

Editores de la edición en español

Carlos M. López Vázquez • Carlos Menéndez Gutiérrez • Cheikh Fall

# Métodos experimentales para el tratamiento de aguas residuales

Mark C.M. van Loosdrecht • Per Halkjær Nielsen • Carlos M. López-Vázquez • Damir Brdjanovic



# Métodos Experimentales para el Tratamiento de Aguas Residuales



# Métodos Experimentales para el Tratamiento de Aguas Residuales

Editores de la versión en español

Carlos M. López Vázquez, Carlos Menéndez Gutiérrez, Cheikh Fall

Editores de la versión en inglés

Mark C. M. van Loosdrecht, Per H. Nielsen, Carlos M. Lopez-Vazquez,  
Damir Brdjanovic





Publicado por: **IWA Publishing**  
Alliance House  
12 Caxton Street  
London SW1H 0QS, UK  
T: +44 (0) 20 7654 5500  
F: +44 (0) 20 7654 5555  
E: [publications@iwap.co.uk](mailto:publications@iwap.co.uk)  
I: [www.iwapublishing.com](http://www.iwapublishing.com)

Primera publicación 2016  
© 2016 IWA Publishing  
Publicación de la edición en español  
© 2019 IWA Publishing

Imprime: IWA Publishing

Con la excepción de su uso adecuado y justo con fines de investigación o estudio privado, o crítica o revisión, según lo permitido por la Ley de Derecho de Autor, Diseños y Patentes del Reino Unido (1998), ninguna parte de esta publicación puede reproducirse, almacenarse o transmitirse en cualquier forma o de cualquier manera, sin el permiso previo por escrito del editor o, en el caso de la reproducción fotográfica, de acuerdo con los términos de las licencias emitidas por la Agencia de Licencias de Copyright en el Reino Unido, o de acuerdo con los términos de las licencias emitidas por la organización de derechos de reproducción apropiada fuera del Reino Unido. Las consultas sobre reproducción fuera de los términos establecidos aquí deben enviarse a IWA Publishing a la dirección impresa arriba.

El editor no hace ninguna representación, expresa o implícita, con respecto a la exactitud de la información contenida en este libro y no puede aceptar ninguna responsabilidad legal o responsabilidad por errores u omisiones que puedan hacerse.

#### Descargo de responsabilidad

La información proporcionada y las opiniones dadas en esta publicación no son necesariamente las de IWA e IWA Publishing y no se deben tomar medidas sin una consideración independiente y asesoramiento profesional. IWA e IWA Publishing no aceptarán responsabilidad por cualquier pérdida o daño sufrido por cualquier persona que actúe o se abstenga de actuar sobre cualquier material contenido en esta publicación.

#### Catalogación de la Biblioteca Británica en Datos de Publicación (CIP)

Un registro de catálogo CIP para este libro está disponible en la Biblioteca Británica

#### Catalogación de la Biblioteca del Congreso en Datos de Publicación

Un registro de catálogo para este libro está disponible en la Biblioteca del Congreso

Cover design: Peter Stroo  
Graphic design: Hans Emeis

ISBN: 9781780409252 (eBook)

DOL: 10.2166/9781780409252

© 2019 los editores

CC BY-NC-ND 4.0



# Prefacio

El tratamiento o depuración de las aguas residuales es clave para la protección y el reuso del agua, tal y como ha sido claramente demostrado por el gran éxito que su aplicación ha tenido en diversos países alrededor del mundo. Durante la última década, la investigación científica ha hecho un vasto progreso para entender los complejos e interdisciplinarios conocimientos biológicos, bioquímicos, químicos y mecánicos involucrados. Puede concluirse que la aplicación global del conocimiento y la experiencia existente en la tecnología de tratamiento de aguas residuales será una piedra angular en el futuro manejo de los recursos hídricos, como ha quedado plasmado en las Metas de Desarrollo Estratégicas aceptadas por la ONU en Septiembre 2015.

Solamente la quinta parte de las aguas residuales generadas a nivel mundial son depuradas adecuadamente. Para alcanzar la meta de un manejo sostenible del agua se requerirían instalar cada día nuevas plantas depuradoras que beneficien a 600,000 personas. Estoy convencido que este libro contribuirá propia y significativamente a alcanzar esta ambiciosa meta.

En el futuro cercano, la mayoría de la población mundial vivirá en ciudades y en países con ingresos bajos y medios, lugares en los que el agua residual usualmente no se depura adecuadamente. Probablemente el factor más crítico para alcanzar las metas de un manejo sostenible de los recursos hídricos es la falta de profesionales calificados y bien entrenados, capaces de comprender los resultados científicos y transferirlos a la práctica. Así, es de primordial importancia que avances científicos y experiencias exitosas emanadas de las aplicaciones de la tecnología de tratamiento de aguas residuales se pongan al alcance del público en general a nivel mundial. Este es uno de los motivos que llevó al desarrollo del presente libro, el cual representa una contribución innovadora para ayudar a vencer este reto de desarrollo de capacidades. Definitivamente se espera que el libro contribuya a disminuir las diferencias existentes entre la ciencia y tecnología y su aplicación práctica.

La gran colección de autores y revisores representa un equipo interdisciplinario de expertos reconocidos globalmente. El libro, por lo tanto, hará una contribución mayor para el establecimiento de un lenguaje profesional común, mejorando la comunicación global entre los profesionales de las aguas residuales. Además, los autores han vinculado la descripción de la base científica de los procesos de tratamiento de aguas residuales con un curso en línea para el entrenamiento de estudiantes, investigadores,

ingenieros, técnicos de laboratorio y operadores de plantas de tratamiento, demostrando procedimientos experimentales comúnmente aceptados y su aplicación para la operación de plantas de tratamiento a escala de laboratorio, piloto y a escala real.

Desde la perspectiva de la IWA, este libro tiene también todo el potencial para mejorar el desarrollo de una nueva generación de investigadores y permitirles comunicarse a una escala global y más allá de su campo específico de conocimiento. Ambos aspectos se necesitan urgentemente para desarrollar soluciones adaptadas a condiciones específicas locales y para hacerlas disponibles globalmente para su implementación.

Durante un cierto tiempo ha existido una tendencia tal que la investigación científica y la práctica han crecido de manera separada una de la otra. Parcialmente porque implementación global del método de evaluación académica se enfoca primordialmente en el impacto de las publicaciones en el progreso de la investigación científica. Los resultados de la investigación aplicada con impacto en la práctica en el manejo de la calidad del agua aún no son valorados suficientemente ya que su impacto no se refleja en citas y referencias en revistas científicas indexadas. Este libro intenta contribuir a resolver este problema ya que tiene como objetivo mejorar el diálogo y la cooperación entre científicos y profesionales. Los científicos son motivados a lidiar con problemas prácticos con métodos científicos, mientras que los profesionales son motivados a entender los principios y fundamentos científicos de todos los procesos relevantes para la optimización de una planta depuradora.

Mientras que la operación de una planta de tratamiento o depuradora de aguas residuales se concentra en la calidad del efluente y minimización de costos, este libro incorpora el cambio de paradigma enfocado en la recuperación de materiales y energía del agua residual. En este aspecto el libro es también muy relevante para países desarrollados, considerando que el nuevo paradigma influirá fuertemente en el desarrollo futuro del manejo de las aguas residuales a nivel mundial.

Como presidente de la IWA quiero felicitar a los autores de este libro por este gran logro y también a la Fundación Bill and Melinda Gates y al Gobierno del Reino de Los Países Bajos por el apoyo económico otorgado.

**Prof. Dr. Helmut Kroiss**

Presidente de la Asociación Internacional del Agua (IWA)

# Sobre los editores de la versión en inglés

## Prof. Dr. Mark C.M. van Loosdrecht

es un científico reconocido por sus innovadoras contribuciones a los estudios relacionados con la reducción del consumo de energía y recursos en plantas de tratamiento de aguas residuales a través de sus patentes y exitosas tecnologías, entre ellas Sharon<sup>®</sup>, Anammox<sup>®</sup> y Nereda<sup>®</sup>. Su trabajo se enfoca al uso de cultivos microbiológicos dentro del campo de la ingeniería ambiental y de procesos, con un énfasis especial en biopelículas y remoción de nutrientes. Actualmente, es Profesor Titular y el Líder del Grupo de Tecnología Ambiental en la Universidad Tecnológica de Delft (TUDelft) en Países Bajos. Es miembro de la Real Academia Holandesa de Artes y Ciencias (KNAW, por sus siglas en holandés), de la Academia Holandesa de Ingeniería (ActI, por sus siglas en holandés) y de la Asociación Internacional del Agua (IWA, por sus siglas en inglés). Prof. van Loosdrecht ha ganado numerosos premios de prestigio mundial. Su interés por la investigación incluye sistemas de lodos aeróbicos granulares, almacenamiento microbiológico de polímeros, tratamiento de aguas residuales, gases y suelos, conversiones microbiológicas de compuestos inorgánicos, producción de químicos a partir de residuos, y modelación metabólica y matemática. Además de otros de sus logros, ha publicado más de 500 artículos científicos, supervisado más de 65 estudiantes de doctorado, y es Profesor Honorario en la Universidad de Queensland, en Australia. Actualmente es el Editor en Jefe de la revista científica *Water Research* y consejero de la casa editorial de la IWA (IWA Publishing).

## Prof. Dr. Per Halkjær Nielsen

es Profesor Titular en el Departamento de Química y Biociencias de la Universidad Aalborg, en Dinamarca, donde dirige el Centro Multidisciplinario de Comunidades Microbiológicas. También, es Científico Visitante en el Centro de Ingeniería y Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Nanyang, en Singapur. El grupo de investigación del Prof. Nielsen ha estado activo en el campo de la biotecnología ambiental por más de 25 años, enfocándose en estudios de ecología microbiana en plantas de tratamiento de aguas residuales, producción de bioenergía, bioremediación, biopelículas, infección de implantes y desarrollo de enfoques para la microbiología de sistemas basados en nuevas tecnologías de secuenciación. Ha dirigido el grupo de especialistas de la IWA de "Ecología Microbiana e Ingeniería del Agua" por 8 años (2005-2013) y es el Líder del BioCluster de la IWA. Es miembro de la Academia Danesa de Ciencias Técnicas (ATV) y de la IWA y ha recibido diversos premios de gran prestigio. Ha publicado más de 230 artículos científicos y supervisado más de 25 proyectos doctorales. Su principal interés científico es la ecología microbiana en la ingeniería del agua, particularmente relacionada con el tratamiento de aguas residuales donde ha desarrollado y aplicado numerosos métodos innovadores para estudiar microorganismos que aún no han podido ser cultivados, por ejemplo mediante el uso de tecnologías de secuenciación de última generación. Es el iniciador y responsable de la guía de campo MiDAS (de acceso gratuito) para la microbiología de las aguas residuales.

## Dr. Carlos M. Lopez-Vazquez

es Doctor en Biotecnología Ambiental graduado *cum laude* de la Universidad Tecnológica de Delft y del Instituto IHE Delft para la educación del Agua (2009). Obtuvo su grado de Ingeniero Civil y de Maestría en la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx) en 1999 y 2003, respectivamente. Actualmente es Profesor Asociado en Ingeniería Sanitaria en IHE Delft. Su área de trabajo, docencia e investigación abarca el área de tratamiento de aguas residuales con particular énfasis en el desarrollo de tecnologías más económicas, eficientes y con menor impacto ambiental para la recuperación de recursos tales como nutrientes, agua y energía a través de la generación de biogás. A nivel docente coordina e imparte diversos módulos, cursos y asignaturas en tratamiento de aguas residuales a nivel maestría y doctorado tanto presencial como a distancia, incluyendo los cursos en línea "Biological wastewater treatment: principles, modelling and design" y "Experimental Methods in Wastewater Treatment". Es coordinador y ha participado en diversos proyectos de educación, investigación y consultoría en Europa, Asia, Latinoamérica y el Caribe. Además, ha dirigido aproximadamente 60 proyectos y tesis de maestría y 10 de doctorado. Cuenta con diversas publicaciones científicas internacionales que incluyen la edición de 4 libros en temas relacionados con el tratamiento de aguas residuales, entre ellos "*Experimental Methods in Wastewater Treatment*", "*Applications of Activated Sludge Models*" y la versión en español del libro "*Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*".

## Prof. Dr. Damir Brdjanovic

es Profesor de Ingeniería Sanitaria en el Instituto IHE Delft para la Educación del Agua (en Delft, Países Bajos) y también Profesor habilitado en la Universidad Tecnológica de Delft en el Grupo de Biotecnología Ambiental del Profesor Mark van Loosdrecht. Su área de experiencia incluye el saneamiento para zonas marginadas y en condiciones de emergencia, manejo de lodos fecales, drenaje urbano, y el tratamiento de aguas residuales. Es pionero en las aplicaciones prácticas de modelos de tratamiento de aguas residuales en países en desarrollo. Con la subvención de la Fundación Bill and Melinda Gates (BMGF, por sus siglas en inglés) inventó el sistema "Shit Killer" para el manejo de excretas en situaciones de emergencia y el prestigioso inodoro inteligente eSOS<sup>®</sup>. Inició el desarrollo e implementación de enfoques didácticos innovadores y nuevos productos educativos (incluyendo de educación en línea) en el anterior UNESCO-IHE (hoy IHE Delft). En 2015, junto con la BMGF, fundó la Alianza Global de educación a distancia en Manejo de Lodo Fecal. Actualmente, dirige a un grupo académico de 10 miembros con más de 20 colaboradores post-doctorales y doctorantes. Además, ha graduado más de 100 estudiantes de Maestría. Prof. Brdjanovic cuenta con un récord de publicaciones destacado que lo hizo acreedor en 2018 al Premio de Publicaciones de la IWA. Entre otras publicaciones, es co-iniciador de la revista científica *Water, Sanitation and Hygiene for Development* de la IWA, y es el iniciador, autor y editor de cinco libros en los campos del tratamiento de aguas residuales y saneamiento. En 2015 se convirtió en socio de la International Water Association.

# Colaboradores

Carlos M. Lopez-Vazquez	IHE Delft Institute for Water Education, The Netherlands	1. 2.
Damir Brdjanovic	IHE Delft Institute for Water Education, The Netherlands	1. 2.
Eldon R. Rene	IHE Delft Institute for Water Education, The Netherlands	2.
Elena Ficara	Milan University of Technology, Italy	2.
Elena Torfs	Université Laval, Canada	6.
Eveline I.P. Volcke	Ghent University, Belgium	4.
George A. Ekama	University of Cape Town, South Africa	3.
Glen T. Daigger	University of Michigan, United States of America	6.
Gürkan Sin	Technical University of Denmark, Denmark	5.
Henri Spanjers	Delft University of Technology, The Netherlands	3.
Holger Daims	University of Vienna, Austria	8.
Ilse Y. Smets	Catholic University of Leuven, Belgium	6.
Imre Takács	Dynamita, France	6.
Ingmar Nopens	Ghent University, Belgium	6.
Jeppe L. Nielsen	Aalborg University, Denmark	7.
Jiří Wanner	University of Chemistry and Technology Prague, Czech Republic	7.
Juan A. Baeza	Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	5.
Kartik Chandran	Columbia University, United States of America	4.
Krist V. Gernaey	Technical University of Denmark, Denmark	5.
Laurens Welles	IHE Delft Institute for Water Education, The Netherlands	2.
Mads Albertsen	Aalborg University, Denmark	8.
Mari K.H. Winkler	University of Washington, United States of America	6.
Mark C.M. van Loosdrecht	Delft University of Technology, The Netherlands	1. 2. 4.
Mathieu Spérandio	Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France	3.
Morten S. Dueholm	Aalborg University, Denmark	8.
Nancy G. Love	University of Michigan, United States of America	2.
Per H. Nielsen	Aalborg University, Denmark	1. 7. 8.
Peter A. Vanrolleghem	Université Laval, Canada	3. 4. 6.
Piet N.L. Lens	IHE Delft Institute for Water Education, The Netherlands	2.
Rasmus H. Kirkegaard	Aalborg University, Denmark	8.
Robert J. Seviour	La Trobe University, Australia	7.
Sebastiaan C.F. Meijer	Yuniko BV, The Netherlands	5.
Sophie Balemans	Ghent University, Belgium	6.
Søren M. Karst	Aalborg University, Denmark	8.
Sylvie Gillot	IRSTEA, France	4.
Tessa P.H. van den Brand	KWR Watercycle Research Institute, The Netherlands	2.
Tommaso Lotti	Milan University of Technology, Italy	2.
Yves Comeau	École Polytechnique de Montréal, Canada	2.

Author  
Revisor

# Sobre los editores de la versión en español

## Carlos M. López Vázquez

es Doctor en Biotecnología Ambiental graduado con *cum laude* de la Universidad Tecnológica de Delft y del Instituto IHE Delft para la educación del Agua (2009). Obtuvo su grado de Ingeniero Civil y de Maestría en la Universidad Autónoma del Estado de México en 1999 y 2003, respectivamente. Actualmente es Profesor Asociado en Ingeniería Sanitaria en IHE Delft. Su área de trabajo, docencia e investigación abarca el área de tratamiento de aguas residuales con particular énfasis en el desarrollo de tecnologías más económicas, eficientes y con menor impacto ambiental para la recuperación de recursos tales como nutrientes, agua y energía a través de la generación de biogás. A nivel docente coordina e imparte diversos módulos, cursos y asignaturas en tratamiento de aguas residuales a nivel maestría y doctorado tanto presencial como a distancia, incluyendo los cursos en líneas "Biological wastewater treatment: principles, modelling and design" y "Experimental Methods in Wastewater Treatment". Es coordinador y ha participado en diversos proyectos de educación, investigación y consultoría en Europa, Asia, Latinoamérica y el Caribe. Además, ha dirigido aproximadamente 60 proyectos y tesis de maestría y 10 de doctorado. Cuenta con diversas publicaciones científicas internacionales que incluyen 4 libros en temas relacionados con el tratamiento de aguas residuales, entre ellos "Experimental Methods in Wastewater Treatment", "Applications of Activated Sludge Models" y la versión en español del libro "Biological wastewater treatment: principles, modelling and design".

