQOMES_{ARU} = DQOT_{ARU} - DQOs_{ARU} \quad (4-10)$$

$$DQOMESm_0 = DQOTm_0 - DQOsm_0 \quad (4-11)$$

$$DQObiomasam_0 = DQOMESm_0 \left(\frac{V_{ARU}}{V_{LM} + V_{ARU}} \right) - DQOMES_{ARU} \quad (4-12)$$

donde:

$$V_{ARU} = \text{volumen de ARU utilizado para realizar la mezcla y,}$$

$$V_{LM} = \text{volumen de LM utilizado para realizar la mezcla.}$$

Por otra parte

$$DQOsubstratom_0 = DQOTm_0 - DQObiomasam_0 \quad (4-13)$$

Dado que la DQO del substrato final de la mezcla es la medida al cabo de 24 h de la DQO filtrada a través de una membrana de 0,45 μm (DQOsm₂₄), tenemos que:

$$TbOD = (DQOsubstratom_0 - DQOsm_{24}) \times \left(\frac{V_{LM} + V_{ARU}}{V_{ARU}} \right) \quad (4-14)$$

Determinación de la DQOFB y la DQOLB

Los valores estimados de la DQOBT y la DQOFB permiten hallar el valor de la DQOLB, mediante la ecuación siguiente:

$$DQOBT = DQOFB + DQOLB \quad (4-15)$$

La determinación de la DQOFB se realizó siguiendo el método descrito por Mamais *et al.* (1993). Para ello se tomaban 100 ml del afluente y del efluente del RBS, y se procesaban por separado de la siguiente manera:

1. Se añadía 1 ml de una solución de 100 g/l de sulfato de zinc a cada 100 ml de muestra.
2. Se ajustaba el pH, aproximadamente a 10,5 con una solución de NaOH, 6 M.
3. Se dejaba decantar la muestra durante 5 minutos.
4. Se extraían 30 ml de sobrenadante y se pasaban a través de un filtro de membrana de 0,45 μm .
5. Se realizaba el ensayo de DQO a la muestra filtrada.

Una vez procesadas las muestras del afluente y del efluente, se aplicaba la siguiente ecuación para determinar la concentración de DQOFB:

$$\text{DQOFB} = \text{DQOvsaf} - \text{DQOvsef} \quad (4-16)$$

donde:

DQOvsaf = DQO verdaderamente soluble en el afluente del RBS
DQOvsef = DQO verdaderamente soluble en el efluente del RBS

Finalmente, los datos obtenidos en los ensayos de la DQOBT y la DQOFB permitían estimar también los valores de la DQONBs y la DQONBp.

4.3.3. Medidas Biológicas

Velocidad de consumo de oxígeno del fango activado

Este parámetro permite valorar la actividad biológica de los fangos. Consiste en medir la velocidad con la que los microorganismos consumen el OD del LM durante el proceso de depuración. Esta velocidad se expresa en mg OD/l.h. Cuanto más grande es su valor, más elevada es la actividad biológica en el interior del reactor (Mas, 1996). La velocidad de consumo de oxígeno (OUR) en el fango activado se obtuvo a partir del registro por ordenador de la variación del OD, una vez que se dejaba de introducir aire en el LM. A partir de ese momento el OD comenzaba a disminuir, siguiendo una pendiente que permite calcular la velocidad de consumo. Los ensayos se realizaban al inicio de la etapa de reacción aeróbica.

Velocidad específica de consumo de oxígeno del fango activado

La velocidad específica de consumo de oxígeno (SOUR) se obtuvo dividiendo el valor de la OUR por la concentración de MESVLM. Las unidades de esta velocidad son mg OD/g MESVLM.h. Este parámetro permite valorar la cantidad de oxígeno utilizado por los microorganismos en un intervalo de tiempo determinado. Si el valor obtenido se encuentra alrededor de unos 20 mg OD/g MESVLM.h nos indica que se trata de un proceso de fangos activados convencional. En cambio, valores cercanos a 8 mg OD/g MESVLM.h indican que se trata de un proceso de aireación prolongada (Metcalf y Eddy, 1995).

Microbiología del fango activado

La composición microbiológica del fango activado fue determinada en ambas fases experimentales mediante observaciones y estudios detallados. Los estudios se centraron específicamente sobre la estructura de los flóculos y las poblaciones de protozoarios y de microorganismos filamentosos.

- **Observaciones rutinarias al microscopio**

La observación microscópica del fango es uno de los análisis rutinarios más importantes que deben realizarse en una planta de fangos activados. La observación del aspecto del fango permite deducir si el sistema está bien equilibrado o si existe alguna disfunción (Salvadó, 1999). El examen microscópico realizado rutinariamente durante este estudio se llevaba a cabo en el mismo Laboratorio de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. El examen microscópico consistía fundamentalmente en observar el tamaño y la morfología del flóculo, la presencia de diferentes tipos de protozoos e invertebrados inferiores y por último la abundancia de microorganismos filamentosos, la identificación de algunos de ellos y el efecto que tenían en el flóculo (flóculo abierto, flóculo cerrado o puentes entre flóculos).

Las observaciones microscópicas se realizaban en muestras de 100 ml que se introducían en un frasco de 500 ml, con el fin de proporcionar suficiente oxígeno durante el transporte hasta el microscopio. La muestra se observaba lo antes posible y regularmente antes de 30 minutos de la toma de muestras. Las observaciones microscópicas de los flóculos (tamaño, morfología y abundancia de filamentos) y de los protozoos e invertebrados inferiores se realizaban en un microscopio binocular marca Nikon 104 equipado con contraste de fases. Se utilizaban preferentemente 100 y 400 aumentos, aunque se usaban también 1000 aumentos.

Estudios sistemáticos realizados en ambas fases experimentales

Estos estudios fueron realizados por el equipo de trabajo del Departamento de Zoología de Invertebrados de la Universidad de Barcelona. De cada fase estudiada se tomaron en tiempos diferentes tres muestras de fango biológico del RBS, la Tabla 4.6 presenta las fechas exactas en que fueron tomadas cada una de las muestras estudiadas.

Tabla 4.6. Fechas de toma de muestra para los estudios realizados en el Departamento de Zoología de Invertebrados de la Universidad de Barcelona.