## Carlos Luis Menéndez Gutiérrez

es Doctor en Ciencias Técnicas graduado en el Instituto Superior de Tecnología Química de Praga (1986). Obtuvo el título de Ingeniero Químico (Especialidad Bioquímica) en la Universidad de La Habana (1969) y Máster en Ingeniería Sanitaria en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (1971). En la actualidad es Profesor Titular y Consultante de la Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría (CUJAE). Su área de trabajo, tanto en docencia como investigación está relacionada fundamentalmente con el tratamiento biológico de aguas residuales. Coordina e imparte asignaturas a nivel de maestría y doctorado. Es coordinador del doctorado en Ciencias Técnicas en su Dimensión Ambiental. Tiene publicaciones en revistas científicas referencias y es autor de 3 libros de texto y 5 monografías, todos en el campo del tratamiento de residuales.

## Cheikh Fall

Dr. Fall es especialista en Agua y Saneamiento y cuenta con más de 20 años de experiencia en procesos de tratamiento de agua residual y de potabilización, Modelación de plantas depuradoras, Evaluación ambiental y Control de la contaminación. Fue graduado como Ingeniero Mecánico de la Escuela Politécnica de Thies (Senegal). Posteriormente cursó la maestría y el doctorado en Ingeniería Química en la Politécnica de Montreal (Canadá). Trabajó inicialmente en Dessau, empresa consultora en Quebec, Canadá, donde realizó varios estudios de evaluación ambiental o de remediación de sitios contaminados. Desde hace varios años, es Profesor-investigador Titular en la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), siendo miembro (líder hasta 2012) del cuerpo académico "Tratamiento de aguas y control de contaminación" del IITCA (Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua; anteriormente CIRA, Facultad de Ingeniería). Entre otros temas, ha liderado varios proyectos de investigación en modelación y simulación de procesos de lodo activado (escalas de planta y laboratorio), uno de ellos en colaboración con IHE-Delft. Dr. Fall es autor de varias publicaciones internacionales y ha dirigido los proyectos de investigación de cerca de setenta estudiantes (siendo aproximadamente un tercio de ellos de nivel doctorado). Es miembro nivel II del Sistema Nacional de Investigadores (Mexico). En 2009 fue reconocido con el Premio Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Mexico.

# Sobre el libro y el curso en línea

En los últimos 20 años, los conocimientos sobre el tratamiento de aguas residuales han avanzado extensamente y trasladado de enfoques meramente empíricos a enfoques basados en fundamentos y principios que abarcan la química, microbiología, e ingeniería física y de bioprocesos, involucrando con frecuencia trabajo y técnicas de laboratorio experimental. Varios de estos métodos y técnicas experimentales han madurado a tal grado que han sido aceptados como herramientas confiables en la práctica e investigación de tratamiento de aguas residuales. Para los profesionales en el sector, especialmente para una nueva generación de jóvenes científicos e ingenieros que ingresan a la profesión del tratamiento de aguas residuales, la cantidad, complejidad y diversidad de estos nuevos desarrollos puede ser abrumadora, particularmente en países en vías de desarrollo donde existe un acceso limitado a cursos avanzados de laboratorio en tratamiento de aguas residuales. Además, la información en métodos experimentales innovadores está dispersa en la literatura científica y solamente parcialmente disponible en ciertos libros de texto o guías. Este libro busca solventar estas deficiencias. Ensambla e integra los métodos experimentales innovadores desarrollados por grupos de investigación y profesionales alrededor del mundo y empleados ampliamente en la práctica e investigación del tratamiento de las aguas residuales.

El libro *Métodos Experimentales para el Tratamiento de Aguas Residuales* forma parte de la curricula de la especialización en Ingeniería Sanitaria en el Instituto IHE Delft para la Educación del Agua y, como tal, puede ser utilizado junto con las video conferencias de los métodos y enfoques desarrollados por los autores, incluyendo guías de buenas prácticas. El libro está escrito para estudiantes de pregrado, postgrado, investigadores, personal de laboratorio, operadores de plantas, consultores, y otros profesionales del sector. Y se espera que contribuya a fortalecer los procesos formativos no solamente de las universidades que han contribuido a la edición de esta versión en español (Universidad Autónoma del Estado de México –UAEMex- y Universidad Tecnológica de La Habana –CUJAE-) sino también a los programas de otras universidades e instituciones de educación superior de habla hispana.

La idea de escribir este libro y el curso en línea fue concebida en 2009 cuando el entonces UNESCO-IHE acordó utilizar fondos económicos programáticos del Ministerio de Relaciones Exteriores del Reino de Los Países Bajos para desarrollar métodos y productos de aprendizaje innovadores. Sin embargo, hasta el 2011 la Fundación Bill and Melinda Gates (BMGF) otorgó fondos adicionales para

materializar la idea original. El esquema conceptual del libro y curso en línea fue acordado durante el Congreso y Exhibición Mundial del Agua de la IWA en Septiembre 2010 y detallado en el evento “Activated Sludge – 100 Years and counting” de la IWA en Essen en Septiembre 2010. En esa ocasión fue cuando se consideró invitar revisores reconocidos a nivel mundial en el área que proporcionarían una retroalimentación crítica, adicionalmente al nivel otorgado por el apreciable grupo de expertos que habían escrito los capítulos del libro. Además de proporcionar los capítulos del libro, los autores prepararon presentaciones adicionales, tutoriales de ejercicios y desarrollaron escenarios y narraciones para grabar los videos de las clases y la ejecución de los procedimientos experimentales. La casa editorial de la IWA aceptó publicar y comercializar el libro y el curso en línea. También se acordó que las versiones digitales de su original en inglés y traducciones a otros idiomas (incluyendo esta versión en español) estén disponibles de manera gratuita para fomentar su difusión. El curso en línea es ofrecido por IHE Delft (por favor, consulte la página del instituto para mayores detalles).

Un gran número de personas merecen un agradecimiento y reconocimiento especial porque su apoyo ha sido crucial para alcanzar este logro, entre ellos: Dr. Roshan Shrestha, Dr. Doulaye Koné, Dr. Frank Rijsberman y Dr. Brian Arbogast (BMGF), y Dr. Wim Douven y Jetze Heun (IHE Delft). La versión original en inglés del libro fue editada por Peter Stroo, Hans Emeis, Claire Taylor, Michelle Jones, y Maggie Smith. Mientras que se aprecia profundamente el apoyo brindado por el Dr. José María Ameneiros Martínez, Julio Dustet, Jaime Dueñas y Aylet Vega Aguilar (CUJAE, Cuba) para traducir, editar y revisar esta versión en español. Así mismo, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), a la Secretaría de Estudios Avanzados y a la Facultad de Ingeniería de la UAEMex por el apoyo otorgado al Prof. Cheikh Fall para participar en esta publicación. Indudablemente, todo el crédito por el contenido es para todos los autores y revisores de la versión original en inglés. Sobretodo, para todos los colaboradores que permitieron usar en este libro y en el curso en línea sus datos, imágenes y fotografías.

Finalmente, los editores de ambas ediciones esperamos que este libro, el material y los videos que lo acompañan ([www.experimentalmethods.org](http://www.experimentalmethods.org)) sean útiles en su investigación o trabajo práctico, ya sea en el aula, laboratorio, planta piloto o en una planta a escala real.

Los Editores

# Tabla de contenido

## 1. INTRODUCCIÓN

Mark C.M. van Loosdrecht, Per H. Nielsen, Carlos M. Lopez-Vazquez y Damir Brdjanovic (aut.)

## 2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE LODOS ACTIVADOS

Carlos M. Lopez-Vazquez, Laurens Welles, Tommaso Lotti, Elena Ficara, Eldon R. Rene, Tessa P.H. van den Brand, Damir Brdjanovic y Mark C.M. van Loosdrecht (aut.)  
Yves Comeau, Piet N.L. Lens y Nancy G. Love (rev.)

### 2.1 INTRODUCCIÓN

### 2.2 REMOCIÓN BIOLÓGICA AUMENTADA DE FÓSFORO

- 2.2.1 Descripción del proceso 9
- 2.2.2 Montaje experimental 11
  - 2.2.2.1 Reactores 11
  - 2.2.2.2 Toma de muestras de lodo activado 17
  - 2.2.2.3 Preparación de la muestra de lodo activado 17
  - 2.2.2.4 Substrato 19
  - 2.2.2.5 Procedimientos analíticos 20
  - 2.2.2.6 Parámetros de interés 24
- 2.2.3 Ensayos de actividad EBPR en batch: preparación 24
  - 2.2.3.1 Aparatos 24
  - 2.2.3.2 Materiales 24
  - 2.2.3.3 Preparación de medios y soluciones de trabajo 26
  - 2.2.3.4 Preparación de materiales 27
  - 2.2.3.5 Preparación del lodo activado 30
- 2.2.4 Ensayos de actividad EBPR en batch: implementación 32
  - 2.2.4.1 Ensayos anaerobios de actividad EBPR en batch 32
  - 2.2.4.2 Ensayos anóxicos de actividad EBPR en batch 36
  - 2.2.4.3 Ensayos aerobios de actividad EBPR en batch 37
- 2.2.5 Análisis de datos 39
  - 2.2.5.1 Estimación de parámetros estequiométricos 39
  - 2.2.5.2 Estimación de parámetros cinéticos 44
- 2.2.6 Discusión e interpretación de datos 45
  - 2.2.6.1 Ensayos de actividad anaerobia en batch 45
  - 2.2.6.2 Ensayos de actividad aerobia en batch 48
  - 2.2.6.3 Ensayos de actividad anóxica en batch 49
- 2.2.7 Ejemplo 50
  - 2.2.7.1 Descripción 50
  - 2.2.7.2 Análisis de datos 51
- 2.2.8 Consideraciones adicionales 54
  - 2.2.8.1 Presencia de GAOs en sistemas EBPR 54
  - 2.2.8.2 Efecto de la fuente de carbono 55
  - 2.2.8.3 Efecto de la temperatura 55
  - 2.2.8.4 Efecto del pH 55
  - 2.2.8.5 Desnitrificación por cultivos EBPR 56
  - 2.2.8.6 Exceso y déficit de compuestos intracelulares 56
  - 2.2.8.7 Aireación excesiva 56
  - 2.2.8.8 Déficit de iones esenciales 57
  - 2.2.8.9 Toxicidad/inhibición 57

### 2.3 REDUCCIÓN BIOLÓGICA DE SULFATOS

- 2.3.1 Descripción del proceso 58
- 2.3.2 Especiación del sulfuro 60
- 2.3.3 Efectos de las condiciones de operación y ambientales sobre las SRB 61
  - 2.3.3.1 Fuente de carbono 61
  - 2.3.3.2 Relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 63
  - 2.3.3.3 Temperatura 63
  - 2.3.3.4 pH 63
  - 2.3.3.5 Oxígeno 64

- 2.3.4 Montaje experimental 65
    - 2.3.4.1 Estimación de tasas volumétricas y específicas 65
    - 2.3.4.2 El reactor 65
    - 2.3.4.3 Mezclado 66
      - 2.3.4.4 Control de pH 66
      - 2.3.4.5 Control de temperatura 66
    - 2.3.4.6 Puertos de muestreo y dosificación 66
    - 2.3.4.7 Toma de muestras 67
      - 2.3.4.8 Medios 67
  - 2.3.5 Procedimientos analíticos 68
    - 2.3.5.1 DQO<sub>orgánica</sub> y DQO<sub>total</sub> 68
    - 2.3.5.2 Sulfato 69
    - 2.3.5.3 Sulfuro 69
  - 2.3.6 Ensayos de actividad de SRB en batch: preparación 70
    - 2.3.6.1 Equipos 70
    - 2.3.6.2 Materiales 70
      - 2.3.6.3 Medios y soluciones de trabajo 71
    - 2.3.6.4 Preparación de material 72
    - 2.3.6.5 Preparación del licor mezclado 72
    - 2.3.6.6 Recolección de muestras y tratamiento 74
  - 2.3.7 Ensayos de actividad de SRB en batch: ejecución 74
  - 2.3.8 Análisis de datos 76
    - 2.3.8.1 Balances de masa y cálculos 76
    - 2.3.8.2 Discusión e interpretación de datos 76
  - 2.3.9 Ejemplo 77
  - 2.3.10 Recomendaciones prácticas 79
- ### 2.4 REMOCIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO
- 2.4.1 Descripción del proceso 80
    - 2.4.1.1 Nitrificación 81
      - 2.4.1.2 Desnitrificación 82
        - 2.4.1.3 Oxidación anaerobia del amonio (Anammox) 83
  - 2.4.2 Alternativas para el seguimiento de los procesos 84
    - 2.4.2.1 Monitoreo químico 84
    - 2.4.2.2 Monitoreo por titulación 85
    - 2.4.2.3 Monitoreo manométrico 86
  - 2.4.3 Montaje experimental 86
    - 2.4.3.1 Reactores 86
      - 2.4.3.2 Instrumentación para ensayos de titulación 87
      - 2.4.3.3 Instrumentación para ensayos manométricos 88
    - 2.4.3.4 Recolección de la muestra de lodo activado 89
      - 2.4.3.5 Preparación de la muestra de lodo activado 90
    - 2.4.3.6 Substrato 91
      - 2.4.3.7 Procedimientos analíticos 91
      - 2.4.3.8 Parámetros de interés 92
      - 2.4.3.9 Tipos de ensayos en batch 94
  - 2.4.4 Ensayos de actividad de nitrificación en batch: preparación 94
    - 2.4.4.1 Equipo requerido 94
    - 2.4.4.2 Materiales 95
      - 2.4.4.3 Preparación de medios 95
  - 2.4.5 Ensayos de actividad de nitrificación en batch: ejecución 96
  - 2.4.6 Ensayos de actividad de desnitrificación en batch: preparación 101
    - 2.4.6.1 Equipo 102
    - 2.4.6.2 Materiales 102
      - 2.4.6.3 Soluciones de trabajo 102
      - 2.4.6.4 Materiales 102
  - 2.4.7 Ensayos de actividad de desnitrificación en batch: ejecución 103
  - 2.4.8 Ensayos de actividad anammox en batch: preparación 109
    - 2.4.8.1 Equipo 109



2.4.8.2 Materiales	110	3.4.1.2 General	165
2.4.8.3 Soluciones de trabajo	110	3.4.1.3 Ejecución del ensayo	165
2.4.8.4 Preparación de materiales	111	3.4.1.4 Procesamiento de datos	166
2.4.9 Ensayos de actividad anammox en batch: ejecución	111	3.4.1.5 Recomendaciones	166
2.4.10 Ejemplos	114	3.4.2 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	167
2.4.10.1 Ensayo de actividad de nitrificación en batch	114	3.4.2.1 Propósito	167
2.4.10.2 Ensayo de actividad de desnitrificación en batch	115	3.4.2.2 General	167
2.4.10.3 Ensayo de actividad anammox en batch	117	3.4.2.3 Ejecución del ensayo	167
2.4.11 Consideraciones adicionales	119	3.4.3 Demanda bioquímica de oxígeno a corto plazo (BOD <sub>5</sub> )	172
2.4.11.1 Presencia de otros organismos	119	3.4.3.1 Ejecución del ensayo	173
2.4.11.2 Carencia de micro y macro-nutrientes esenciales	120	3.4.3.2 Cálculos	175
2.4.11.3 Efectos tóxicos o inhibidores	120	3.4.4 Toxicidad e inhibición	176
2.4.11.4 Efectos de la fuente de carbon sobre la desnitrificación	121	3.4.4.1 Propósito	176
<b>2.5 REMOCIÓN DE MATERIA ORGÁNICA</b>	<b>122</b>	3.4.4.2 Ejecución del ensayo	176
2.5.1 Descripción del proceso	122	3.4.4.3 Cálculos	176
2.5.2 Montaje experimental	124	3.4.4.4 Compuestos tóxicos biodegradables	178
2.5.2.1 Reactores	124	3.4.5 Fraccionamiento del agua residual	179
2.5.2.2 Recolección de muestras de lodo activado	124	3.4.5.1 Substrato fácilmente biodegradable (S <sub>B</sub> )	182
2.5.2.3 Preparación de la muestra de lodo activado	124	3.4.5.2 Substrato lentamente biodegradable (X <sub>C5</sub> )	183
2.5.2.4 Medio	125	3.4.5.3 Biomasa heterótrofa (X <sub>HO</sub> )	184
2.5.2.5 Pruebas analíticas	125	3.4.5.4 Biomasa autótrofa (nitrificante) (X <sub>ANO</sub> )	184
2.5.2.6 Parámetros de interés	125	3.4.5.5 Amonio (S <sub>NH4</sub> )	184
2.5.3 Ensayos de actividad aerobia de materia orgánica: preparativos	126	3.4.5.6 Fracciones de nitrógeno orgánico (X <sub>C8,N</sub> and S <sub>B,N</sub> )	185
2.5.3.1 Equipos	126	<b>3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA</b>	<b>185</b>
2.5.3.2 Materiales	127	3.5.1 Sólidos suspendidos volátiles	185
2.5.3.3 Soluciones de trabajo	127	3.5.2 Actividad metanogénica específica (AME)	185
2.5.3.4 Preparación de materiales	128	3.5.2.1 Propósito	185
2.5.3.5 Preparación del lodo activado	129	3.5.2.2 General	186
2.5.4 Ensayos de actividad aerobia de materia orgánica en batch: ejecución	129	3.5.2.3 Ejecución del ensayo	186
2.5.5 Análisis de datos	130	3.5.2.4 Procesamiento de los datos	187
2.5.6 Ejemplo	131	3.5.3 Actividad específica aerobia y anóxica de la biomasa	188
2.5.6.1 Descripción	131	3.5.3.1 Velocidad específica máxima de nitrificación (SAUR)	188
2.5.6.2 Análisis de datos	131	3.5.3.2 Velocidad específica máxima de respiración aerobia heterótrofa (SOUR)	190
2.5.7 Consideraciones adicionales y recomendaciones	133	3.5.3.3 Velocidad específica máxima de desnitrificación (SNUR)	190
2.5.7.1 Almacenamiento y crecimiento simultáneo de microorganismos	133		
2.5.7.2 Insuficiencia de nutrientes	133		
2.5.7.3 Toxicidad o inhibición	134		
<b>3. RESPIROMETRÍA</b>	<b>145</b>	<b>4. ENSAYOS DE EMISIÓN DE GASES</b>	<b>195</b>
Henry Spanjers y Peter A. Vanrolleghem (aut.)		Kartik Chandran, Eveline I.P. Volcke y Mark C.M. van Loosdrecht (aut.)	
George A. Ekama y M. Spérandio (rev.)		Peter A. Vanrolleghem y Sylvie Guillot (rev.)	
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>145</b>	<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>195</b>
3.1.1 Aspectos básicos de la respiración	146	<b>4.2 SELECCIÓN DE LA ESTRATEGIA DE MUESTREO</b>	<b>196</b>
3.1.2 Aspectos básicos de la respirometría	148	4.2.1 Rendimiento de la instalación	196
<b>3.2 METODOLOGÍA GENERAL DE LA RESPIROMETRÍA</b>	<b>148</b>	4.2.2 Variables estacionales de las emisiones	196
3.2.1 Fundamentos de la metodología respirométrica	148	4.2.3 Objetivo del muestreo	197
3.2.2 Principios generales: más allá del oxígeno	149	<b>4.3 EVALUACIÓN DE PLANTA Y RECOLECCIÓN DE DATOS</b>	<b>197</b>
3.2.2.1 Principios de respirómetros basados en mediciones realizadas en la fase líquida	149	4.3.1 Preparación de la campaña de muestreo	197
3.2.2.2 Principios de respirómetros basados en mediciones realizadas en la fase gaseosa	151	4.3.2 Identificación de la muestra y hoja de datos	199
<b>3.3 EQUIPOS</b>	<b>154</b>	4.3.3 Factores que pueden limitar la validez de los resultados	199
3.3.1 Equipos para respirometría anaerobia	154	4.3.4 Asesoramiento práctico para las mediciones analíticas	200
3.3.1.1 Composición del biogas	154	4.3.5 Metodología general para el muestreo	200
3.3.1.2 Medición del flujo de gas	155	4.3.6 Muestreo en el marco de las mediciones de las emisiones de gases	202
3.3.2 Equipos para respirometría aerobia y anóxica	156	4.3.7 Protocolo de pruebas y mediciones	204
3.3.2.1 Reactor	157	<b>4.4 MEDICIÓN DE LAS EMISIONES</b>	<b>204</b>
3.3.2.2 Medidor	157	<b>4.5 MEDICIÓN DE N<sub>2</sub>O EN TANQUES ABIERTOS</b>	<b>206</b>
3.3.2.3 Aplicación práctica	157	4.5.1 Protocolo para medir el flujo superficial de N <sub>2</sub> O	207
<b>3.4 CARACTERIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES</b>	<b>164</b>	4.5.1.1 Equipos, materiales y suministros	207
3.4.1 Potencial de biometano (PBM)	164	4.5.1.2 Procedimiento experimental	208
3.4.1.1 Propósito	164	4.5.1.3 Métodos de muestreo de emisiones de gases de nitrógeno de efecto invernadero	209
		4.5.1.4 Medición directa del contenido de N <sub>2</sub> O en la fase líquida	211
		<b>4.6 MEDICIÓN DE FLUJO DE GASES EMITIDOS EN TANQUES ABIERTOS</b>	<b>211</b>
		4.6.1 Protocolo para zona aerobia o aireada	212



4.6.2 Protocolo para zonas no aireadas	212		
<b>4.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> EN EL MEDIO ACUOSO</b>	<b>213</b>		
4.7.1 Protocolo para la medición de N <sub>2</sub> O disuelto usando electrodos polarográficos	213		
4.7.1.1 Equipo	213		
4.7.1.2 Procedimiento experimental	213		
4.7.2 Protocolo para la medición de gases disueltos mediante el empleo de cromatografía gaseosa	214		
4.7.3 Protocolo de medición de gases disueltos mediante el método de salinización	215		
4.7.3.1 Equipo	215		
4.7.3.2 Procedimiento de muestreo	215		
4.7.3.3 Procedimiento de medición	215		
4.7.3.4 Cálculos	216		
4.7.4 Protocolo de medición de gases disueltos por el método de evacuación	216		
4.7.4.1 Principio de funcionamiento	216		
4.7.4.2 Equipo	218		
4.7.4.3 Calibración del ensayo en batch	219		
4.7.4.4 Precisión de las mediciones	219		
4.7.4.5 Cálculo de la velocidad de formación de N <sub>2</sub> O en el dispositivo de evacuación	219		
<b>4.8 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS</b>	<b>220</b>		
4.8.1 Determinación de flujos	220		
4.8.2 Determinación de las fracciones de emisión agregadas	220		
4.8.3 Cálculo de los factores de emisión	221		
<b>5. MANEJO DE DATOS Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS</b>	<b>223</b>		
Gürkan Sin y Krist V. Gernaey (aut.)			
Sebastiaan C.F. Meijer y Juan A. Baeza (rev.)			
<b>5.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>223</b>		
<b>5.2 TEORÍA Y MÉTODOS</b>	<b>224</b>		
5.2.1 Manejo y validación de datos	224		
5.2.1.1 Análisis sistemático de datos para procesos biológicos	224		
5.2.1.2 Análisis del grado de reducción	225		
5.2.1.3 Verificación de la consistencia de los datos experimentales	226		
5.2.2 Estimación de parámetros	227		
5.2.2.1 El método manual de prueba o tanteo y error	227		
5.2.2.2 Métodos estadísticos formales	228		
5.2.3 Análisis de incertidumbre	231		
5.2.3.1 Propagación de errores lineales	231		
5.2.3.2 El método de Monte Carlo	232		
5.2.4 Análisis de sensibilidad local y análisis de identificación	232		
5.2.4.1 Análisis de sensibilidad local	232		
5.2.4.2 Análisis de identificación utilizando el índice de colinealidad	233		
<b>5.3 METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO DE TRABAJO</b>	<b>234</b>		
5.3.1 Comprobación de la consistencia de los datos utilizando un balance elemental y un análisis de grado de reducción	234		
5.3.2 Flujo de trabajo para la estimación de los parámetros para el método de mínimos cuadrados no lineales	235		
5.3.3 Procedimiento de trabajo para la estimación de parámetros por el método bootstrap	235		
5.3.4 Procedimiento de trabajo para el análisis de sensibilidad e identificación local	236		
5.3.5 Análisis de incertidumbre utilizando el método de Monte Carlo y la propagación lineal de errores	236		
<b>5.4 EJEMPLOS ADICIONALES</b>	<b>237</b>		
<b>5.5 CONSIDERACIONES ADICIONALES</b>	<b>257</b>		
5.5.1 Consejos prácticos para la estimación de parámetros	257		
5.5.2 Consejos prácticos para el análisis de incertidumbre	257		
<b>6. PRUEBAS DE SEDIMENTACIÓN</b>	<b>259</b>		
Elena Torfs, Ingmar Nopens, Mari K.H. Winkler, Peter A. Vanrolleghem, Sophie Balemans e Ilse Y. Smets (aut.)			
Glenn T. Daigger e Imre Takács (rev.)			
<b>6.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>259</b>		
<b>6.2 MEDICIÓN DE LA SEDIMENTACIÓN DE LODOS EN SEDIMENTADORES SECUNDARIOS</b>	<b>261</b>		
6.2.1 Parámetros de sedimentabilidad del lodo	261		
6.2.1.1 Objetivo y aplicación	261		
6.2.1.2 Equipo	261		
6.2.1.3 Índice volumétrico lodo (IVL)	261		
6.2.1.4 Índice volumétrico lodo diluido (IVLD)	262		
6.2.1.5 Índice volumétrico específico agitado (IVEA <sub>3,5</sub> )	262		
6.2.2 Ensayo de curvas de sedimentación y velocidad de sedimentación retardada	263		
6.2.2.1 Objetivo y aplicación	263		
6.2.2.2 Equipo	263		
6.2.2.3 Procedimiento experimental	263		
6.2.2.4 Interpretación de la curva de sedimentación en batch	265		
6.2.2.5 Medición de la velocidad de sedimentación retardada	266		
6.2.3 Relación v <sub>15</sub> -X relation	266		
6.2.3.1 Objetivo y aplicación	266		
6.2.3.2 Equipo	266		
6.2.3.3 Procedimiento experimental	267		
6.2.3.4 Determinación de los parámetros de la sedimentación zonal	268		
6.2.3.5 Calibración mediante relaciones empíricas basadas en los parámetros PSL	269		
6.2.4 Recomendaciones para realizar pruebas de sedimentación en batch	270		
6.2.4.1 Forma y tamaño del recipiente	270		
6.2.4.2 Transporte y manejo de la muestra	270		
6.2.4.3 Intervalo de concentración	270		
6.2.4.4 Frecuencia de medición	270		
6.2.5 Avances recientes en las pruebas de sedimentación en batch	271		
<b>6.3 MEDICIÓN DEL ESTADO DE FLOCULACIÓN DEL LODO ACTIVADO</b>	<b>271</b>		
6.3.1 Prueba de SSD/SSF	271		
6.3.1.1 Objetivo y aplicación	271		
6.3.1.2 Equipo	272		
6.3.1.3 Prueba SSD	272		
6.3.1.4 Prueba SSF	273		
6.3.1.5 Interpretación de los resultados de una prueba SSD/SSF	274		
6.3.2 Recomendaciones	275		
6.3.2.1 Condiciones para la floculación	275		
6.3.2.2 Influencia de la temperatura	275		
6.3.2.3 Muestreo del sobrenadante	275		
6.3.3 Avances en la medición del estado de floculación	275		
<b>6.4 MEDICIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE SEDIMENTACIÓN DE LODOS GRANULARES</b>	<b>276</b>		
6.4.1 Objetivo y aplicación	276		
6.4.2 Equipo	277		
6.4.3 Mediciones de densidad	277		
6.4.4 Determinación del tamaño de la biomasa granular	278		
6.4.4.1 Tamizado	278		
6.4.4.2 Analizador de imágenes	279		
6.4.5 Cálculo de la velocidad de sedimentación de los gránulos	279		
6.4.6 Recomendaciones	281		
6.4.6.1 Validación de resultados	281		
6.4.6.2 Aplicación para lodos floculentos	281		
<b>6.5 MEDICIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN EN TSP</b>	<b>281</b>		
6.5.1 Introducción	281		
6.5.2 Principio general	281		
6.5.3 Muestreo y preservación de las muestras	282		
6.5.4 Equipos	283		
6.5.5 Protocolo analítico	283		
6.5.6 Cálculos y presentación de resultados	285		
6.5.6.1 Comprobación del balance de masas	285		
6.5.6.2 Cálculo de la distribución de la velocidad de sedimentación	285		
6.5.6.3 Recomendaciones	285		

## 7. MICROSCOPIA

Jeppe L. Nielsen, Robert J. Seviour y Per H. Nielsen (aut.)  
Jiri Wanner (rev.)

### 7.1 INTRODUCCIÓN

#### 7.2 EL MICROSCOPIO DE LUZ

- 7.2.1 Aplicaciones estándar de la microscopía óptica
- 7.2.2 Objetivos de bajo poder
- 7.2.3 Objetivos de alto poder
- 7.2.4 Objetivo de inmersión
- 7.2.5 Consideraciones importantes
- 7.2.6 Iluminación de campo brillante y campo oscuro
- 7.2.7 Microscopía fluorescente
- 7.2.8. Microscopía confocal de escaneo láser

#### 7.3 INVESTIGACIONES MORFOLÓGICAS

- 7.3.1 Identificación microscópica de organismos filamentosos
- 7.3.2 Identificación de protozoos y metazoos

#### 7.4 EXAMEN MICROSCÓPICO DE MUESTRAS DE LODO ACTIVADO

- 7.4.1 Montaje de la muestra de lodo activado
- 7.4.2 Tinción de Gram
  - 7.4.2.1 Reagentes y soluciones para tinción Gram
  - 7.4.2.2 Procedimientos
- 7.4.3 Tinción Neisser
  - 7.4.3.1 Reagentes y soluciones para tinción Neisser
  - 7.4.3.2 Procedimiento
- 7.4.4 Tinción DAPI
  - 7.4.4.1 Reactivos y soluciones para la tinción DAPI
  - 7.4.4.2 Procedimiento
- 7.4.5 Tinción CTC
  - 7.4.5.1 Reactivos y soluciones para la tinción CTC
  - 7.4.5.2 Procedimiento

#### 7.5 HIBRIDIZACIÓN FLUORESCENTE *in situ*

- 7.5.1 Reactivos y soluciones para FISH
- 7.5.2 Procedimiento

#### 7.6 TÉCNICAS COMBINADAS DE TINCIÓN

- 7.6.1 Tinción FISH-DAPI
  - 7.6.1.1 Reactivos y soluciones para la tinción DAPI
  - 7.6.1.2 Procedimiento
- 7.6.2 Tinción FISH-PHA
  - 7.6.2.1 Reactivos y soluciones para la tinción PHA
  - 7.6.2.2 Procedimiento

## 8. MÉTODOS MOLECULARES

Søren M. Karst, Mads Albertsen, Rasmus H. Kirkegaard, Morten S. Dueholm y Per H. Nielsen (aut.)  
Holger Daims (rev.)

### 8.1 INTRODUCCIÓN

#### 8.2 EXTRACCIÓN DE ADN

- 8.2.1 Consideraciones generales
- 8.2.2 Muestreo
- 8.2.3 Extracción de ADN
  - 8.2.3.1 Lisis celular
  - 8.2.3.2 Inhibición de la actividad de las nucleasas y remoción de proteínas
  - 8.2.3.3 Purificación
  - 8.2.3.4 Elución y almacenamiento
- 8.2.4 Cuantificación e integridad
- 8.2.5 Extracción optimizada de ADN en sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados
  - 8.2.5.1 Materiales
  - 8.2.5.2 Extracción de ADN

#### 8.3 PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL (qPCR)

- 8.3.1 Consideraciones generales
- 8.3.2 Materiales

289

289

290

291

291

292

292

292

292

293

293

295

296

297

298

299

299

300

300

301

302

302

302

302

303

303

303

303

304

305

306

308

309

309

309

310

310

310

313

313

314

314

314

314

315

315

315

315

315

316

316

316

316

316

317

318

318

321

8.3.3 Métodos

8.3.4 Procesamiento de datos

8.3.5 Resultados e interpretación de datos

8.3.6 Solución de problemas

8.3.7 Ejemplo

8.3.7.1 Muestras

8.3.7.2 Preparación de la reacción de qPCR

8.3.7.3 Resultados

#### 8.4 SECUENCIACIÓN DEL AMPLICON

8.4.1 Consideraciones generales

8.4.2 El gen 16S rRNA como gen marcador filogenético

8.4.3 Amplificación por PCR

8.4.3.1 Reacción PCR

8.4.3.2 Sesgos de la PCR

8.4.3.3 Selección del *primer*

8.4.4 Secuenciación del ADN

8.4.4.1 Secuenciación del ADN

8.4.4.2 Alcance de la secuenciación

8.4.5 Procesamiento bioinformático

8.4.5.1 Software disponibles

8.4.5.2 Datos generados

8.4.5.3 Puntuaciones de calidad y filtrado

8.4.5.4 Fusionando lecturas pareadas

8.4.5.5 Ensamblaje de las OTU

8.4.5.6 Detección y supresión de quimeras

8.4.5.7 Clasificación taxonómica

8.4.5.8 La tabla OTUs

8.4.6 Análisis de datos

8.4.6.1 Definiendo el objetivo del análisis de datos

8.4.6.2 Validación de los datos y chequeo de sensatez

8.4.6.3 Comunidades o especies individuales?

8.4.6.4 Identificación de especies centrales y transitorias

8.4.6.5 Análisis exploratorio usando estadística multivariada

8.4.6.6 Análisis de correlación

8.4.6.7 Efecto de los tratamientos sobre especies individuales

8.4.7 Observaciones generales

8.4.7.1 Análisis relativo

8.4.7.2 Sesgo en el número de copias

8.4.7.3 Sesgo de los *primers*

8.4.7.4 Estandarización

8.4.7.5 Impacto del método

8.4.8 Protocolo: bibliotecas Illumina de amplicon V1-3 16S rRNA

8.4.8.1 Aparatos

8.4.8.2 Materiales

8.4.8.3 Protocolo

8.4.9 Interpretación y resolución de problemas

8.4.9.1 Control de la calidad de la muestra de ADN y dilución

8.4.9.2 Biblioteca de PCR

8.4.9.3 Limpieza de la biblioteca

8.4.9.4 Control de calidad de la biblioteca

8.4.9.5 Agrupación de bibliotecas

8.4.9.6 Control de calidad de la agrupación y dilución

8.4.9.7 Almacenamiento

8.4.10 Protocolo: secuenciación de amplicones Illumina V1-3 16S

8.4.10.1 Equipo

8.4.10.2 Reagentes

8.4.10.3 Protocolo

8.4.10.4 Interpretación y solución de problemas

8.4.11 Diseño de adaptadores de Illumina para la secuenciación del amplicon 16S

#### 8.5 OTROS MÉTODOS

322

323

324

325

325

325

325

326

326

327

328

299

330

330

331

331

331

331

331

331

332

333

333

333

334

334

335

335

335

335

336

336

337

337

338

338

338

338

338

339

339

339

339

340

343

343

344

344

345

346

346

346

346

346

346

346

348

349

351



# INTRODUCCIÓN

Autores:

Mark C.M. van Loosdrecht

Per H. Nielsen

Carlos M. López-Vázquez

Damir Brdjanovic

El tratamiento de aguas residuales es un componente esencial dentro de los servicios que el sector del saneamiento brinda a la sociedad. Durante siglos, el saneamiento consistió principalmente en llevar aguas limpias a las ciudades y a la vez transportar los desechos fuera de las comunidades para descargarlos en el medio natural. Sin embargo, con el incremento de la población en las ciudades como resultado de la Revolución Industrial en el siglo XIX, esta práctica no pudo sostenerse. La ocurrencia de enfermedades que trascendieron en epidemias impulsó la necesidad del desarrollo e implementación de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales desde los inicios del siglo XX. En general, este desarrollo era una actividad de carácter empírico, acompañada de consideraciones teóricas, a partir de observaciones experimentales. (Figura 1.1).