Fase	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Fase 1	09/07/99	20/07/99	09/09/99
Fase 2	22/11/99	29/11/99	13/12/99

Asimismo, se obtuvo una muestra de fango anaeróbico del prefermentador (08/11/99). El procedimiento de toma de muestra fue el mismo que el utilizado para las

observaciones rutinarias: se tomaban 100 ml de muestra en un frasco de 500 ml con el fin de proporcionar suficiente oxígeno durante el transporte hasta el Laboratorio de Zoología, la muestra se observaba lo antes posible.

Cada una de las muestras fue sometida a los siguientes estudios:

a) Estructura y morfología del flóculo

La decantación del fango está relacionada con la naturaleza de sus flóculos, es decir, depende de su micro y macroestructura así como de la presencia de microorganismos filamentosos, que son la "columna vertebral" de la estructura flocular (Jenkins *et al.*, 1993). Los tres tipos de flóculos evaluados en las muestras de fango fueron: 1) flóculos ideales (flóculo regular, compacto, cerrado y grande), 2) flóculos pequeños y dispersos (característicos del *pin floc*) y 3) flóculos esponjados (característicos del *bulking filamentoso*). La determinación del tamaño de los diferentes tipos de flóculos se realizó con un ocular de microscopio provisto de micrómetro incorporado; se medían entre 10 y 20 flóculos, distinguiéndose entre: 1) flóculos pequeños, menores de 150 μm , 2) flóculos medianos, entre 150 y 500 μm y 3) flóculos grandes, mayores de 500 μm .

b) Conteo e identificación de microorganismos filamentosos

La técnica utilizada para el recuento de los microorganismos filamentosos fue la desarrollada por Salvadó (1990). Esta técnica se basa en encontrar la relación existente entre la circunferencia que conforma el ocular del microscopio y el número medio de intersecciones que se obtienen al cruzar los microorganismos con esta circunferencia. Esta técnica permite determinar la longitud de cada filamento identificado. El procedimiento era el siguiente:

1. Se colocaban 30 μl de muestra fresca totalmente homogeneizada en un portaobjetos.
2. Se cubría la muestra con un cubreobjetos.
3. Se realizaba la observación de 30 campos de la preparación a 400 aumentos, y se contabilizaba el número de filamentos que intersectaban con el campo del microscopio, a fin de obtener el promedio de intersecciones por campo.
4. Se repetía la misma operación cuatro veces.
5. El número de microorganismos filamentosos se obtenía mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{L}{V} \left(\frac{\text{m}}{\text{ml}} \right) = \frac{n_i \times \text{área}}{l \times k \times V} \quad (4-17)$$

donde:

- L : longitud total de los filamentos, en m.
 V : volumen de la muestra, en ml.
 n_i : número de intersecciones / número de campos observados
 área : área del cubreobjetos, en mm^2 .
 l : longitud del segmento (perímetro del campo) = $2\pi r$.
 k : 0,63662 (media del seno de 0° a 360° entre los filamentos y el

segmento de la circunferencia).

Las abundancias de organismos filamentosos se expresa en metros por mililitro.

La **identificación** y caracterización de los microorganismos filamentosos se realizó mediante las referencias de Eikelboom D.H. (1975 y 1977) y Jenkins *et al.* (1993). Se atendió a una serie de características estructurales y morfológicas. El examen se llevaba a cabo mediante óptica de contraste de fases, de preferencia a 1000 aumentos, y haciendo uso de un objetivo de inmersión. Según Salvadó (1990), en algunas ocasiones es necesario poner de manifiesto las respuestas de algunos microorganismos a las distintas tinciones diferenciales.

Los aspectos estructurales y morfológicos considerados principalmente durante la caracterización de los filamentosos fueron los siguientes:

Ramificaciones. Tiene en cuenta la presencia o ausencia de ramificaciones en los filamentos y adicionalmente, en caso de que existan, se distingue entre ramificaciones verdaderas o falsas. Una ramificación es verdadera cuando existe continuidad citoplasmática entre los tricomas ramificados. Este es el caso de los hongos o del género *Nocardia*.

Motilidad. Son muy pocos microorganismos que presentan movilidad propia; es importante tener en cuenta que cuando la muestra se va evaporando se producen corrientes que hacen parecer que los microorganismos se están moviendo. Si se confirma la presencia de movilidad hay que diferenciar dos tipos de movimientos: por deslizamiento (*Beggiatoa*, *Cyanophyceae*) y por flexión (*Flexibacter*).

Localización del filamento. La ubicación de un filamento se determina siempre en relación con el flóculo, de manera que pueda distinguirse entre las tres siguientes situaciones:

1. Extensión o proyección desde la superficie del flóculo hacia el exterior.
2. Intrafloculares (dentro del flóculo).
3. Libres en los espacios interfloculares (fuera del flóculo o exterior).

Forma del filamento. Los filamentos presentan una variada morfología que puede agruparse en las siguientes categorías (EMASESA, 1997):

Rectos: El tricoma presenta una forma recta en su mayor parte (Figura 4.11).

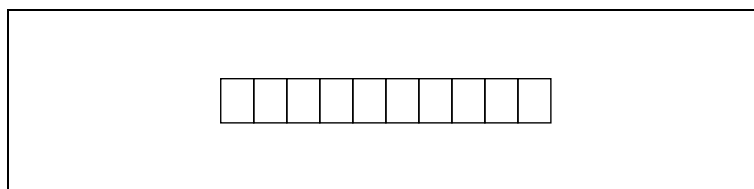


Figura 4.11. Filamento en forma recta.

Ligeramente curvos: El filamento tiene tramos curvos de amplio radio (Figura 4.12).

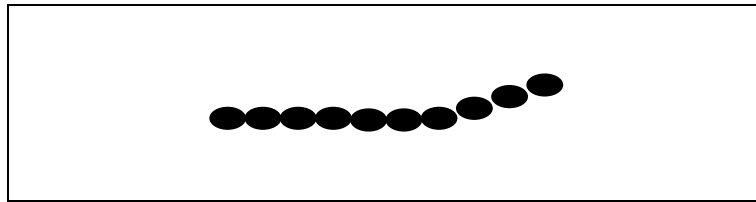


Figura 4.12. Filamento en forma ligeramente curva.

Torcidos: Son filamentos aparentemente rectos o ligeramente curvados, pero con puntos de inflexión pronunciados que provocan un cambio de dirección (Figura 4.13).

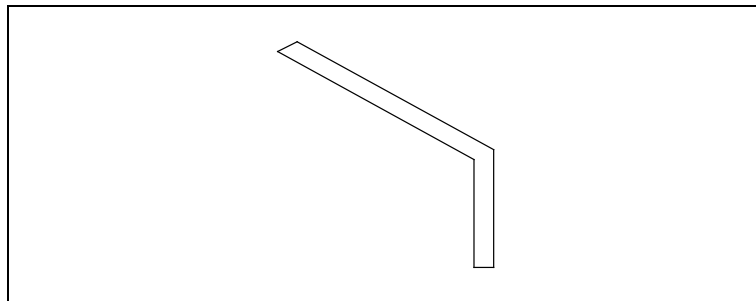


Figura 4.13. Filamento en forma torcida.

Cadenas irregulares de células: Se trata de una sucesión de células individuales (cocos, bacilos o cocobacilos) dispuestas de forma aleatoria (Figura 4.14).

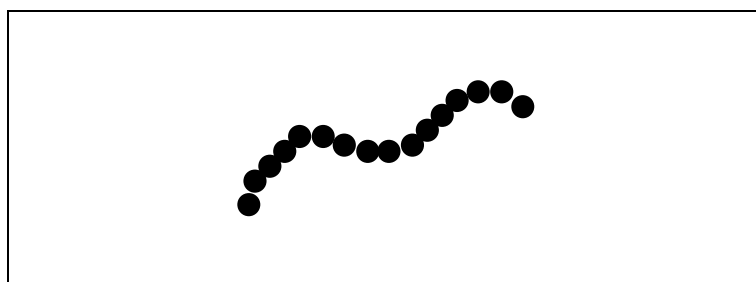


Figura 4.14. Filamento en forma de cadena irregular.

Enrollados: Los filamentos tienen formas muy curvas y suelen enrollarse entre sí (Figura 4.15).

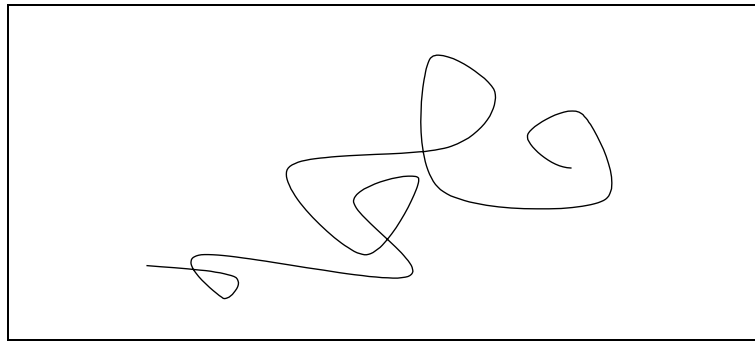


Figura 4.15. Filamento en forma enrollada.

Micelial: Se observa en filamentos con ramificaciones verdaderas, y dispuestas en forma aleatoria (Figura 4.16).

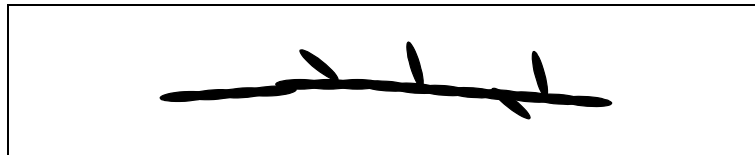


Figura 4.16. Filamento en forma micelial.

Forma celular. Las células individuales de cada filamento pueden clasificarse en las siguientes categorías: cuadradas, rectangulares, discoidales, ovales, bacilares (con extremos redondeados) y redondos (cocos).

Dimensiones del filamento. La longitud y el ancho de los filamentos se miden con ayuda de un micrómetro ocular calibrado, y se expresan en micras μm . Una característica importante es la determinación de la anchura de los filamentos, ya que su clave dicotómica dependerá de si ésta es superior o inferior a $1 \mu\text{m}$.

Dimensiones celulares. La longitud media y el ancho de las células de un filamento, se pueden determinar mediante sucesivas mediciones expresándolas también en μm .

Septos celulares. Son los tabiques de separación que pueden existir entre células contiguas de un filamento. Se determina su ausencia o presencia, aunque ello es a veces de difícil observación.

Constricciones celulares. Se trata de una discontinuidad producida en los bordes del filamento coincidiendo con los septos celulares. La presencia de constricciones celulares implica siempre la existencia de septos celulares.

Crecimiento epifítico o adherido. Se designa así el crecimiento de células bacterianas sobre la superficie del propio filamento, utilizándolo soporte fijo o substrato. Normalmente se produce en filamentos que poseen vaina o cubierta y, aunque mayoritariamente dicho crecimiento es perpendicular al eje longitudinal del filamento, en ocasiones se observa un crecimiento en paralelo que incluso adopta una disposición de tipo helicoidal. La observación consiste en determinar la ausencia o

presencia de este tipo de crecimiento y, en caso positivo, se matiza si dicho crecimiento se produce de manera ocasional (Figura 4.17) o sustancial (Figura 4.18).

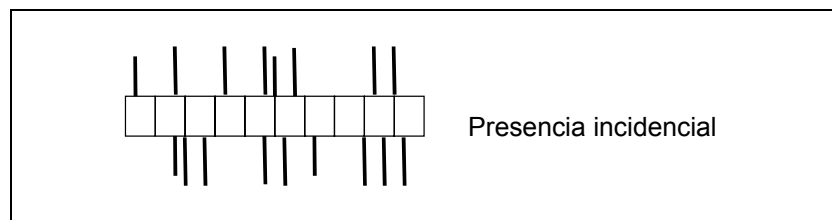


Figura 4.17. Crecimiento adherido presente de manera ocasional.

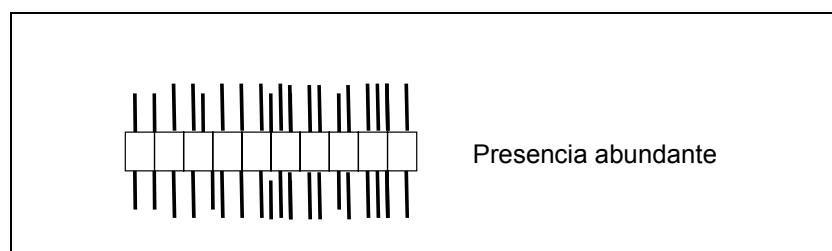


Figura 4.18. Crecimiento adherido presente de manera sustancial.