El descubrimiento y desarrollo de la tecnología de los lodos activados (descrito en detalle en Jenkins y Wanner, 2014) fue crucial, pues desencadenó el rápido desarrollo y aplicación de varios métodos experimentales y analíticos. El trabajo experimental desarrollado en la Estación Experimental Lawrence, en Massachusetts, Estados Unidos, que en ese momento (1912) era la única instalación apropiada para la verificación experimental

de diferentes procedimientos de tratamiento de aguas residuales, alentó la invitación que hiciera Gilbert Fowler a Edward Arden y William Lockett de repetir en el Reino Unido los experimentos de aireación de las aguas residuales que ellos habían podido observar en Estados Unidos.



**Figura 1.1** El Laboratorio Noyes, en el campus de la Universidad de Illinois en Urbana, fue sin dudas el más importante promotor de investigaciones en aguas residuales a principios del siglo 20 (Foto: Universidad de Illinois, 1902).

En 1913 y 1914 Lockett y Arden realizaron experimentos a escala de laboratorio en la estación

depuradora de aguas residuales de Manchester – Davyhulme (Figura 1.2). Como recipientes de aireación a escala de laboratorio, emplearon botellas de vidrio alimentadas con afluentes de aguas residuales procedentes de diferentes distritos de Manchester. A diferencia de los experimentos que vio Fowler en Massachusetts, en las pruebas de aireación de Manchester, el sedimento producido por decantación se mantuvo en la botella, adicionando al mismo una nueva carga de aguas residuales para la siguiente prueba. Lockett y Ardern rápidamente se percataron que la cantidad de sedimento aumentaba en la medida que aumentaba el número de recargas de los afluentes. Al mismo tiempo se reducía el tiempo de aireación que era necesario para alcanzar la “oxidación completa” del albañal (oxidación completa fue el término empleado para describir la remoción de los compuestos orgánicos y alcanzar una nitrificación total). Mediante el uso de ese procedimiento de mantener el sedimento remanente en las botellas y reutilizarlo en las etapas de aireación consecutivas, les fue posible a Lockett y Ardern acortar el tiempo de aireación para la “oxidación completa” (de semanas a menos de un día), lo que hizo que el proceso fuera técnicamente factible. Por su apariencia y actividad, el sedimento así formado fue llamado “lodo activado”.

Lockett y Ardern publicaron sus resultados en una trascendente serie de tres artículos (Ardern y Lockett 1914a, 1914b, 1915). Este fue el “nacimiento” del proceso de lodo activado o lodos activados, el cual hoy es el pilar de los sistemas tratamiento de agua residual y la tecnología más ampliamente aplicada en el mundo.



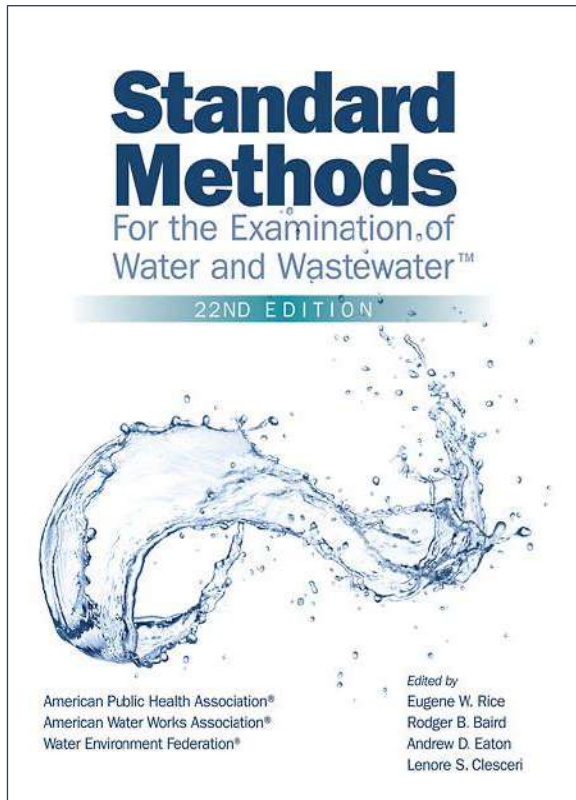
**Figura 1.2** Laboratorio de tratamiento de aguas residuales de Davyhulme donde fue desarrollado el proceso de lodos activados en inicios del siglo 20 (foto: United Utilities).

La ingeniería del tratamiento de las aguas residuales tiene principal y primordialmente bases experimentales y, por tanto, siempre ha existido la necesidad de desarrollar y estandarizar los métodos. Esto puede parecer aparentemente simple, pero puede verse obstaculizado por dos factores: (i) la ingeniería de las aguas residuales posee un carácter típicamente interdisciplinario donde los ingenieros químicos y civiles, los microbiólogos y químicos, entre otros profesionales, interactúan entre sí para el desarrollo y una mejor comprensión de los procesos involucrados. Por ello, uno de los retos radica en la necesidad de integrar los métodos y enfoques de estas disciplinas y, adicionalmente es importante considerar que (ii) las aguas residuales y los procesos para tratarlas, por su naturaleza, no pueden definirse con exactitud. Así, por ejemplo, es virtualmente imposible medir todos los componentes individuales que conforman un agua residual. Identificar todos los microorganismos involucrados en los procesos ha sido y continúa siendo un reto. También, debido a la presencia abundante de productos químicos presentes, es casi imposible definir todas las reacciones químicas potenciales.

Como consecuencia de la naturaleza indefinida de los sistemas experimentales, las investigaciones progresaron lentamente, dependiendo fuertemente del empleo de métodos estandarizados. Los cuales, por cierto, no son exactos del todo, pero son de gran utilidad para comparar resultados experimentales. Un ejemplo de ello son las comúnmente empleadas demandas químicas o bioquímicas de oxígeno. El icónico “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA *et al.*, 2012, Figura 1.3), ha sido, por diversas generaciones de ingenieros sanitarios, la fuente básica para el análisis de los sistemas de tratamiento, tanto a escala de laboratorio como a escala real. Estos métodos se enfocan en la caracterización química y en la medición e identificación de microorganismos.

La demanda de la sociedad en cuanto a la eficiencia de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) ha evolucionado en el tiempo, desde únicamente la protección de la salud, hasta la protección del valioso recurso hídrico y del medio ambiente. Hoy en día, este enfoque también contempla la recuperación y el aprovechamiento integral de recursos naturales y de energía. Por lo tanto, hubo un creciente interés durante las últimas décadas para profundizar en la caracterización de los procesos microbiológicos involucrados en el tratamiento de las aguas residuales. El desarrollo de métodos estandarizados que permita que el trabajo

experimental realizado en un momento dado pueda ser fácilmente replicable y replicado en diferentes laboratorios es indudablemente un reto. En muchos casos es importante la precisión en la manipulación, pero muchas veces es difícil expresarlo en un protocolo definido.



**Figura 1.3** El manual “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”. La primera edición apareció en 1905 (imagen: APHA *et al.*, 2012).

De esta manera, para minimizar estas dificultades, se decidió desarrollar no solamente un libro que describa varios de los métodos experimentales, pero que también ofrezca diversos videos que muestren visualmente la conducción en el laboratorio de los métodos descritos en este libro. El libro y los videos asociados (disponibles con subtítulos en español en la página en internet: [www.experimentalmethods.org](http://www.experimentalmethods.org)) fueron diseñados para apoyar los campos de investigación y desarrollo con un manual dedicado a los métodos de caracterización de los procesos biológicos en el tratamiento de aguas residuales. Los editores han decidido que esta primera edición del libro “Métodos experimentales para el tratamiento de aguas residuales” esté enfocado en el proceso de lodos

activados por ser la tecnología más ampliamente aplicada en el mundo. Sin embargo, varios de los métodos presentados también pueden ser aplicables a las tecnologías basadas en biopelículas y a procesos de digestión anaerobia.

La decisión de centrar la atención de los métodos experimentales en los procesos de lodo activado ha resultado en siete capítulos que describen los métodos experimentales clave. El contenido y el aspecto central de estos capítulos son resumidos en la Tabla 1.1. El lodo activado consiste en una miríada de microorganismos que transforman un espectro de compuestos importantes (orgánicos, oxígeno, nitrógeno y fosfatos) en otros productos más amigables o menos dañinos para salud pública y el ambiente. Los primeros tres capítulos centran la atención en la caracterización de la capacidad de conversión de compuestos que poseen las principales comunidades microbianas presentes. Se hace una diferenciación entre los procesos que tienen lugar totalmente en el medio líquido y en aquellos que se caracterizan por la medición de la respiración de los organismos, usualmente en la fase gaseosa. Considerando que hay una creciente atención e interés en la evaluación del impacto ambiental de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARS), se ha incluido un capítulo adicional para la medición de las emisiones de gases de efecto invernadero de estos sistemas. Estos capítulos son acompañados por otro que describe ciertas técnicas para el procesamiento de datos. Frecuentemente, tanto en plantas piloto como en plantas a escala real, las mediciones encierran una incertidumbre relativamente importante. Técnicas adecuadas de procesamiento de datos pueden servir para deducir algunos parámetros de los procesos (difícilmente medibles de manera directa) o para diagnosticar y minimizar los errores en los datos “crudos” o recién registrados.

La eficiencia de los procesos de lodos activados es altamente dependiente de la capacidad de sedimentación que presente el lodo floculento, para separar la biomasa de la fase líquida del agua residual tratada. Esto frecuentemente constituye el “Talón de Aquiles” del proceso de tratamiento y es un factor clave del diseño. Por ello, el presente libro contiene también un capítulo dedicado a la caracterización de las propiedades de sedimentación de los lodos.

Tal como ha sido expresado anteriormente, los microorganismos son el “caballo de batalla” en los procesos de lodos activados. Por tanto, la microscopía es una herramienta inevitablemente básica e indispensable



para la observación directa, no solamente de los organismos individuales, sino también la morfología de los flóculos relacionados con las características de sedimentación. Durante mucho tiempo la microscopía ha sido el principal método para observar qué bacterias están presentes en los lodos activados. Sin embargo, aunque ese medio es de gran utilidad, no permite mostrar totalmente la alta complejidad de la comunidad microbiana. Los avances más recientes en técnicas moleculares basadas en el ADN ha revolucionado la manera de observar los microorganismos. Estos métodos novedosos son descritos en el último capítulo del libro.

En los capítulos, los autores han tratado particularmente de describir aquellos métodos experimentalmente complejos y no los procedimientos analíticos estándares. Por lo cual, no son descritos en detalle aquellos procedimientos analíticos estándares como por ejemplo, para compuestos orgánicos, amonio, fosfato, etc. De esta manera, se ha decidido incluir algunas técnicas analíticas recientemente desarrolladas o mejoradas que empiezan a ser de uso frecuente pero que la literatura científica presenta de manera dispersa (por ejemplo, la determinación de glucógeno y de poli-hidroxi-alcanoatos). No se contemplan a detalle, métodos que, aunque pueden ser de interés académico, su aplicación práctica es limitada hoy en día.

Además, en los diferentes capítulos se ha hecho un esfuerzo para estandarizar lo máximo posible los símbolos y notaciones utilizadas en la temáticas de las

aguas residuales, siguiendo lo más cerca posible las pautas más recientes (Corominas *et al.*, 2010). Aunque cuando ese propósito ha sido cumplido en ciertos capítulos, no ha sido posible en todos ellos debido a la diversa y heterogénea naturaleza de los temas tratados y la ausencia de un acuerdo universal en el uso de símbolos y anotaciones.

El libro ha sido concebido para poder satisfacer a usuarios altamente exigentes, capaces de contar y manejar equipamientos analíticos y experimentales complejos. Sin embargo, el contenido puede ser igualmente útil para satisfacer requerimientos de laboratorios menos equipados, y de investigadores menos experimentados. En particular, los videos complementarios disponibles gratuitamente muestran la ejecución de experimentos que pueden facilitar su comprensión e implementación en diversos laboratorios y ambientes ([www.experimentalmethods.org](http://www.experimentalmethods.org)).

*“Medir es saber”*  
Lord Kelvin

**Tabla 1.1** Resumen de los métodos experimentales presentados en este libro por proceso de interés.

Proceso	Capítulo								
	Introducción	Pruebas de actividad de lodo activado	Respirometría	Ensayos en emisiones de gases	Manejo de datos y estimación de parámetros	Pruebas de sedimentación	Microscopía	Métodos moleculares	
Remoción de materia orgánica	Sobrevuelo y lógica de los métodos de experimentación	Cinética	Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) Demanda bioquímica de oxígeno a corto plazo Caracterización de aguas residuales y fraccionamiento Caracterización de biomasa Toxicidad e inhibición						
Nitrificación		Actividad de AOO y NOO Cinética Estequiometría	Caracterización de aguas residuales y fraccionamiento Caracterización de biomasa Toxicidad e inhibición Cinética Estequiometría	Métodos de muestreo de nitrógeno en emisiones de GEI Métodos de medición de gases emitidos	Manejo de datos y validación Estimación de parámetros Análisis de incertidumbre	Distribución de velocidades de sedimentación en tanques de sedimentación primaria Sedimentabilidad de lodos en tanques de sedimentación secundaria Propiedades de la floculación Sedimentación de lodo granular	Microscopía de luz confocal Determinación de morfología Técnicas de tinción Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH) Técnicas de tinciones combinadas	Extracción de ADN Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real Secuencia del amplicón	
Desnitrificación		Desnitrificación desde NO <sub>2</sub> y NO <sub>3</sub> Desnitrificación sobre DQORB y DQOLB Estequiometría Cinética	Desnitrificación A través de NO <sub>2</sub> y NO <sub>3</sub> Toxicidad e inhibición Cinética Estequiometría	Métodos de medición de concentración de N <sub>2</sub> O y CH <sub>4</sub> en agua Métodos de medición de gases en tanques abiertos	Análisis de sensibilidad local y Análisis de identificabilidad				
Anammox		Actividad AMX Cinética Estequiometría							
Remoción de fósforo (EBPR)		Actividad PAO, GAO, y DPAO Cinética Estequiometría	Cinética aerobia y Estequiometría Toxicidad e inhibición						
Tratamiento anaerobio		Actividad RBS Cinética Estequiometría	Actividad metanogénica específica Potencial de biometano Toxicidad e inhibición Cinética Estequiometría						
Sedimentación									

AMX	Organismos ANNAMOX	N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
ANNAMOX	Oxidación anaerobia de amonio	NO <sub>2</sub>	Nitrito
AOO	Organismos oxidantes de amonio (aerobios)	NO <sub>3</sub>	Nitrato
CH <sub>4</sub>	Metano	NOO	Organismos oxidantes de nitrito
DNA	Ácido dexoxi-ribonucleico	PAO	Organismos acumuladores de poli-fosfato
DPAO	Organismos desnitrificadores acumuladores de poli-fosfato	PCR	Reacción en cadena de polimerasa
EBPR	Remoción biológica aumentada de fósforo	RBDQO	DQO fácilmente biodegradable, también conocido como compuestos orgánicos rápidamente biodegradables
FISH	Hibridación fluorescente in situ	SBDQO	DQO lentamente biodegradable
GAO	Organismos acumuladores de glucógeno	SRB	Bacterias sulfato reductoras, ó SRO Organismos sulfato reductores
GHG	Gases efecto invernadero (GEI)		





**Figura 1.4** La misión de IHE Delft Institute for Water Education ([www.un-ihe.org](http://www.un-ihe.org)) es contribuir a la educación y entrenamiento de profesionales, expandir el conocimiento básico a través de la investigación y desarrollar capacidades en organizaciones, centros de conocimiento y otras instituciones activas en el campo del agua, medio ambiente e infraestructura hidráulica, principalmente en países en transición y en desarrollo. Como ejemplo se muestra una foto tomada en el laboratorio del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia (IIIA) en La Habana, donde se desarrolló un proyecto en seguridad alimentaria financiado por la Unión Europea (<https://proyecto-real.un-ihe.org/>) mediante el cual se contribuyó a actualizar un laboratorio con equipamiento novedoso del estado del arte tecnológico, y se brindó entrenamiento al grupo de trabajo local, acerca de cómo operar el equipamiento, así como preparar y realizar trabajo experimental e investigación aplicada (foto: Brdjanovic, 2015).

## Referencias

- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF) (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22<sup>nd</sup> Edition. New York. ISBN 9780875530130.
- Ardern, E., Lockett, W.T. (1914a) Experiments on the Oxidation of Sewage without the Aid of Filters. *J. Soc. Chem. Ind.*, 33: 523.
- Ardern, E., Lockett, W.T. (1914b) Experiments on the Oxidation of Sewage without the Aid of Filters, Part II. *J. Soc. Chem. Ind.*, 33: 1122.
- Ardern, E., Lockett, W.T. (1915) Experiments on the Oxidation of Sewage without the Aid of Filters, Part III. *J. Soc. Chem. Ind.*, 34: 937.

- Corominas, L.L., Rieger, L., Takács, I., Ekama, A.G., Hauduc, H., Vanrolleghem, P.A., Oehmen, A., Gernaey, K.V., van Loosdrecht, M.C.M., Comeau Y. (2010). New framework for standardized notation in wastewater treatment modelling. *Water Sci Technol.* 61(4): 841-57.
- Jenkins, D. and Wanner, J. Eds. (2014) 100 years of activated sludge and counting. IWA Publishing, London, ISBN 9781780404936, pg. 464.
- La sección sobre el desarrollo histórico de los lodos activados presentada en este capítulo está adaptado de Jenkins y Wanner (2014).

# ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE LODOS ACTIVADOS

Autores:

Carlos M. López-Vázquez

Laurens Welles

Tommaso Lotti

Elena Ficara

Eldon R. Rene

Tessa P.H. van den Brand

Damir Brdjanovic

Mark C.M. van Loosdrecht

Revisores:

Yves Comeau

Piet N.L. Lens

Nancy G. Love

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Diversas condiciones y factores inciden en el grado y sobre la tasa (velocidad) con la que los compuestos orgánicos y otros contaminantes de interés son eliminados o removidos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales por las comunidades microbianas. Es cierto que la configuración de la unidad de tratamiento y las condiciones operacionales desempeñan un papel importante en la prevalencia de ciertas poblaciones microbianas y su actividad, pero una amplia gama de otros factores diversos como las características del agua residual y las condiciones ambientales y de clima también ejercen una gran influencia. En cualquier sistema biológico de tratamiento de aguas residuales será necesario evaluar, definir y comprender el desempeño de la unidad depuradora con respecto a la remoción de ciertos contaminantes y la respuesta de la biomasa frente a sustancias de carácter tóxico o inhibitorio que pueden estar presentes. Además, desde la perspectiva de la modelación resulta también de interés investigar y determinar la estequiometría y las velocidades de los procesos de conversión llevados a

cabo por poblaciones microbianas específicas (como pueden ser los organismos heterotróficos ordinarios: OHOs; organismos heterotróficos ordinarios desnitrificantes: dOHOs; organismos oxidantes del amonio: AOOs; organismos oxidantes del nitrito: NOOs; organismos acumuladores de fosfato: PAOs ; bacterias sulfato reductoras: SRB, también conocidos como organismos sulfato reductores: SRO (Corominas *et al.*, 2010); o, los organismos anaerobios amonio-oxidantes: anammox.

De esta forma, la realización de pruebas de actividad en batch puede ser bastante útil para: (i) estudiar la biodegradabilidad de una determinada corriente de agua residual (municipal o industrial), (ii) determinar la estequiometría y los parámetros cinéticos involucrados en la conversión de un compuesto específico, (iii) estudiar la interacción potencial (por ejemplo, simbiosis y competencia) entre las poblaciones microbianas presentes y (iv) valorar el potencial inhibitorio o el

efecto tóxico de ciertas aguas residuales, compuestos o sustancias.

La naturaleza y tipo de prueba de actividad en batch puede diferir, dependiendo de los compuestos de interés, el metabolismo y fisiología de las poblaciones microbianas involucradas en la remoción o en los procesos de conversión. Por ejemplo, ellas pueden variar desde simples pruebas aerobias, para comprobar la remoción de compuestos orgánicos por OHOs, hasta pruebas en batch, de mayor complejidad, en las que se alternen condiciones anaerobias-anóxicas-aerobias para evaluar la actividad de los PAOs en presencia de diferentes aceptores de electrones (como nitrato, nitrito y oxígeno), en sistemas de lodo activado de remoción biológica aumentada de fósforo (EBPR por sus siglas en inglés, *Enhanced Biological Phosphorus Removal*).

Este capítulo presenta una revisión de las pruebas o ensayos de actividad en batch y protocolos más comunes, y su ejecución, con el objetivo de evaluar los procesos de conversión en: (i) remoción biológica de fósforo mediante PAOs bajo condiciones alternadas

anaerobias-aerobias, (ii) desnitrificación vía nitrato o nitrito mediante dPAOs, (iii) reducción de sulfato por bacterias sulfo reductoras (SRB), (iv) remoción de compuestos orgánicos en condiciones aerobias por OHOs, (v) desnitrificación por OHOs empleando nitrato o nitrito como aceptor final de electrones, (vi) oxidación de amonio y nitrito por AOOs y NOOs bajo condiciones aerobias y (vii) remoción anaerobia de nitrógeno por organismos anammox. Estos protocolos experimentales tienen el objetivo de servir como guía útil para establecer las bases que posibiliten la estandarización de los ensayos o pruebas de actividad en batch en procesos de tratamiento existentes en la actualidad, así como en otros emergentes o innovadores. Se decidió iniciar el orden de presentación con los sistemas EBPR que involucran los PAOs, mismos que son más complejos pero también podrían considerarse los más completos, ya que requieren los tres tipos de ambientes bioquímicos encontrados en los lodos activados (anaerobio, anóxico y aerobio) además de que contribuyen a las transformaciones (remoción, eliminación e inclusive recuperación) de compuestos de carbono (C), nitrógeno (N) y, por supuesto, fósforo (P).



**Figura 2.1.1** Instalaciones experimentales para ensayos de actividad de lodos activados en el Instituto IHE Delft en Educación del Agua ([www.un-ihe.org](http://www.un-ihe.org)) en Holanda (foto: IHE Delft Institute for Water Education).

## 2.2 REMOCIÓN BIOLÓGICA AUMENTADA DE FÓSFORO

### 2.2.1 Descripción del proceso

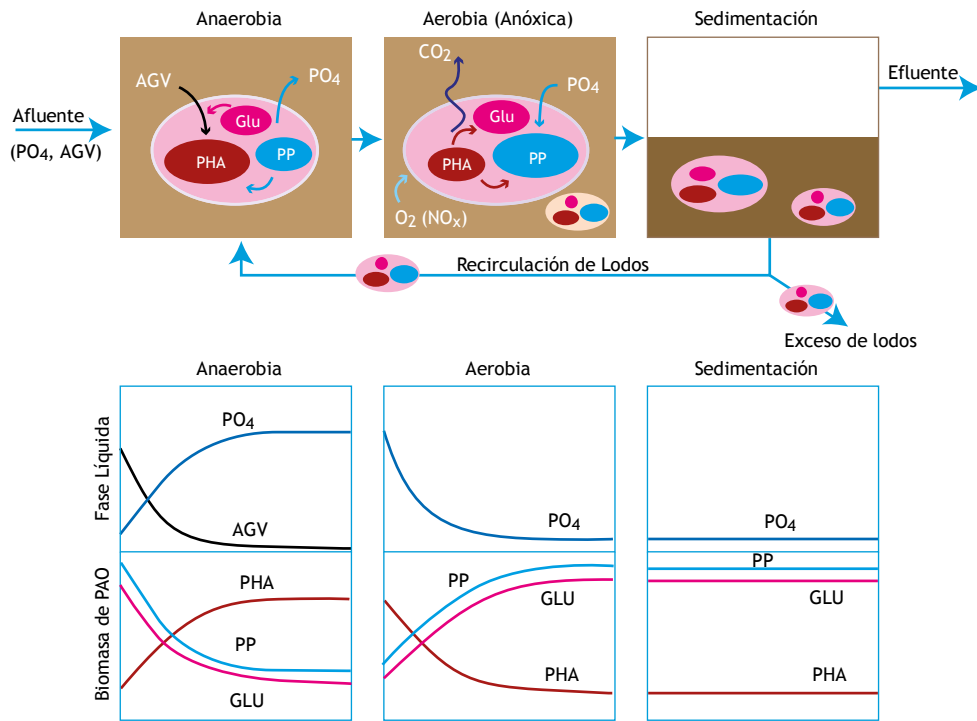
La remoción biológica aumentada de fósforo (EBPR, por sus siglas en inglés *Enhanced Biological Phosphorus Removal*) puede ser implementada en los sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados, introduciendo una etapa anaerobia al inicio de la línea de tratamiento. La elevada eficiencia de remoción de fósforo y elevado potencial de recuperación del mismo, así como el bajo costo operacional y de producción de lodo, han contribuido a la aplicación y popularidad de este sistema (Mino *et al.*, 1998; Henze *et al.*, 2008; Oehmen *et al.*, 2007). El EBPR es consecuencia de la acción de Organismos Acumuladores de P (P, para fósforo ó Polifosfatos) conocidos como PAOs (Comeau *et al.*, 1987; Mino *et al.*, 1998) que, mediante la acumulación intracelular de polifosfato (poli-P) pueden remover grandes cantidades de fósforo (0.35-0.38 g P g VSS<sup>-1</sup> de PAOs), más que la removida por los organismos heterotróficos ordinarios (OHOs) (0.03 g P g VSS<sup>-1</sup> de OHOs) (Wentzel *et al.*, 2008). Las características científicas, microbiológicas e ingenieras de los procesos EBPR han sido el foco de atención de muchos trabajos de investigación desarrollados en las últimas décadas por diferentes grupos académicos (Wentzel *et al.*, 1986, 1987; Comeau *et al.*, 1986, 1987; Smolders *et al.*, 1994a,b; Mino *et al.*, 1987, 1998; Oehmen *et al.*, 2005a, 2005c, 2006, 2007; Nielsen *et al.*, 2010). Los esfuerzos han estado particularmente enfocados en alcanzar un mejor entendimiento del mecanismo metabólico del EBPR, para revelar la identidad microbiológica de los organismos involucrados y optimizar la configuración necesaria para el proceso, todo ello con el propósito de mejorarlo e incrementar su eficiencia y confiabilidad.

Los PAOs son organismos heterótrofos. Sin embargo, a diferencia de los OHOs, los PAOs tienen la exclusiva capacidad de utilizar el poli-P acumulado intracelularmente para, en condiciones anaerobias, producir la energía necesaria (adenosin trifosfato, ATP) afín de almacenar compuestos orgánicos fácilmente biodegradables (RBDQO), tales como ácidos grasos

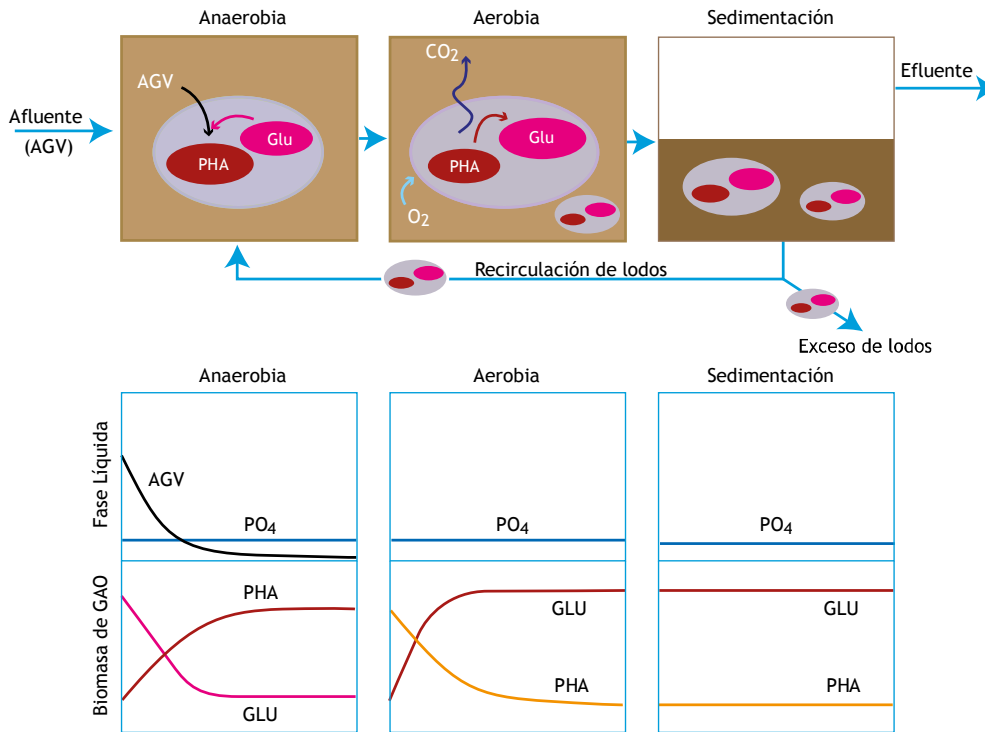
volátiles (AGV) (acetato y propionato), transformándolos en poli-β-hidroxi-alkanoatos (PHAs) intracelular. Los PHAs son posteriormente utilizados, en condiciones anóxicos o aerobias, para incrementar el consumo de fósforo, para sintetizar glucógeno, y para el crecimiento de la biomasa y su mantenimiento. Esta característica de los PAOs le da ventaja competitiva frente a otras poblaciones microbianas relevantes.

Por lo tanto, para obtener las condiciones que permitan remover fósforo, la masa de PAOs puede verse fomentada recirculando el lodo activado a través de una secuencia de etapas anaerobias y aerobias (o anóxicas), mientras que se introduce el influente, generalmente rico en AGV, en la etapa anaerobia. Una representación esquemática del metabolismo de los PAOs se muestra en la Figura 2.2.1.

En la etapa anaerobia los PAOs almacenan intracelularmente, como PHAs, compuestos orgánicos de fácil degradación presentes en el influente (mayormente AGV), utilizando para ello otros dos polímeros intracelulares que toman parte en el metabolismo: poli-P y glucógeno (un polímero de la glucosa). El poli-P es hidrolizado y utilizado por los PAOs para suministrar la energía que se requiere (como ATP) para el transporte y almacenamiento de los AGV como PHAs (Wentzel *et al.*, 1986), mientras que el glucógeno brinda la capacidad reductora necesaria para la conversión de los AGV en PHAs, al mismo tiempo que suministra energía adicional requerida (como ATP) (Comeau *et al.*, 1986, 1987; Smolders *et al.*, 1994a; Mino *et al.*, 1998). De esta manera la asimilación de los AGV por los PAOs tiene como consecuencia la acumulación intracelular de PHAs y la hidrólisis simultánea de poli-P y glucógeno. Los tipos de polímeros PHAs más comúnmente acumulados por los PAOs son el poli-β-hidroxi-butarato (PHB), poli-hidroxi-valerato (PHV) y el poli-β-hidroxi-2-metilvalerato (PH<sub>2</sub>MV). La presencia y cantidad de éstos depende de la composición de los AGV presentes. Cuando el ácido acético predomina en el medio, los PAOs acumulan fundamentalmente PHB (hasta 90% de los PHAs intracelulares) (Smolders *et al.*, 1994a), pero cuando el ácido propiónico es el AGV predominante, entonces los PHAs estarán presentes fundamentalmente, como PHV y PH<sub>2</sub>MV (Oehmen *et al.*, 2007).



**Figura 2.2.1** Esquema conceptual de una planta de tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados, capaz de llevar a cabo la remoción biológica aumentada de fósforo (EBPR por sus siglas en inglés, *Enhanced Biological Phosphorus Removal*), destacando la actividad de los PAOs (López-Vázquez, 2009; adaptado de Meijer, 2004).



**Figura 2.2.2** Esquema conceptual de la actividad microbiológica de los GAOs (adaptado de López-Vázquez, 2009).



Además de su papel en la asimilación de los AGV, la hidrólisis anaerobia de poli-P y glucógeno también suministra energía para el mantenimiento, requerida por los PAOs en ausencia de suministro de carbono. En consecuencia, la hidrólisis del poli-P deriva en la liberación de ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) al agua. Esto incrementa la concentración de ortofosfato en la fase líquida durante la etapa anaerobia (Figura 2.2.1). Además de asimilar los AGV presentes en el influente de los sistemas de lodo activado, los PAOs pueden acumular AGV generados por organismos fermentativos en la etapa anaerobia, a partir de compuestos orgánicos fermentables presentes en el influente. Una vez que los PAOs alcanzan la etapa aerobia, entonces utilizan los PHAs acumulados previamente en la etapa anaerobia como fuente de carbono y energía, y el oxígeno como aceptor de electrones. La energía liberada en la reacción antes descrita es utilizada para asimilar y almacenar una cantidad de  $\text{PO}_4^{3-}$  mayor que la liberada en la etapa anaerobia precedente (Figura 2.2.1). Esto resulta en la captación de fósforo por la biomasa, y por tanto su remoción del seno de la fase líquida. En la etapa aerobia, los PHAs son usados también para: (i) renovar su “reserva” de glucógeno intracelular, (ii) alimentar el crecimiento de biomasa y (iii) satisfacer las necesidades de energía de los PAOs para su mantenimiento durante la fase aerobia (Smolders *et al.*, 1994b). La remoción neta de fósforo se logra a través de la extracción del lodo al final de la etapa aerobia, que es cuando el lodo tiene un alto contenido de poli-P (Figura 2.2.1). Alternativamente, también podrían estar presentes microorganismos acumuladores de fósforo que pueden desnitrificar (DPAOs). Estos organismos son capaces de tomar o asimilar el  $\text{PO}_4^{3-}$  en condiciones anóxicas, utilizando nitrato o nitrito como aceptor de electrones (Vlekke *et al.*, 1988; Kuba *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 2002; Kerr-Jespersen *et al.*, 1993; Guisasola *et al.*, 2009). Adicionalmente, como organismos heterótrofos, los PAOs son capaces de asimilar fuentes de carbono bajo condiciones aerobias, liberando ortofosfato al medio mientras la fuente de carbono permanezca disponible, y con posibilidad de recapturar  $\text{PO}_4$  solo después que la fuente de carbono se agote (Guisasola *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2007). Sin embargo, eventualmente los PAOs pueden perder la competencia a favor de los OHOs debido a su readaptación a las condiciones aerobias permanentes (Pijuan *et al.*, 2006). Para una mejor comprensión del metabolismo de los PAOs y los factores que inciden en los procesos de remoción intensiva de fósforo (EBPR), pueden consultarse diversos artículos publicados en la literatura (Comeau *et al.*, 1986; Mino *et al.*, 1998; Oehmen *et al.*, 2007).

En ocasiones, bajo determinadas condiciones, organismos acumuladores de glucógeno (GAOs) podrían proliferar en los sistemas de remoción de fósforo (EBPR). Estas condiciones pueden ser la presencia de acetato o propionato como única fuente de carbono, temperaturas superiores a los 20 °C, pHs inferiores a 7.0, y/o un valor de concentración de oxígeno disuelto superior a 2 mg L<sup>-1</sup> (Oehmen *et al.*, 2007; Lopez-Vazquez *et al.*, 2009a,b; Carvalheira *et al.*, 2014). Los GAOs poseen un metabolismo aparentemente similar al de los PAOs, pero solamente dependen del glucógeno almacenado intracelularmente como fuente de energía para la transformación de los AGV en PHAs sin la contribución del poli-P (Figura 2.2.2). Aunque los GAOs no contribuyen a la remoción de fósforo, en condiciones anaerobias compiten con los PAOs por el sustrato, dando por resultado el deterioro del sistema de remoción de fósforo (Saunders *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003). De lo anterior se desprende que la presencia de GAOs es indeseable en los procesos de remoción biológica intensiva de fósforo.