Vaina. Algunos filamentos presentan una cubierta tubular, a modo de revestimiento cilíndrico del propio filamento, que engloba las células individuales y se denomina vaina o cubierta. Normalmente su observación es complicada, distinguiéndose claramente cuando faltan células en algún tramo del filamento, en cuyo caso aparece como una estructura muy transparente y fácilmente diferenciable. Por otro lado, la presencia de crecimiento epifítico abundante o sustancial indica generalmente la presencia de vaina. Muchas veces es necesario el uso de tinciones para poder diferenciar entre una vaina verdadera y otra estructura similar.

Gránulos de azufre. Algunas bacterias filamentosas son capaces de almacenar gránulos de azufre en el interior de sus células, lo que les proporciona sustancias de reserva para su crecimiento en ambientes con escasez en compuestos de azufre. Dichos gránulos se presentan como depósitos brillantes (bajo óptica de contraste de fases), bien de color amarillo y forma esférica o cuadrangular (Tipo 0914), o esféricos y de diferentes coloraciones (amarillos, rosas, azules, etc) antes o después de ser sometidos a la prueba del azufre (*Beggiatoa spp.*, *Thiothrix spp.*, Tipo 021 N).

Otros gránulos. Se identificaron fundamentalmente dos tipos de gránulos intracelulares que, siendo considerados como acumulaciones de sustancias de reserva, se ponen claramente de manifiesto a través de las correspondientes tinciones que más adelante se tratan:

Gránulos de polifosfatos (Tinción Neisser)

Gránulos de poli- β -hidroxibutirato (Tinción PHB)

Respuesta a tinciones diferenciales (Gram y Neisser). Las dos tinciones diferenciales empleadas en la identificación de microorganismos filamentosos (Gram y Neisser) se

realizan sobre frotis fijados previamente; su observación microscópica se practica siempre bajo óptica de campo claro, a 1000x e inmersión de aceite.

La tinción Gram permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos (Gram positiva y Gram negativa) basándose en el grado de permeabilidad de las paredes celulares de las bacterias al disolvente utilizado durante el procedimiento de tinción (Jenkins, *et al.*, 1993). Por otro lado, la tinción Neisser (Oliveras, 1998) permite resaltar la presencia de gránulos intracelulares de polifosfatos (Gránulos Neisser positivos o negativos); estos gránulos son compuestos de reserva que se pueden observar bien al adquirir un color negro-azulado.

Rosetas y Gonidios. En ocasiones el fango activado presenta asociaciones de filamentos llamados rosetas. Los filamentos se encuentran agrupados y unidos por sus células basales, formando un radio hacia el exterior desde un punto en común. Parece ser que esto se debe a que en determinadas ocasiones algunos filamentos segregan ciertos compuestos en uno de sus extremos, con lo cual pueden mantenerse pegados unos a otros en un punto determinado. Esta característica sólo ha sido descrita en *Thiothrix spp* y Tipo 021 N (Figura 4.19).

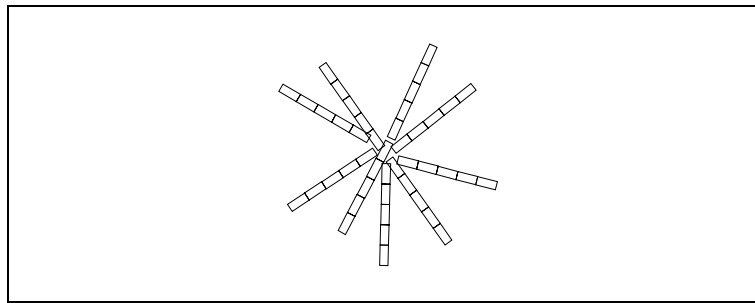


Figura 4.19. Filamento en forma de roseta.

Otras formas especiales que aparecen en algunos tipos de filamentos son los *gonidios*; se trata de células ovales o bacilares que exclusivamente aparecen en el extremo del filamento y que son en apariencia totalmente distintas del resto de las células vegetativas del filamento. Podría ser que dichas células tuvieran un papel reproductor (Figura 4.20). Tanto las rosetas como los gonidios parecen indicar que los microorganismos se encuentran en una fase de crecimiento veloz.

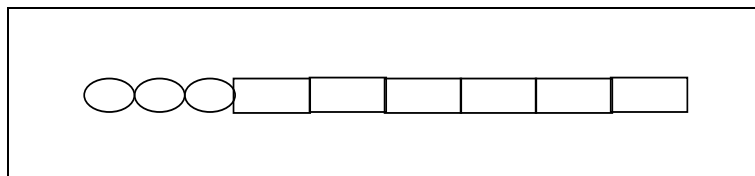


Figura 4.20. Filamento en forma de gonidio.

Como se puede observar, la identificación realizada en este trabajo fue principalmente de tipo morfológico. Mientras algunos filamentos se encuentran caracterizados a escala taxonómica, recibiendo su denominación de género y especie, otros tan sólo

se registran como integrantes de un género e incluso la mayoría de ellos reciben una identificación alfanumérica atendiendo a caracteres morfológicos. Ello se debe principalmente a que muchos de estos microorganismos en cultivos puros muestran una morfología celular diferente a la que presentan en los fangos activados.

c) Conteo e identificación de protozoarios

De cada muestra de agua se obtenían de dos a cuatro submuestras de 25 μl , en las que se efectuaban los siguientes estudios: 1) identificación y recuento de protozoarios ciliados, 2) identificación y recuento de protozoarios flagelados y ameboides, 3) identificación y recuento de metazoarios, 4) técnicas de cultivo de protozoarios ciliados y 5) técnicas citológicas.

Los recuentos siempre se efectuaron *in vivo* utilizando un microscopio de campo claro o bien de contraste de fases. Se utilizaron, en ciertos casos, técnicas especiales para identificar los taxones que así lo requerían.

La abundancia de organismos se expresa en individuos por mililitro, utilizando la técnica de Salvadó (1990). El procedimiento completo utilizado en la identificación y el recuento de cada uno de estos organismos estudiados se describe también en esta referencia. A continuación presentamos algunas consideraciones importantes a tener en cuenta durante el conteo y la identificación de los protozoarios.

Identificación y recuento de protozoarios ciliados

El volumen de muestra a tomar variará en función de la concentración de microorganismos encontrados (Salvadó, 1990). Si el número total de individuos contabilizados por muestra es inferior a 100 individuos por ml, el número de replicas se amplía hasta un total de cuatro. La abundancia de materia en suspensión y organismos obliga a realizar el recuento de ciliados con un microscopio óptico a 100x. Los ciliados se clasifican *in vivo* y frecuentemente es necesario utilizar coloraciones vitales para su identificación. No obstante, en ocasiones se debe recurrir a técnicas de impregnación con plata; estas técnicas precisan un número elevado de individuos y por ello es necesario a veces el uso de cultivos.

Identificación y recuento de protozoarios flagelados y ameboides

El recuento de protozoarios flagelados, protozoarios ameboides y metazoarios se efectúa con la misma metodología utilizada para los protozoarios ciliados. Los protozoos más pequeños, como es el caso de los flagelados (inferiores a 20 μm) y las gimnamebas (inferiores a 20 μm), se observan a 400 aumentos.

Técnicas de cultivo de protozoarios ciliados.

La caracterización y clasificación de los ciliados requiere frecuentemente la utilización de técnicas citológicas. Estas técnicas necesitan de gran cantidad de individuos que se pueden conseguir mediante cultivos monoespecíficos. Los medios más frecuentemente utilizados para realizar estos cultivos son los siguientes: medios con trigo, medios con arroz y medios con lechuga (Salvadó, 1990).

Técnicas citológicas

Gran parte del tiempo dedicado al estudio microbiológico de una muestra se dedica a realizar la identificación de las diversas especies presentes en ella, lo que requiere una manipulación de los especímenes y el uso de diversas técnicas citológicas. Las técnicas citológicas utilizadas en este trabajo fueron: 1) técnicas de observación en vivo, 2) tinciones vitales y 3) técnicas de impregnación con plata.

Observaciones en vivo

Hay especies que se mueven muy rápidamente y por ello es necesario moderar su movimiento para poder observar mejor su estructura. Existen cuatro procedimientos para conseguirlo:

1. Utilizando un papel de filtro para retirar la mayor parte del agua de la muestra que contiene al microorganismo, de manera que éste ya no pueda desplazarse.
 2. Haciendo la muestra más viscosa mediante la adición de una gota de metilcelulosa a una gota de muestra en portaobjetos.
 3. Anestesiando químicamente la célula con:
 - Sulfato de níquel al 0,01 %
 - Formol diluido al 4%
 4. Bajando la temperatura de la muestra hasta 0 °C (Salvadó, 1986) con lo que se consigue una reducción del movimiento.
- Tinciones en vivo (coloraciones vitales)

Se pueden utilizar diferentes colorantes, entre los que cabe destacar: 1) el *rojo neutro* al 0,05% que permite visualizar las vacuolas digestivas y 2) el *verde de metil acético* que permite visualizar el núcleo con un color verde-azul.

- Impregnación con plata

Las técnicas de impregnación argéntica permiten resaltar la infraciliación, los arginomas y el núcleo. En este trabajo se utilizó la técnica de impregnación con carbonato de plata amoniacal Fernández-Galeano (1976). Esta técnica pone de manifiesto muy claramente la infraciliación somática y oral de los ciliados. También se impregnan las fibras cinetodésmicas, las estructuras fibrilares, los tricocistos, los mucocistos y el aparato nuclear. Algunas veces también se puede observar el arginoma.

a) Fotografías

El estudio microbiológico realizado en el laboratorio del Departamento de Zoología de Invertebrados de la Universidad de Barcelona incluyó también la realización de varias fotografías de cada una de las muestras analizadas, con la finalidad de mostrar visualmente la composición característica de los ecosistemas estudiados. Se puso especial interés en captar la forma y la estructura flocular, así como los filamentos, los protozoarios y los metazoarios más representativos de cada muestra.

e) Estimación de la diversidad específica de ciliados

La diversidad específica se calculó únicamente para las especies de ciliados, según el índice de diversidad de Shannon y Weaver (Oliveras, 1998 y MSGC, 2001):

$$H = - \sum (p_i * \log_2 [p_i]) \quad (4-16)$$

donde

H	: diversidad específica
p_i	: N_i / N
N_i	: Número de individuos de una determinada especie
N	: Número de individuos totales
$\log_2 (p_i)$: $3,3219 * \log_{10} (p_i)$

Este índice se aplica en estudios de ecología para determinar la riqueza de especies y la proporción de cada especie dentro de un ecosistema en particular.

4.4. CONFIGURACIÓN DEL CICLO DE TRATAMIENTO Y CONDICIONES DE OPERACIÓN DE CADA FASE EXPERIMENTAL

La secuencia de tratamiento del RBS fue diseñada y estudiada con la finalidad de optimizar el proceso de eliminación de MO, N y P del ARU. Esta configuración fue evaluada en dos condiciones de operación diferentes que corresponden a dos fases experimentales del estudio. En el presente apartado se describen detalladamente las estrategias de operación que conforman la secuencia de tratamiento diseñada y las condiciones de operación de cada fase experimental.

4.4.1. Primera fase experimental

La primera fase experimental estuvo constituida principalmente por las siguientes tareas:

1. Planteamiento y diseño de un ciclo de tratamiento en RBS.
2. Estudio de la eliminación simultánea de MO, N y P en función de las estrategias operacionales del ciclo diseñado: llenado estático, fase posanóxica, alta concentración de MESVLM, baja concentración de OD en las fases aeróbicas, elevado tiempo total de anoxia en el tratamiento y presencia de sólidos primarios en el afluente crudo.
3. Caracterización de la calidad orgánica del ARU cruda: DQO fraccionada y Potencial de AGV.

Consideraciones previas al diseño del ciclo

El diseño de la secuencia de tratamiento biológico estudiada tuvo en consideración las conclusiones y propuestas sugeridas por Escaler (1997) y por la revisión bibliográfica llevada a cabo en la presente tesis doctoral.

Las consideraciones más destacables son las siguientes:

- a) La calidad orgánica de un ARU puede medirse en términos de su concentración de DQOFB o AGV. Mientras que la DN requiere DQOFB como fuente de carbono, la EBIF necesita AGV para los OAF. Algunos autores sugieren que se necesitan 20 mg AGV-DQO para eliminar 1 mg P (Abu-ghararah y Randall, 1991).