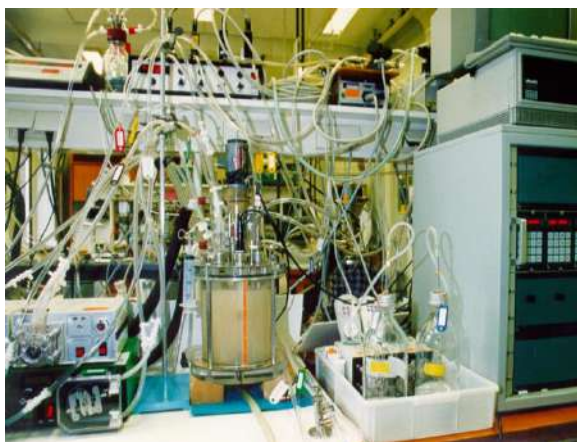
## 2.2.2 Montaje experimental

### 2.2.2.1 Reactores

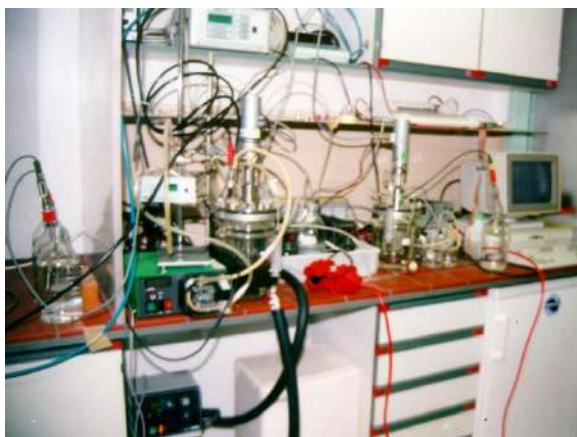
La evaluación del desempeño de un proceso EBPR puede realizarse con pruebas de actividad en batch bajo condiciones anaerobias, aerobias y anóxicas, en función de los parámetros de interés y las características o naturaleza del estudio. En todo caso, el o los bioreactores utilizados en las pruebas deben cumplir con: (i) evitar la entrada de oxígeno en condiciones anaerobias y anóxicas, (ii) poseer suficiente capacidad de aireación para producir concentraciones de OD superiores a 2 mg L<sup>-1</sup> en condiciones aerobias, (iii) proveer condiciones de mezcla completa, (iv) permitir el control de temperatura, (v) permitir el control de pH, y (vi) poseer puertos para la toma de muestras, la salida de gases, así como para la entrada del influente y la adición de otras soluciones que se requieran en el ensayo (Figuras 2.2.3 y 2.2.4).

#### Condiciones anaerobias

El montaje experimental para las pruebas de actividad en batch para la remoción de fósforo debe ser capaz de crear y mantener condiciones estrictamente anaerobias. Esto significa que ningún aceptor de electrón (ya sea oxígeno, nitrito o nitrato) debe estar a disposición de la biomasa durante la fase anaerobia



**Figura 2.2.3** Antigo arreglo experimental para EBPR, con el color amarillento característico de la biomasa altamente enriquecida con PAOs. Montaje utilizado en la Universidad Tecnológica de Delft a principios de la década de los 90 para el desarrollo del modelo metabólico TUDelft bio-P (Smolders *et al.*, 1994a, 1994b; Murnleitner *et al.*, 1997) y en la investigación pionera sobre el impacto de la temperatura en los EBPR (Brdjanovic *et al.*, 1998ª) (foto: Brdjanovic, 1994).



**Figura 2.2.4** Instalación experimental temporal utilizada para llevar a cabo ensayos batch de lodo activado en la EDAR Haarlem Waarderpolder, en los Países Bajos. Este fue el primer estudio (Brdjanovic *et al.*, 2000) en el que se llevó a cabo una validación a escala real del modelo metabólico bio-P de TUDelft, utilizando diversas pruebas batch con biomasa de un cultivo mixto procedente de la EDAR (foto: Brdjanovic, 1997).

Para verificar la existencia de condiciones anaerobias puede usarse un monitor redox y su electrodo, asegurándose que los valores de este parámetro sean menores a  $-300$  mV. El reactor debe ser hermético al aire y estar equipado de un puerto de salida de gas montado en su tapa. Suelen identificarse tres fuentes no deseables de oxígeno: (i) el oxígeno disuelto

en el influente, (ii) el oxígeno remanente contenido en el lodo de la siembra, y (iii) el oxígeno contenido en el espacio libre o vacío ubicado dentro del reactor por encima del líquido. Para remover el  $O_2$  de las dos primeras posibles fuentes, se puede inyectar gas nitrógeno durante 5-10 minutos mientras se mezcla el lodo desde el fondo del reactor, previo al inicio del ensayo y también durante la adición del influente. El tiempo necesario para la inyección de  $N_2$  dependerá de las características de la transferencia de masa en la interfase gas-líquido, que a su vez depende de otros factores incluyendo los siguientes: dimensiones del bioreactor, la existencia y ubicación de deflectores, dimensiones y velocidad de agitación de las paletas del agitador, tipo de difusor empleado, gasto del gas y composición del medio. Para evitar la intrusión de oxígeno desde el espacio superior libre del reactor, se puede que baste la misma inyección de gas  $N_2$  realizada ya a través del lodo por el fondo del reactor. También, dependiendo del volumen del espacio superior libre y de la velocidad de flujo del gas, puede inyectarse  $N_2$  directamente en la parte superior, durante 5-10 minutos, hasta que el oxígeno sea totalmente expulsado del interior del líquido y del reactor mismo. Una velocidad de flujo cercana a  $30 \text{ L h}^{-1}$  de  $N_2$  es comúnmente utilizada en reactores a escala de laboratorio de hasta 3L de volumen. Para reactores más pequeños ( $0.5\text{-}1.0 \text{ L}$ ) se recomienda una menor velocidad de flujo ( $6 \text{ L h}^{-1}$ ). La adición del gas inerte puede efectuarse antes y durante la realización del ensayo. La modalidad de inyección de gas desde el fondo del reactor es la práctica más común, pudiendo usarse antes, al inicio, y durante las pruebas de actividad. Por otra parte, el suministro de gas  $N_2$  directamente en el espacio cabezal libre es utilizado frecuentemente en el transcurso de las pruebas, para evitar la intrusión de oxígeno desde la atmósfera durante la agitación de los lodos. El empleo de las dos modalidades de inyección simultáneamente, fondo y parte superior libre, es poco usual y muchas veces considerada innecesaria.

Para evitar la difusión del oxígeno en el reactor puede emplearse una válvula de paso unidireccional o una trampa de gases (conteniendo un compuesto secuestrador de oxígeno, tal como el  $Na_2SO_3$ ), conectadas al puerto de salida de los gases. Alternativamente, en el caso de que al reactor se le inyecte el gas  $N_2$  de manera continua, se creará una presión positiva en el reactor y entonces estos dispositivos no serán necesarios para asegurar las condiciones anaerobias. Si el  $N_2$  no está disponible o no puede ser suministrado de manera continua, debe tratar de lograrse la mezcla completa del lodo activado

agitando a baja velocidad (mucho menor que 300 rpm), garantizando la hermeticidad del reactor, hasta que el valor del potencial redox sea inferior a -300 m V. Adicionalmente, se podría reducir el espacio vacío superior, rellenando el reactor hasta su máximo volumen útil, lo que propicia minimizar el riesgo de entrada de oxígeno. También puede reducirse la superficie de la interfase gas-líquido, adicionando un sólido flotante no reactivo (como por ejemplo, poliuretano). Para ayudar a sellar bien el reactor, se pueden emplear tapones y empaques de silicón, hule, plástico, y/o aluminio, por mencionar algunos.

Para mantener las condiciones anaerobias estrictas en esta etapa del ensayo, no solamente debe evitarse la entrada de oxígeno al reactor, sino que también debe prevenirse la presencia de otros aceptores de electrones (tales como nitrato y nitrito) durante el ensayo. En este caso el procedimiento de prevención es menos simple que la del oxígeno. Frecuentemente requiere la adecuada preparación de la muestra del lodo activado previamente, y durante la realización del ensayo, pudiendo implicar la adición de inhibidores de la nitrificación bajo condiciones aerobias y anaerobias o el “lavado” del lodo, tal como será explicado más adelante en la Sección 2.2.3.5.

#### Condiciones anóxicas

La existencia de condiciones estrictamente anaerobias significa que no puede estar presente ningún tipo de aceptor de electrones en el reactor, mientras que en el medio anóxico, aún cuando no hay presencia de oxígeno, si debe estar disponible otro aceptor tal como el nitrato o nitrito. De aquí se desprende que durante el establecimiento de las condiciones anóxicas, la intrusión de oxígeno debe evitarse tal como se hace para la etapa anaerobia. Al inicio del ensayo o experimento, debe garantizarse de manera controlada, la presencia del aceptor de electrones de interés. El aceptor deseado puede generarse en una etapa previa de nitrificación en el propio sistema o puede ser adicionado externamente al inicio del ensayo en batch, o durante el mismo (como solución de concentración conocida de nitrato o nitrito). Un elemento indicativo de que se ha alcanzado la condición anóxica es el que simultáneamente el valor de la concentración de oxígeno se encuentra por debajo de los valores detectables y el potencial redox se registra entre valores de -200 a 0 mV. La adición del aceptor externo es la práctica más común porque la estructura experimental se hace más sencilla y puede ejercerse mayor control sobre la concentración y tiempo de dosificación. En esta variante, debe haber un puerto

adecuado para introducir la solución de  $\text{NO}_3^-$ , así como una forma de descargar la presión extra que se origina al introducir un volumen adicional de líquido. De otra manera, con la combinación de varios reactores y etapas o fases experimentales puede incorporarse la nitrificación entre las etapas anaerobias y anóxica para proveer el aceptor de electrones necesario para que se efectúe el metabolismo anóxico de los cultivos EBPR (Kuba *et al.*, 1993).

#### Condiciones aerobias

La mayoría de los bio-reactores (fermentadores) de laboratorio disponibles comercialmente poseen un tubo perforado para dosificar gases “burbujeándolos” desde el fondo del mismo y justamente debajo de las paletas de agitación. Este tipo de sistema de aireación puede llegar a garantizar un alto nivel de transferencia de gas y lograr mantener la concentración de oxígeno por encima de las condiciones limitantes de los procesos microbianos. En general, se considera que mantener una concentración de oxígeno disuelto de al menos  $2 \text{ mgL}^{-1}$  es adecuada en la mayoría de las situaciones de trabajo. Para reactores batch que operen con un volumen efectivo de 3 L, usualmente se obtienen buenas condiciones de aireación con un flujo de aire comprimido cercano a  $60 \text{ L h}^{-1}$  ( $1 \text{ L min}^{-1}$ ). Sin embargo, la composición y concentración de la biomasa, las características de las aguas residuales y el contenido intracelular de PHA puede aumentar los requerimientos de oxígeno disuelto. Bajo estas circunstancias el flujo de aire tiene que ser mayor para poder lograr la concentración de  $2 \text{ mgL}^{-1}$ . Aunque no es usual, de manera alternativa puede acudirse al suministro de oxígeno puro en lugar de aire comprimido (fundamentalmente en aplicaciones industriales).

En otras aplicaciones más avanzadas, puede ser necesario o deseable llevar a cabo los ensayos de actividad en batch a una concentración constante de OD. En estos casos, para fijar el DO al valor de referencia deseado, puede utilizarse un sistema de control de flujo de 2 vías (para oxígeno y nitrógeno) y mantener constante la concentración de oxígeno durante todo el ensayo aerobio. La mayoría de los reactores modernos están equipados con un sistema de control de este tipo, operados al menos con dos solenoides con una función on /off (de encendido/apagado), que alternativamente suministra aire o gas nitrógeno, dependiendo de la lectura del OD en la fase líquida.



Para la realización de los ensayos de actividad en batch con reactores menos modernos que no dispongan de las facilidades anteriores, pueden utilizarse compresores de aire comprimido portátiles para suministrar un flujo de aire adecuado. Para la distribución del aire y obtener una buena transferencia de oxígeno, puede colocarse en el fondo del reactor, y alineado con las paletas de agitación, un distribuidor de aire utilizado en acuarios domésticos. Tal como ya ha sido mencionado, debe asegurarse que se mantenga una concentración de oxígeno disuelto de al menos  $2 \text{ mgL}^{-1}$  durante los primeros 10 min del ensayo.

Los electrodos de oxígeno disuelto más comunes comercialmente disponibles son de tipo membrana y de tipo óptico. Los electrodos deben calibrarse antes de ser usados (y es también recomendable su calibración posterior), siguiendo las instrucciones del fabricante. Debe tenerse cuidado particularmente con el ajuste de las conexiones, evitando los falsos contactos. Los electrodos tipo membrana deben mantenerse limpios, sin daño y sin burbujas de aire atrapados bajo la membrana. También se debe prestar atención a que se mantenga lleno de electrolito fresco en su interior. En las de tipo óptico debe preverse la limpieza periódica de la superficie y el reemplazo anual del cabezal.

### Mezclado

La operación de mezclado en el reactor debe ser tal que se favorezca la distribución homogénea del licor mezclado (mezcla de la fase líquida y la biomasa) del lodo activado, con el agua residual y otras sustancias que presentes (soluciones de ortofosfato, nitrato o nitrito). Es común mantener una velocidad de agitación de hasta 500 rpm en la mayoría de los reactores de 3 L, mientras que para reactores de mayor volumen (10 L y más) se utilizan menores velocidades de agitación del orden de 100 rpm. La agitación excesiva puede conducir a la ruptura de los flóculos de lodo, reduciendo la resistencia a la transferencia de masa, pero también afectando las características de una buena sedimentación. Por el contrario, un mezclado insuficiente puede dar lugar a zonas muertas, grandes flóculos, estratificación del lodo, deficiente difusión de sustrato y de oxígeno, y en casos extremos, puede presentarse una sedimentación del lodo en el reactor. Puede acudir a baja velocidad de agitación siempre cuando el líquido en el reactor este bien mezclado, y que no haya estratificación ni sedimentación de lodos, siempre y cuando no se presente una limitación en la transferencia de OD. Con la instalación y uso de deflectores o mamparas fijadas en el lado interior de la tapa del bio-reactor, y con la elección de paletas o aspas

de agitación más eficientes, pueden llegarse a mejorar las condiciones de mezclado. Para sistemas menos sofisticados puede emplearse un agitador magnético. Teniendo en cuenta la necesidad de evitar la potencial entrada de aire, la velocidad de agitación puede reducirse lo máximo posible, mientras no comprometa un buen mezclado.

### Control de temperatura

La temperatura tiene un fuerte efecto sobre el metabolismo de los PAOs y sus potenciales competidores (GAOs) (Brdjanovic *et al.*, 1997; Lopez-Vazquez *et al.*, 2009a,b). Por lo tanto, se hace necesario un control adecuado y estable de la misma para una ejecución exitosa de los ensayos de actividad en batch. Los reactores avanzados usualmente están concebidos con doble pared de cristal (reactores de doble chaqueta) entre las que se recircula agua. La temperatura del agua que fluye por el interior de la chaqueta puede ajustarse a partir de la consola de control del bio-reactor equipado de un calentador interno, intercambiador de calor y condensador, o de una manta eléctrica externa de calentamiento. También puede usarse un termostato con recirculación de agua. Según el rango de temperatura de trabajo deseado, pueden utilizarse otros líquidos diferentes al agua (como soluciones anticongelantes para temperaturas inferiores a  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  o aceites cuando se desee alcanzar temperaturas mayores a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Los sistemas avanzados pueden medir automáticamente la temperatura del licor dentro del reactor, y realizar los ajustes necesarios que garanticen mantener constante la temperatura. Sin embargo, es importante tener en mente que la temperatura del fluido (de calentamiento o enfriamiento) puede diferir (en más o menos  $2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de la que se mide en el licor mezclado. Por ello, es recomendable continuar ajustando la temperatura del fluido hasta que la del licor mezclado alcance la deseada y permanezca constante.

Excluyendo el sistema de control de temperatura que puede tener un fermentador, alternativamente todo el equipamiento empleado en el ensayo puede estar ubicado en un cuarto de temperatura controlada igual a la de interés. Sin embargo, si la temperatura no es una variable importante en el estudio y el ensayo puede realizarse a temperatura ambiente, debe tenerse la seguridad de que su variación durante todo el ensayo sea pequeña (menos de  $\pm 1\text{-}2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). En todo caso la temperatura y su variación deben ser registradas y reportarse.

Por último, pero no menos importante, debe mencionarse que tanto el licor mezclado como el agua

residual o medio sintético empleado deben tener la misma temperatura antes del inicio del ensayo para evitar variaciones bruscas de temperatura que puedan comprometer los resultados. En estas circunstancias, todas las soluciones, el agua residual y el licor mezclado (lodo activado) que serán utilizados deben ser llevados a la temperatura de trabajo; se debe de monitorear el cambio de temperatura de estos medios hasta alcanzar la meta. El ajuste de temperatura del lodo activado debe realizarse en ausencia de cualquier donante de electrones (sin fuente externa de carbono). Usualmente se requiere un tiempo corto de exposición de la biomasa a la temperatura (máximo 1 o 2 h). Cuando se necesite, las muestras también pueden ser aclimatadas durante más tiempo (hasta 3-4 h) hasta que se alcance la temperatura deseada, pero con el cuidado de que no se vea comprometida la actividad de los PAOs (por ejemplo, que no conlleve al consumo del material intracelular). Si la diferencia de temperatura del licor mezclado con el agua residual o con el sustrato empleado es alta (mayor de 5 °C), incluso cuando los efectos de estas diferencias son de interés en un estudio (por ejemplo, para valorar un incremento súbito de temperatura), el ensayo debe realizarse tan pronto se alcance la temperatura a la que se desea trabajar.