De esta manera, es importante asegurar que el diseño de las instalaciones y las estrategias de operación satisfacen estos requerimientos. La bibliografía sugiere las siguientes estrategias para conseguirlo:

- 1) Los llenados estáticos, en cuanto favorecen el incremento de la carga másica (Manning y Irvine, 1985).
 - 2) El diseño de instalaciones de fermentación de los sólidos primarios (Rabinowitz *et al.*, 1987; Randall *et al.*, 1992 y Sedlak, 1991).
 - 3) El uso de substratos cuya principal característica sea su alto contenido en AGV (Carucci *et al.*, 1997).
 - 4) La supresión de factores de inhibición de la producción de AGV durante el transporte del ARU hasta la planta. Por ejemplo, evitando la aireación del ARU en los depósitos previos al proceso de tratamiento biológico.
- b) Una buena desnitrificación es un prerequisite importante para una óptima EBIF, por lo que se deben favorecer períodos anaeróbicos largos, y desarrollar estrategias que minimicen los nitratos procedentes de la nitrificación, y el oxígeno molecular que entra en las zonas anaeróbicas (Chuang *et al.*, 1996), esto puede lograrse con:
 - 1) Disminución de los estados aeróbicos por un incremento del tiempo total sin aireación dentro de un Ciclo de tratamiento.
 - 2) La aplicación de la desnitrificación postanóxica mediante respiración endógena,
 - c) Un incremento de las concentraciones de MESVLM en el LM superiores a 2000 mg/l, para garantizar así una mayor eficacia en la depuración y lograr una mayor similitud con las concentraciones en las plantas reales. De esta manera se podrá reducir también el tiempo de aireación, favoreciendo así los procesos de desnitrificación y de eliminación biológica de fósforo (Escaler, 1997).

Configuración del ciclo de tratamiento

La Figura 4.21 muestra la secuencia de tratamiento diseñada teniendo en cuenta todas estas consideraciones.

La duración del ciclo de tratamiento fue de 6 h. El tiempo total de llenado fue de 3 h, incluyendo 1 h de llenado estático y 2 h de un llenado que combinó: fases de mezcla sin aireación (de 0,75 h cada una) y fases de mezcla con aireación (de 0,25 h cada una). La etapa de reacción total fue de 1,5 h de aireación mezclada y 0,75 h de fase posanóxica. La decantación duró 0,63h y el vaciado 7 min.

El punto de consigna del controlador PID de OD se fijó en 2 mg OD/l y el TRS fue de 24 días.

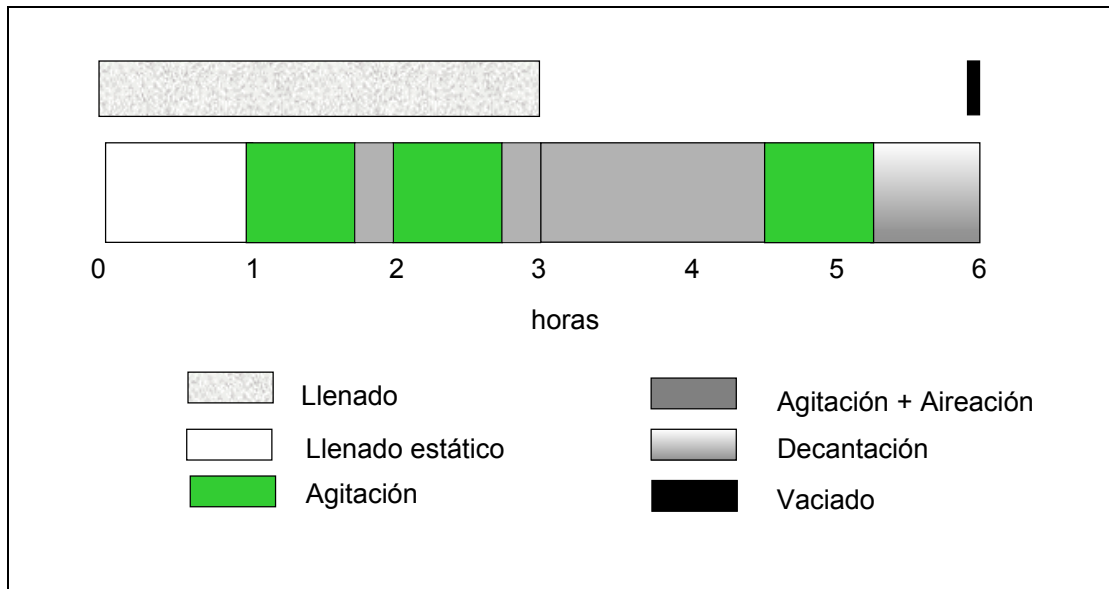


Figura 4.21. Configuración de la secuencia de tratamiento utilizada en el estudio de la eliminación biológica de nutrientes en RBS.

La Tabla 4.7 se presenta la distribución horaria de las etapas del ciclo de tratamiento aplicado. Asimismo, la Tabla 4.8 resume las características operacionales más importantes del tratamiento aplicado.

Tabla 4.7. Distribución horaria de las etapas del ciclo de tratamiento diseñado en el estudio de la eliminación biológica de nutrientes en RBS.

ETAPAS	MAÑANA	TARDE	NOCHE- MADRUGADA	MADRUGADA- MAÑANA
Llenado	09:00 – 12:00	15:00-18:00	21:00-24:00	03:00-06:00
Reacción	12:00 – 14:15	18:00-20:15	24:00-02:15	06:00-08:15
Decantación	14:15 – 14:53	20:15-20:53	02:15-02:53	08:15-08:53
Vaciado	14:53 – 15:00	20:53-21:00	02:53-03:00	08:53-09:00

Tabla 4.8. Características operacionales del tratamiento aplicado para la eliminación biológica de nutrientes en RBS.

Característica	Valor establecido
Volumen total del Reactor	24 l
Capacidad de tratamiento	12 l/ciclo y 48 l/d
Número de ciclos por día	4
Caudal de llenado	4 l/h
Caudal de purga	1 l/d
TRS	24 d
OD	2,0 mgO ₂ /l
Duración del ciclo	6 h
Tiempo total de llenado	3 h/Ciclo
Tiempo total de llenado anóxico	2,5 h
Tiempo total de llenado aeróbico	0,5 h
Duración de la fase de reacción	2,25 h
Tiempo de decantación	0,63 h
Tiempo de vaciado	7 min
Tiempo total del ciclo sin aireación	4 h
Tiempo Total del ciclo con aireación	2 h

Puesta en marcha del reactor y período de formación de fango

La primera fase experimental del reactor comenzó el 1 de febrero de 1999 con la puesta en marcha del RBS. El proceso de generación de fango consistió en programar un ciclo simple, incluyendo llenado, decantación y purga. El reactor se llenó el primer día hasta 24 l de ARU, se conectó la aireación y la agitación de forma continua y, después de 24 h de iniciado este proceso, se procedió a la decantación de los sólidos durante 30 minutos. Cuando los sólidos habían decantado (30 minutos después) el sobrenadante del RBS se vació, dejando un volumen de 12 litros dentro del reactor. Este procedimiento de generación de fango se repitió durante 25 días, al final de los cuales se puso en marcha la programación del Ciclo de tratamiento estudiado, con todas las instalaciones, los equipos y la instrumentación correspondientes.

Toma de muestras

El seguimiento del ciclo estudiado, se realizó mediante análisis de tres tipos de muestras: afluente, efluente y líquido de mezcla del reactor. Las muestras de ARU afluente se recogían del tubo de látex que transportaba el afluente desde la bomba de llenado hasta la entrada situada en el reactor. Se instaló una pieza en T que permitía extraer la muestra del tubo. El agua que salía durante los primeros segundos se rechazaba para eliminar las posibles partículas depositadas en ella. Asimismo, el vaso de precipitados limpio con el que se recogía la muestra se enjuagaba con un poco del agua residual obtenida de este mismo dispositivo en T.

Las muestras de efluente se recogían también del tubo de látex conectado al orificio de salida del efluente, mediante un vaso de precipitados. El primer litro se rechazaba con el fin de evitar los posibles depósitos de fango en algunas partes del tubo de látex. Cabe señalar que los fangos se adhieren normalmente a las paredes del reactor y son arrastrados por el efluente durante el proceso de vaciado. Este efecto también se produce en los reactores a escala real, pero en mucho menor grado debido a que la superficie de sus paredes es menor en relación con el volumen total del reactor (Escaler, 1997).

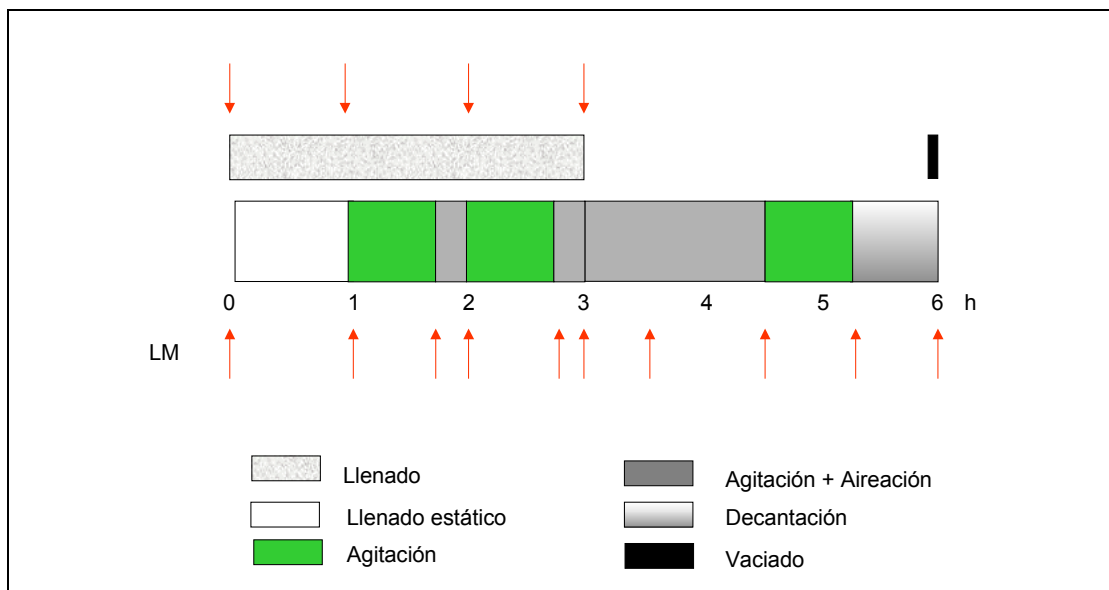


Figura 4.22. Momentos en que se realizaba la toma de muestra en el afluente y el interior del RBS utilizado para el estudio de la eliminación biológica de nutrientes.

Las muestras del LM se extraían del reactor por el orificio superior de los cuatro situados cada 5 cm desde el fondo del reactor (ver Figura 4.7). Los primeros 30 ml de LM correspondían a los retenidos en el interior del tubo de látex unido al orificio de muestreo y, por lo tanto, se rechazaban. La muestra se recogía también en un vaso de precipitado perfectamente limpio. La mayoría de las muestras eran analizadas lo más rápidamente posible. Sin embargo, algunas muestras eran preparadas para su preservación en las mejores condiciones hasta su análisis. Los métodos de preservación utilizados fueron tomados de EPA (1982) y Park (1997).

La Figura 4.22 ilustra los momentos en que se realizaba la toma de muestras del afluente, del LM y del efluente del reactor, a lo largo de un ciclo de tratamiento. La Tabla 4.9 indica todos los ensayos realizados en el afluente, el LM y el efluente del reactor, durante la primera fase experimental.

Tabla 4.9. Ensayos realizados en el afluente, el LM y el efluente del RBS en la primera fase experimental del estudio de EBN

Parámetro	Afluente	LM	Efluente
Temperatura	X	X	
MES y MESV	X	X	X
IVF		X	
pH	X	X	X
Alcalinidad	X	X	X
OD	X	X	
NH ₄ -N	X	X	X
NO ₃ -N		X	X
NO ₂ -N		X	X
NKT	X		X
PRS	X	X	X
PT	X		X
DQO	X		X
DQO fraccionada	X		
DQOs	X	X	X
Concentración AGV	X	X	
Potencial AGV	X		
VCO y VECO		X	
Observaciones al microscopio		X	
Estructura del flóculo		X	
Filamentosos		X	
Protozoarios		X	

Por último, es importante mencionar que antes del inicio de la primera fase experimental se realizaron las siguientes tareas:

- 1) Investigación sobre las metodologías propuestas en la literatura para determinar las diferentes fracciones de la demanda química de oxígeno (DQO).
- 2) Investigación sobre las metodologías propuestas en la literatura para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV).
- 3) Investigación, modificación y puesta a punto del ensayo del potencial de AGV.
- 4) Muestreo y análisis de 24 muestras de afluente sometido a las mismas condiciones experimentales reportadas en el trabajo de Escaler (1997).