Es usual que la mayoría de los ensayos se ejecuten alrededor de los 20 °C, pero pueden ser a temperaturas tan bajas como 5 °C (para evaluar la actividad de la biomasa en invierno y climas fríos) (Brdjanovic *et al.*, 1997), o tan altas como 30 - 35 °C para condiciones tropicales o aplicaciones industriales (Cao *et al.*, 2009; Ong *et al.*, 2014), y aún hasta 55 °C para condiciones termofílicas (Lopez-Vazquez *et al.*, 2014). Es muy raro que los ensayos se realicen a temperaturas inferiores a 5 °C debido a que en la práctica las aguas municipales no suelen alcanzar este valor, alcanzado usualmente valores mínimos de alrededor de 7 - 12 °C.

### Control de pH

El pH es un parámetro de operación importante para los procesos de remoción de fósforo (EBPR) y otros muchos procesos biológicos. Esto se debe en particular al hecho de que el metabolismo de PAO durante la asimilación anaerobia de carbono (AGV) dará lugar a mayores niveles de liberación de P a pH más alto y menor liberación de P a pH más bajo (Smolders *et al.*, 1994a). Por otra parte, la agitación e inyección vigorosa de N<sub>2</sub> o aire comprimido pueden ocasionar la volatilización de CO<sub>2</sub> de la fase líquida y producir un aumento del pH por encima de 7.0 (por ejemplo en el intervalo de 7.8-8.5), afectando algunos procesos biológicos y físicos.

Por otra parte, la remoción biológica de constituyentes como el fósforo mediante PAOs, tiende a disminuir la capacidad buffer o amortiguadora del líquido y modifica el valor del pH durante el experimento. La alcalinidad del agua residual o cualquier otra solución añadida puede incrementar la capacidad amortiguadora del líquido y reducir las fluctuaciones de pH. La inyección de CO<sub>2</sub> puede compensar el CO<sub>2</sub> que se volatiliza debido a la agitación, inyección de aire comprimido o a la dosificación de gas N<sub>2</sub>. Así, de manera similar a la temperatura, el pH debe permanecer estable antes, durante, y hasta la conclusión del ensayo en batch de remoción de fósforo.

Bajo ciertas circunstancias, pueden fijarse diferentes valores de pH para diferentes etapas experimentales (por ejemplo, pH de 7.5 en condiciones anaerobias, seguidas de pH 7.0 para la etapa aerobia). Una variación aceptable del pH deseado puede ser  $\pm 0.1$ . En este sentido se recomienda el uso de controladores de pH de doble vía (para la adición de base y ácido, tales como el NaOH y HCl, respectivamente).

Usualmente los bioreactores modernos poseen un controlador de pH, pero en todo caso puede utilizarse un controlador externo. En cualquier otra situación el pH puede controlarse mediante la adición manual de soluciones de ácido o base. Las concentraciones normalmente empleadas están en el intervalo de 0.2 a 0.4 M, aunque para un ajuste de pH manual pueden ser más bajas (como de 0.05 o 0.1 M). La concentración de ácido y base a utilizar depende en cierta medida de la actividad del lodo. Si la concentración de las soluciones es muy alta pueden ocurrir cambios de pH bruscos ante una adición, produciendo oscilaciones consecutivas alrededor del valor de pH deseado. Si la concentración es baja, puede haber una respuesta lenta y podría no alcanzarse un control efectivo del pH o producirse una dilución del licor mezclado en el reactor.

Como consecuencia de la rapidez de las conversiones microbianas en el reactor al inicio del ensayo, el consumo potencial de ácido o base puede ser elevado en ese momento. Este consumo también puede incrementarse durante el cambio de una etapa a otra (por ejemplo, de anaerobia a aerobia), pero se atenúa luego en el fin de las corridas. En cualquier caso, cualquier variación importante del pH (más de  $\pm 0.10$ ) debe ser corregida lo antes posible, preferentemente en menos de 5-10 segundos. El valor de pH debe ser medido y registrado durante todo el experimento.

Ciertos controladores de pH poseen determinados parámetros de ajuste que deben fijarse para mantener un pH constante. Estos pueden ser, entre otros, el volumen de los pulsos de adición de ácido o base y el tiempo de respuesta entre una adición y otra. Este último tiempo debe ajustarse para que pueda garantizarse la homogeneidad de la mezcla con posterioridad a las adiciones.

Al igual que ocurre con la temperatura, cuando se trata de estudiar el efecto de cambios bruscos de pH, los ensayos batch de actividad para la remoción de fósforo han de iniciarse inmediatamente después que el lodo activado alcance el valor de pH deseado. Se recomienda hacer cualquier ajuste de este parámetro en los 5 minutos o menos anteriores al inicio del experimento. Esto evita cualquier efecto prematuro o colateral sobre el metabolismo de los PAOs (como la liberación de fósforo o el consumo de polímeros intracelulares). Para el ajuste de pH no se recomienda el empleo de ácido sulfúrico, solución amortiguadora del pH de fosfato, o soluciones de Tris(hidroximetil)aminometano (tris). En muchas ocasiones estas adiciones producen interferencias que benefician a las bacterias sulfato reductoras (SRB) en detrimento de las PAOs (Saad *et al.*, 2013, Rubio-Rincon *et al.*, 2017), acelerando la precipitación del fósforo como carbonato (Barat *et al.*, 2008) o incrementando la salinidad a valores superiores a los que los PAOs pueden tolerar (Welles *et al.*, 2014). Es obvio decir que el control del pH es esencial para la obtención de resultados exitosos en los experimentos. Aún a tiempos cortos de exposición, los valores de pH extremadamente bajos o altos pueden ser causantes de efectos irreversibles en la biomasa.

En general, todos los medidores y sensores, incluyendo los de pH, deben ser calibrados según las instrucciones del fabricante. También, se deben de verificar todas las conexiones. Debe prestarse especial atención a la selección y uso del sensor de acuerdo a las características del agua residual y del lodo del EBPR. Por ejemplo, puede darse la situación que tanto la salinidad, cloruro o  $H_2S$  tengan concentraciones suficientemente altas que interfieran con la lectura del electrodo. Siempre debe verificarse en la documentación que brinda el fabricante que tanto el electrodo como el sensor y el equipo del que se dispone sean adecuados para las condiciones particulares de trabajo que prevalecen en los ensayos en cuestión.

### **Puertos para dosificación y muestreo**

Los reactores utilizados para la realización de ensayos de actividad en batch deben tener puertos para la toma o extracción de muestras. La ubicación y característica de estos puertos debe ser tal que se garantice que la muestra sea representativa de lo que se desea extraer. Los reactores deben tener además puertos para la dosificación de las distintas soluciones que sean necesarias adicionar. En este caso las características del puerto deben propiciar la mezcla inmediata entre lo adicionado y el volumen de líquido del reactor. Los puertos pueden tener un tubo de material flexible (de goma, hule o plástico) de un diámetro interno tal que permita acoplar una jeringa de diferentes volúmenes (entre 1 y 50 mL). La penetración del puerto de muestreo en el líquido del reactor debe ser a una profundidad y ubicación favorable para la toma de muestras o alícuotas, antes, durante y al fin del ensayo. En general, la mejor localización consiste en el punto medio del tercio o cuarto bajo del volumen útil del reactor, siempre y cuando prevalezcan buenas condiciones de mezcla. Lo más importante es obtener muestras representativas de un reactor bien mezclado.

Con respecto a los puertos de dosificación de sustancias, su ubicación debe ser tal que propicia una rápida dispersión de las soluciones o sustancias añadidas en el bioreactor. Estos pueden ser puertos dedicados a tal efecto, ubicados en la cubierta del reactor o equipados de septum. Una ubicación y un diseño formal de los puertos de muestreo es requerido en el caso de reactores que deben funcionar de forma hermética, sin intrusión de oxígeno. Para la toma de muestras son deseables las de mayor volumen, siempre que las posibles tomas sucesivas no afecten significativamente el volumen contenido en el reactor. Se recomienda cerrar los puertos temporalmente inutilizados con pinzas Hoffman o de otro tipo de las empleadas en el laboratorio, para evitar derrames y salpicaduras que podrían resultar de los cambios de presión en el reactor. Para contrarrestar cualquier variación positiva o negativa de presión en el interior del reactor, ya sea durante la dosificación de sustancias o la extracción de muestras, puede insertarse una aguja en uno de los septum de la tapa del reactor, misma que desemboca en el espacio libre vacío superior por encima del líquido. La aguja se puede conectar a una bolsa de plástico (tedlar o de cualquier material flexible) conteniendo un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno).

### 2.2.2.2 Toma de muestras de lodo activado

A diferencia de lo que ocurre en otros procesos de tratamiento de aguas residuales, en los de lodo activado para la remoción de fósforo (EBPR), el lugar y el momento en el que se debe tomar la muestra dependen del tipo de ensayo de actividad en batch que se desea realizar. Teniendo en cuenta que en los EBPR se alternan las fases anaerobia-(anóxica)-aerobia, una muestra fresca de lodo debe recolectarse al final de la etapa de reacción precedente. Por lo tanto, para un ensayo anaerobio en batch, el lodo activado debe recolectarse al final de la fase aerobia de la planta de tratamiento, ya sea de una planta a escala real, de una planta piloto o una en escala de laboratorio. Para un ensayo aerobio en batch, la muestra debe ser tomada al final de la etapa anaerobia o de la fase anóxica, dependiendo de la configuración del sistema. Para la realización de ensayos anóxicos, el lodo puede recolectarse al final de la etapa anaerobia. De manera alternativa, la muestra recolectada en la fase aerobia puede utilizarse para ejecutar ensayos en batch en secuencia, anaerobio-aerobio, anaerobio-anóxico o anaerobio-anóxico-aerobio.

La localización precisa del punto de toma de la muestra de licor mixto depende de la configuración del sistema. En plantas a escala real o en plantas piloto, deben identificarse los límites o fronteras físicas entre las etapas antes de proceder al muestreo. En aquellos casos en los que no exista forma de identificar físicamente dónde se está produciendo cada etapa del proceso, es necesario acudir a la determinación del potencial redox, del oxígeno disuelto y/o de las concentraciones de nitrato y nitrito. En sistemas a escala de laboratorio (usualmente operados en modo batch secuencial en función del tiempo), la toma de muestra es relativamente mucho más sencilla, ya que el tiempo de reacción define la extensión de las etapas. Para obtener muestras homogéneas y representativas, los puntos de muestreo deben tener buenas condiciones para ello. De manera ideal, los ensayos de actividad deben realizarse tan pronto como sea posible una vez después de recolectar la muestra de lodo (en menos de 1-2 h para muestras tomadas al final de la etapa de aireación y entre 2 y 5 minutos para muestras de lodo tomadas de las etapas anaerobia y anóxica). Esto no debe ser un problema en sistemas a escala de laboratorio donde usualmente los ensayos batch se realizan en el mismo local o en uno cercano al reactor de cultivo. Además, en las plantas de tratamiento a escala real y piloto, los

ensayos de actividad en batch pueden realizarse *in situ* poco después de la recolección de las muestras de lodo activado, en el caso de que el laboratorio de la planta de aguas residuales está acondicionado y equipado con el material experimental y analítico requerido (Figura 2.2.4).

Si los ensayos batch de actividad no pueden realizarse *in situ* en el mismo día, puede tomarse la muestra de lodo al final de la etapa aerobia. En seguida, el recipiente que contiene la muestra debe transportarse y almacenarse para conservarla sin aireación, en refrigerador o en hielo (por debajo o cerca de 4 °C), y los ensayos batch de actividad deben realizarse antes de que se cumplan 24h desde la recolección de la muestra. En esas condiciones, sin aireación y a 4 °C, se logra disminuir el metabolismo bacteriano y preservar las condiciones de la biomasa. Por lo tanto, en principio, se sugiere no airear la muestra, lo anterior para evitar la liberación de fósforo y la oxidación de los compuestos intracelulares como los PHAs, el glucógeno y aún los poli-P. Esto también implica que con anterioridad a la ejecución del ensayo de actividad en batch, la biomasa presente en el lodo activado necesita ser re-activada y aclimatada a la temperatura y pH de interés. En todo caso, se prefiere la ejecución *in situ* de los ensayos de actividad. El volumen total de la muestra de lodo activado a recolectar depende de la cantidad de ensayos previstos, el volumen del reactor batch, y el volumen total de las sub-muestras que se tomarían en el ensayo batch para valorar la actividad. Las muestras de lodo recolectadas de plantas son usualmente entre 10 y 20 L. Por otro lado, teniendo en cuenta que los sistemas a escala de laboratorio suelen ser de poco volumen (de 0.5 a 2.2 L y en ciertas circunstancias de hasta 8-10 L), las muestras de lodo activado recolectadas muy pocas veces son mayores a 1 L. El máximo volumen de lodo activado que es posible extraer de un sistema montado a escala de laboratorio está dado por el volumen del exceso de lodo que se extrae para mantener el valor del tiempo de retención de sólidos (TRS) (tiempo de retención medio celular, TRMC o edad del lodo,  $\theta_x$ ), fijado previamente y que consecuentemente define la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

### 2.2.2.3 Preparación de la muestra de lodo activado

Para los ensayos de actividad en batch que se realizan *in situ*, se recolecta el lodo del reactor donde se encuentra inicialmente, ya sea de un reactor de laboratorio utilizado para enriquecer previamente la biomasa, o del tanque de aireación de la planta (piloto o a escala real).

Usualmente esta transferencia de lodo debe realizarse antes de finalizar la fase o etapa que precede a la que se desea estudiar. Entonces, el ensayo en batch puede empezar tan pronto después de haber ajustado la temperatura, pH y potencial redox del medio. Durante el ajuste de estos parámetros y hasta que se inicien los experimentos, la muestra de lodo debe mantenerse bajo condiciones similares a las que prevalecían antes de ser tomadas. O sea, si la muestra se extrajo al final de la etapa anaerobia, no debe ser aireada o expuesta a la presencia de cualquier aceptor de electrones. De manera similar, muestras recolectadas en la etapa aerobia deben permanecer aireadas, y las de etapas anóxicas no deben ser aireadas ni tener fuentes externas de carbono. En este último caso, si se desea pueden añadirse unos pocos miligramos de nitrato (para una concentración final de 5 mg de  $\text{N-NO}_3^- \text{L}^{-1}$  aproximadamente), con el objetivo de mantener por algún tiempo más las condiciones anóxicas.

Si el propósito es realizar solamente ensayos de remoción de fósforo (EBPR) y que la nitrificación no es de interés, puede adicionarse un inhibidor de la nitrificación inmediatamente después que el lodo es transferido al reactor donde se realizará el ensayo (por ejemplo, Allyl-N-thiourea (ATU) para obtener una concentración final de 20 mg  $\text{L}^{-1}$ ). La presencia del ATU: (i) evitará el alto consumo de oxígeno en el ensayo aerobio en batch para la remoción de fósforo y (ii) limitará la acumulación de nitrato y nitrito en caso que la muestra sea aireada previamente a la realización de un experimento anaerobio. En el caso de que la evaluación busque conocer las condiciones reales y actuales de la planta de tratamiento, el ensayo de actividad en batch debe realizarse inmediatamente después de recolectar el lodo, prácticamente sin ajustar ningún parámetro, sino solo consiguiendo condiciones estables de trabajo (por ejemplo, de pH y temperatura). Debe realizarse un programa de muestreo amplio y adecuado, antes, durante y después de los ensayos para monitorear bien el desempeño y que queden registradas las condiciones existentes en el momento de la prueba. Sin embargo, debe mencionarse que es recomendable la ejecución de los ensayos de actividad en batch en condiciones favorables a los PAOs. Esto puede contribuir a (i) evaluar el potencial del sistema para la remoción de fósforo (EBPR), (ii) constituir un punto de referencia de la actividad EBPR de la planta, (iii) detectar interferencias, y (iv) contribuir a la definición de una estrategia de mejora.

Como se mencionó anteriormente, ciertas interferencias a la actividad de los PAOs pueden

producirse por (pero, sin limitarse a): (i) presencia de nitrato y nitritos en las muestras aerobias de lodo recolectadas para realizar ensayos anaerobios en batch, (ii) la existencia de DQO fácilmente biodegradable (RBCOD) en muestras anaerobias destinadas a la realización de ensayos aerobios o anóxicos, (iii) la detección de nitrito en muestras anóxicas para realizar ensayos aerobios en batch. Entonces, si el ensayo es uno concebido para realizarse bajo condiciones favorables para los PAOs, deben evitarse las posibles interferencias. Posteriormente, las muestras de lodo pueden ser expuestas durante poco tiempo (1 o 2 h máx.) a una etapa de preparación o pre-tratamiento, como estrategia de detección de problemas. Por ejemplo, para remover nitrato presente en una muestra aerobia que se pretenda emplear para un ensayo anaerobio en batch ( $\sim 5\text{-}10 \text{ mg N-NO}_3^- \text{L}^{-1}$ ), se puede transferir la muestra a un reactor hermético y mantenerlo con agitación lenta. Las concentraciones de nitrato y nitrito deben monitorearse hasta que caigan por debajo de los límites detectables. Se recomienda el uso de técnicas de detección rápida tales como el empleo de papel de detección de nitrato y nitrito (por ejemplo, de Sigma-Aldrich). El ensayo anaerobio en batch puede iniciarse una vez que no se aprecie la presencia de nitrato. Si se detecta presencia de RBCOD en una muestra tomada de un reactor anaerobio, esta condición debe mantenerse hasta que, previo al inicio de ensayos aerobios o anóxicos, ya no se observe más RBCOD. Las muestras anóxicas recolectadas para realizar ensayos aerobios y en las que se observe nitrato, no necesitan pre-tratamiento, ya que el nitrato es inocuo para los PAOs en condiciones aerobias. Sin embargo, si se detecta nitrito, éste debe removerse ya que bajo ciertas condiciones aerobias su presencia puede ser inhibitoria y aún tóxica para los PAOs (Pijuan *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012; Yoshida *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2014). Para evitar la presencia de nitrito puede emplearse el procedimiento descrito anteriormente para la remoción de nitrato.