4.4.2. Segunda fase experimental

El cambio de la configuración de la segunda fase experimental consistió en unir a la línea de tratamiento del ciclo analizado en la fase 1 un sistema de fermentación acidogénica de sólidos primarios como el descrito en el apartado 4.2.2. De esta manera, el diseño y las condiciones operacionales del ciclo de tratamiento siguieron siendo las mismas que los de la fase 1, a excepción de las características de su afluente.

El estudio del proceso completo de esta segunda fase experimental se puede dividir en dos partes. La primera de ellas corresponde a la puesta en marcha, la explotación y la operación del prefermentador. La segunda parte corresponde al estudio de la influencia de la prefermentación en la eliminación biológica de nutrientes. En el apartado 4.2.2 se describió el diseño y el montaje del prefermentador, mientras que en este apartado se presentan las fases de estudio posteriores.

Puesta en marcha, explotación y operación del prefermentador

La puesta en marcha del prefermentador acidogénico comenzó el 1 de septiembre de 1999, Previamente, se habían realizado ensayos para determinar la concentración típica de AGV en el ARU cruda y se encontraron concentraciones débiles (< 10 mg AGV-DQO/l). Sin embargo, la investigación del potencial de AGV de esta misma ARU permitió descubrir la posibilidad de llegar a obtener concentraciones cercanas a los 100 mg AGV-DQO/l. Este resultado impulsó la idea de construir el prefermentador, darle seguimiento y optimizarlo para conseguir concentraciones de AGV semejantes a las obtenidas en los ensayos del potencial de AGV.

El prefermentador fue estudiado a lo largo de tres periodos operacionales, denominados A, B y C. El **Periodo A** tuvo una duración de 30 días, del 1 al 30 de septiembre de 1999, durante los cuales se fijó un TRS de 5 días. En el segundo periodo, **Periodo B**, se fijó un TRS de 10 días y únicamente se estudió del 1 al 10 de octubre de 1999, ya que mostró claramente unas pobres condiciones de fermentación acidogénica. El prefermentador permaneció abierto a la atmósfera durante los Periodos A y B. Finalmente, el **Periodo C** tuvo una duración de 65 días (del 11 octubre al 14 de diciembre de 1999). Durante este último periodo de operación, el TRS se fijó nuevamente en 5 días, pero el prefermentador fue cubierto con tapas no herméticas, con el fin de mejorar el control de la temperatura y del ORP.

La fermentación acidogénica fue evaluada mediante varios análisis rutinarios durante los tres periodos estudiados (Tabla 4.10). Los análisis se realizaron en el afluente, el fango primario y el efluente del prefermentador. Las concentraciones de AGV fueron convertidas a DQO usando los siguientes factores de conversión: 1,066 para el ácido acético, 1,514 para el ácido propiónico, 1,818 para el ácido butírico y 2,039 para los ácidos valérico e isovalérico. De esta manera, las concentraciones de AGV indicadas en este trabajo vienen expresadas en mg AGV-DQO/l.

Tabla 4.10. Parámetros analizados en el afluente, el efluente y el fango del prefermentador utilizado en el estudio de la EBN en RBS.

Parámetro	Afluente del prefermentador	Fango del prefermentador	Efluente del prefermentador
Temperatura		X	
MES	X	X	X
pH	X		X
Alcalinidad	X		X
OD		X	
ORP		X	
NH ₄ -N	X		X
PRS	X		X
PT	X		X
DQO	X		X
DQO fraccionada	X		X
DQOs	X		X
Concentración AGV	X		X
Potencial AGV	X		X
Estructura del flóculo		X	
Filamentosos		X	
Protozoarios		X	

Seguimiento y estudio de las respuestas producidas por la prefermentación en la secuencia de tratamiento estudiada

El prefermentador se conectó en línea con el RBS el 12 de octubre de 1999. La influencia de la prefermentación en el ciclo de tratamiento diseñado fue estudiada durante 65 días. Los análisis de seguimiento rutinario se llevaron a cabo en el afluente, el efluente y el LM del RBS. Estos análisis fueron prácticamente los mismos que los realizados durante la primera fase experimental (Tabla 4.9). Asimismo, los puntos de muestreo en el LM del RBS fueron también los mismos que los presentados en la Figura 4.21 (primera fase). La toma de muestras y el tratamiento de las mismas ya ha sido indicada en el apartado 4.4.1.

4.5. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los datos fue llevado a cabo mediante las siguientes herramientas estadísticas:

1. Pruebas de hipótesis sobre las medias de distribuciones con varianzas desconocidas.

2. Intervalos de confianza para las medias de las distribuciones.
3. Intervalos de confianza para la diferencia entre las medias de las distribuciones.
4. Media y desviación típica común para varias distribuciones.
5. Análisis de agrupamiento de datos.
6. Determinación de coeficientes de correlación Pearson y de coeficientes de determinación.

Los estadísticos de prueba t y F fueron elegidos para estimar las pruebas de hipótesis y los intervalos de confianza. Los estadísticos t y F fueron estimados a partir de datos muestrales. Los valores críticos de t y F se obtuvieron de tablas estadísticas (UPC, 1985) y de la hoja de cálculo Microsoft Excel. Los procedimientos seguidos y fórmulas utilizadas en estas estimaciones fueron tomados de Montgomery y Runger (1996), y se presentan en el Anexo 1.

El procedimiento utilizado para el **análisis de conglomerados** fue el método denominado *K-means clustering* y descrito en Kaufman y Rousseeuw (1990). Este método divide un conjunto de datos en un número escogido de grupos mediante la maximización de la variación entre los grupos en relación con la variación en el interior de los grupos. Esto es similar a hacer el análisis de varianza de una variable en el que los grupos son desconocidos y se busca el valor máximo de F mediante la reasignación de miembros a cada grupo.

El método *K-means clustering* empieza con un grupo y lo divide en dos tomando el caso que está más alejado del centro como punto de partida para un segundo grupo, y asignando cada caso al centro más cercano. Así continúa dividiendo uno de los grupos en dos (y reasignando casos) hasta que se ha formado un número especificado de grupos. El método *K-means clustering* reasigna casos hasta que la suma de cuadrados interior de los grupos no se puede reducir más.

Tanto los análisis de conglomerados como la obtención de coeficientes de correlación de Pearson y los coeficientes de determinación fueron realizados con el paquete estadístico SYSTAT 10.