Cuando los ensayos batch no pueden realizarse *in situ* y las muestras de lodo sean almacenadas a baja temperatura (alrededor de  $4^\circ\text{C}$ ), el lodo debe reactivarse debido a que la baja temperatura puede llegar a disminuir considerablemente el metabolismo bacteriano. Debido a la fisiología particular de los PAOs, la reactivación del lodo debe hacerse mediante aireación durante 1-2 h, al pH y temperatura a la que se realizará el ensayo en batch. Este procedimiento contribuirá a eliminar los compuestos orgánicos remanentes. Si solamente se realizarán ensayos de remoción de fósforo



(EBPR) debe adicionarse un inhibidor de la nitrificación (por ejemplo, ATU hasta que la concentración final en el reactor sea de  $20 \text{ mgL}^{-1}$ ). En caso de detectarse alguna interferencia potencial (nitrito, nitrato o RBCOD) antes del período de aireación de 1-2h, puede iniciarse la reactivación con una etapa de pretratamiento a la temperatura y pH de interés. Posteriormente, aún cuando el objetivo sea solo estudiar la actividad anóxica o aerobia de los PAOs, el ensayo de actividad de las EBPR debe iniciarse con una etapa anaerobia de incubación, utilizando como alimentación un agua residual sintética o agua residual real. Esta práctica garantizará que los PAOs tengan almacenado intracelularmente suficiente PAHs para llevar a cabo su metabolismo aerobio o anóxico.

Sin embargo, en general, un objetivo del plan experimental debe ser el de minimizar lo máximo posible la necesidad de transportar, enfriar, almacenar y reactivar el lodo (entre otras etapas potenciales). Siempre que sea posible es mejor utilizar lodo y sustrato (medio) frescos.

#### 2.2.2.4 Sustrato

Cuando un agua residual real (ya sea cruda o sedimentada) es utilizada para la ejecución de ensayos de actividad, la misma puede introducirse o alimentarse de la forma más directa al reactor. En condiciones normales o regulares, la alimentación se realiza al inicio del ciclo anaerobio para favorecer el consumo de los AGV por los PAOs y la disponibilidad de los PHAs intracelulares. Si se considera necesario, puede adicionarse una etapa previa de filtración gruesa (empleando un tamaño de poro de filtro de  $10 \mu\text{m}$ ) para remover los residuos y partículas grandes presentes en el agua residual cruda. Si es necesario realizar la prueba de actividad a varias concentraciones de biomasa, puede utilizarse para diluir, el efluente tratado de la instalación de donde se obtuvo el lodo (asumiendo que la concentración de sólidos suspendidos en ese efluente sea relativamente baja, por ejemplo,  $20\text{-}30 \text{ mg SST L}^{-1}$ ). Si se pretende estudiar varias fuentes y concentraciones de fósforo y carbono, también el efluente de la instalación original puede ser empleado para preparar un medio semi-sintético conteniendo una concentración de RBCOD entre  $50$  y  $100 \text{ mg DQO L}^{-1}$ .

Con frecuencia se emplea más bien agua residual sintética para realizar los ensayos de actividad, con el objetivo de: (i) asegurar un mejor control de las condiciones experimentales, (ii) propiciar las condiciones redox deseadas, (iii) estudiar el efecto de

diferentes composiciones de agua residual, o (iv) evaluar el efecto inhibitorio o tóxico de diferentes soluciones o compuestos. Sin embargo, esta práctica podría ser costosa si se tiene en cuenta la cantidad de sustancias químicas que son potencialmente necesarias.

Dependiendo de la naturaleza, propósito y secuencia de los ensayos de actividad (anaerobia, anóxica o aerobia), las concentraciones de carbono y fósforo presentes en el agua residual sintética pueden variar. Por otra parte, las concentraciones pueden ajustarse de acuerdo a la extensión o duración del ensayo. Cuando el lodo activado que se utiliza en el ensayo es obtenido de plantas reales, usualmente se aplican concentraciones entre  $50$  y  $100 \text{ mg RBDQO L}^{-1}$ , y cuando el lodo es extraído de cultivos a escala de laboratorio, las concentraciones pueden ser mayores de  $400 \text{ mg L}^{-1}$ . Cuando se estudia la liberación anaerobia de fósforo, las soluciones sintéticas pueden tener bajas concentraciones o ausencia de fósforo, pero cuando el interés radica en estudiar la máxima asimilación aerobia de fósforo, la concentración de éste puede ser tan alta como  $100\text{-}120 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$ . Sin embargo, independientemente de la naturaleza del ensayo de actividad, el agua residual sintética debe poseer macro y micro-elementos (en especial potasio, y magnesio, pero también calcio, hierro, zinc y cobalto, entre otros) en la suficiente cantidad y variedad que requieran los PAOs, para evitar cualquier limitante que ponga en riesgo los resultados del ensayo de actividad en batch (Brdjanovic *et al.*, 1996). Una formulación sugerente para un agua residual sintética que tenga una concentración inicial de ortofosfato de  $20 \text{ mg P L}^{-1}$  puede contener por litro (Smolders *et al.*, 1994a):  $107 \text{ mg NH}_4\text{Cl}$ ;  $90 \text{ mg MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $14 \text{ mg CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $36 \text{ mg KCl}$ ;  $1 \text{ mg}$  extracto de levadura y  $0.3 \text{ mL}$  de solución de elementos traza (que incluye por litro:  $10 \text{ g EDTA}$ ;  $1.5 \text{ g FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $0.15 \text{ g H}_3\text{BO}_3$ ;  $0.03 \text{ g CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $0.12 \text{ g MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $0.06 \text{ g Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $0.12 \text{ g ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $0.18 \text{ g KI}$ ; y  $0.15 \text{ g CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Sobre todo es importante destacar que la concentración mínima de K y Mg que se necesita para que sea proporcional a la concentración de fósforo, está en la relación molar de  $1:1:3$ , Mg:K:P. Ello se debe a que el Mg y el K son esenciales para la formación de poli-P al servir de “contra-iones” en la formación de poli-P. Si se desea, el agua residual sintética puede concentrarse, esterilizarse en autoclave (durante  $1 \text{ h}$  a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y utilizarse como solución patrón en varios ensayos durante un determinado tiempo. Sin embargo, debe desecharse en cuanto haya indicios de pérdida de

transparencia o de aparición de precipitados en la misma.

Para la realización de experimentos en cultivos enriquecidos en el laboratorio, es mejor realizar los ensayos con la misma agua residual (sintética) que se utilizó en el cultivo, de acuerdo con las concentraciones de carbono y fósforo del estudio. Como alternativa, y de manera similar a las muestras procedentes de plantas reales, el efluente del reactor puede ser recolectado (filtrado con filtración gruesa sin contiene demasiados sólidos) y utilizado para preparar el medio con las concentraciones de carbono y fósforo deseadas para la conducción del ensayo de actividad.

Para la ejecución de ensayos anóxicos convencionales pueden prepararse soluciones de nitrato y nitrito con el objetivo de crear las condiciones anóxicas requeridas. Sin embargo, para aplicaciones prácticas se recomienda trabajar según aproximaciones sucesivas y monitorear cuidadosamente la adición de estas sales, de manera tal que sus concentraciones en la fase líquida no excedan de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para el nitrito y de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  para el nitrato. Esto evitará el potencial efecto inhibitorio en los PAOs causado por acumulación de nitrato o nitrito (Saito *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2006; Pijuan *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2007, 2012). Además, valores de pH inferiores a 7.0, en combinación con altas concentraciones de nitrito pueden inhibir a los PAOs debido a que el nitrito puede presentarse como ácido nitroso libre (FNA), especie protónica del nitrito. Zhou *et al.* (2007) and Pijuan *et al.* (2010) observaron a pH 7.0 un 50% de inhibición del metabolismo anóxico y aerobio de los PAOs para una concentración de FNA entre 0.01 y 0.0005  $\text{mg HNO}_2\text{-N L}^{-1}$ , respectivamente (equivalente a 45 y 2  $\text{mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$  a pH 7.0). Así, para asegurar su disponibilidad durante la ejecución del ensayo anóxico, las concentraciones de nitrito o nitrato deben ser monitoreadas durante el mismo y dependiendo de sus concentraciones será o no necesario su adición en las diferentes etapas.

Cuando se desea evaluar el efecto inhibitorio o tóxico potencial de un compuesto dado a diferentes concentraciones, la solución patrón (concentrada) se prepara a la concentración de interés, y se adiciona durante la prueba. Los ensayos para evaluar si el efecto inhibitorio o tóxico es reversible, se realizan con posterioridad al "lavado" de la biomasa para remover los compuestos inhibidores y tóxicos. En la etapa de "lavado" se realizan varias acciones consecutivas de sedimentación y re-suspensión de la muestra de lodo en un medio libre de carbono (sea totalmente sintético o

empleando un efluente tratado y filtrado, bajo condiciones redox deseadas). Similarmente, cuando se necesita realizar ensayos de mantenimiento debe emplearse un medio libre de carbono y fósforo bajo condiciones de redox y de operación requeridos por el estudio en cuestión.

### 2.2.2.5 Procedimientos analíticos

La mayoría de los procedimientos analíticos necesarios (para determinar fósforo total,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , SSLM y SSVLM, entre otros) pueden realizarse siguiendo los protocolos analíticos descritos en el Standard Methods (APHA *et al.*, 2012). La determinación de los AGV (para acetato, propionato y otros) puede realizarse a través de cromatografía gaseosa (CG), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), o aplicando la analítica descrita en los protocolos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otros procedimientos analíticos de interés, la determinación de PHAs y glucógeno tiene mayores exigencias en cuanto a la preparación de las muestras, necesidad de equipamiento más sofisticado, y procedimientos más laboriosos solamente encontrados en literatura científica especializada. Por ello, el procedimiento analítico para la determinación de PHAs y glucógeno se describe con algún detalle en los párrafos siguientes.

#### • PHA

Como se ha mencionado con anterioridad, los polímeros de tipo PHA más comunes almacenados por los PAOs son el poli- $\beta$ -hidroxi-butilato (PHB), poli- $\beta$ -hidroxi-valerato (PHV) y el poli- $\beta$ -hidroxi-2-metil-valerato (PH<sub>2</sub>MV). La proporción en la que se encuentran y la cantidad en que se almacenan intracelularmente está dada por la composición de los AGV (acético o propiónico) y el metabolismo involucrado en su almacenamiento (metabolismo PAO o GAO). Para cultivos enriquecidos en el laboratorio que lleva a cabo la remoción de fósforo (EBPR) (donde los PAOs son los organismos predominantes al constituir el 90 % de la biomasa total), y cuando el ácido acético es el AGV más abundante los PAOs almacenan los AGV en forma de PHB (más de 90% de los PHAs) (Smolders *et al.*, 1994a). Sin embargo cuando predomina el ácido propiónico, entonces los PHAs más abundantes son el PHV (45 %) y el PH<sub>2</sub>MV (53 %)(Oehmen *et al.*, 2005c).

Cuando los GAOs están presentes en los sistemas EBPR, el lodo almacena también grandes cantidades de PHV. Por otro lado, en cultivos de laboratorio enriquecidos con GAOs (constituyendo más de 90 % de la biomasa total) y empleando como aporte de AGV el ácido acético se logra una acumulación intracelular de PHB (73 %) y PHV (26 %) (Zeng *et al.*, 2003a, Lopez-Vazquez *et al.*, 2007, 2009a), mientras que en las mismas circunstancias un cultivo enriquecido en PAOs llega a contener mayoritariamente PHB y menos de 10 % de PHV (Smolders *et al.*, 1994a). Por otro lado, sistemas de GAO alimentados con ácido propiónico no acumulan PHB, sino que la proporción de los PHAs está compuesto por más de 43 % PHV y 54 % PH<sub>2</sub>MV (Oehmen *et al.*, 2006). Es importante destacar que la determinación analítica de los PHA refleja con buena precisión su contenido en los SSLM. Esto implica que una buena determinación de los SSLM es igualmente importante para obtener la concentración de PHA y conocer la conversión neta durante la etapa de experimental.

Comparado con los sistemas reales de remoción de fósforo, la determinación de PHAs a escala de laboratorio es más sencilla por tratarse de sistemas más pequeños y, más importante aún, por tener la posibilidad de estar más enriquecidos en PAOs (> 90 %) (Oehmen *et al.*, 2004, 2006; Lopez-Vazquez *et al.*, 2007). Consecuentemente, el contenido intracelular de PHA puede llegar a alcanzar más del 10% de la concentración de los SSLM dependiendo del AGV disponible (Lopez-Vazquez *et al.*, 2009a). Por el contrario, en sistemas a escala real, en el mejor caso el contenido de PHA acumulado en la biomasa alcanza entre 1 y 2 % de la concentración de los SSLM, debido a que los PAOs y GAOs rara vez sobre pasan el 15 % de la población bacteriana total (Lopez-Vazquez *et al.*, 2008a). Esto implica que la determinación analítica de PHAs en plantas completas no siempre es posible o representativa de la muestra recolectada. En casos extremos, el contenido de PHA puede caer por debajo de los límites mínimos detectables. Desde una perspectiva económica y teniendo en cuenta los recursos requeridos (en términos de equipamiento analítico, costo de reactivos y de la alta calificación de los técnicos de laboratorio), es probable que la determinación de PHAs no se justifique económicamente en muestras de plantas a escala real. De manera alternativa, para evaluar la acumulación potencial de PHAs, puede emplearse el lodo real procedente de la planta y realizar ensayos de actividad en batch, bajo condiciones más favorables y controladas para la remoción de fósforo, que maximicen la

acumulación de PHAs y facilite su determinación analítica (Lanham *et al.*, 2014). Sin embargo, este procedimiento también requiere que la determinación de PHAs se lleve a cabo con alta precisión.

La determinación analítica de los diferentes polímeros que constituyen el grupo de los PHAs ha sido objeto de estudio y mejora desde finales de los años 90s (Baetens *et al.*, 2002). El método más confiable de determinación brinda dos posibilidades (Oehmen *et al.*, 2005b): (i) una para la determinación de PHB y PHV (ii) otra para PHV y PH<sub>2</sub>MV.

Para ambos procedimientos, las muestras de lodo activado deben recolectarse *in situ* en tubos para centrifugación de plástico de 15 mL. El volumen de muestra debe ser el suficiente para obtener aproximadamente 20 mg de SST. Para preservar la muestra se adicionan (como medida de seguridad dentro de una campana de extracción) 4-5 gotas de paraformaldehído (al 37%) a los tubos de centrifugación antes que la muestra sea recolectada. Posteriormente se almacena a 0-4 °C por 2 h. Para eliminar sólidos disueltos del líquido y el exceso de paraformaldehído, las muestras se lavan dos veces con agua corriente (del grifo). Las etapas de lavado incluyen: (i) centrifugación durante 10 min a 4 500 rpm, (ii) retirada cuidadosa del sobrenadante por decantación o mediante una pipeta (evitando la remoción de partículas sólidas), (iii) adición de 10 mL de agua del grifo y (iv) re-suspensión con agitación. Después de la segunda etapa de lavado la muestra debe centrifugarse una vez más y el sobrenadante es desechado. Con posterioridad la muestra es guardada a -20 °C y subsecuentemente secada en un liofilizador a 0.1 mbar y -80 °C y durante 48 h (o más), hasta que la muestra esté totalmente seca. Una vez seca la muestra, pueden entonces iniciarse los procesos de digestión, y esterificación.

Tal como han descrito Oehmen *et al.* (2005b), para la determinación de PHB y PHV deben transferirse 20 mg de la muestra seca a un tubo de digestión, adicionando 2 mL de etanol acidificado, conteniendo 3 % de ácido sulfúrico y aproximadamente 100 mgL<sup>-1</sup> de benzoato de sodio. Posteriormente las muestras son digeridas y esterilizadas durante 2 h a 100 °C. Una vez digeridas y esterilizadas, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente: se adiciona agua destilada y se agita vigorosamente. 1 h de sedimentación debe ser suficiente para obtener una separación de 2 fases. La fase líquida es transferida a un vial, secado con 0.5-1.0 g de sulfato de sodio granular, y separado de la fase sólida. Paralelamente se preparan soluciones estándar a



concentraciones definidas de los copolímeros: ácido R-3-hidroxibutírico (3HB) y ácido R-3-hidroxivalérico (3HV) (7:3). Después de la extracción y esterificación, se introducen 3  $\mu\text{L}$  de la fase líquida en el cromatógrafo. Algunas características del cromatógrafo y recomendaciones para su operación son: (i) estar equipado con una columna DB-5 (30 m de longitud  $\times$  0.25 mm diámetro interno  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  de película), (ii) aplicar una relación de inyectado 1:15, (iii) emplear helio (He) como gas de transporte, a una velocidad de flujo de 1.5  $\text{mL min}^{-1}$ , (iv) estar equipado con un detector de ionización de llama (por sus siglas en inglés FID) operado a 300  $^{\circ}\text{C}$  con un puerto de inyección a 250  $^{\circ}\text{C}$ , y, (v) para variar la temperatura del horno, mantener la temperatura durante 1 minuto a 80  $^{\circ}\text{C}$ , aumentándola a razón de 10 $^{\circ}\text{C}$  por min hasta alcanzar 120  $^{\circ}\text{C}$ . El incremento posterior hasta 270  $^{\circ}\text{C}$ , incrementando 45  $^{\circ}\text{C}$  cada minuto, y mantenerla constante durante 3 minutos. Siguiendo estas instrucciones, los picos de PHB y PHV aparecerán después de 2-3 minutos de ser inyectada la muestra.

De manera alternativa, el procedimiento de determinación de PHB y PHV seguido por Smolders *et al.* (1994a) conlleva la adición de 20 mg de biomasa liofilizada a 1.5 mL de dicloroetano y 1.5 mL de HCl concentrado, así como 1-propanol 1:4 (en volumen). A esta última solución se le añade 1 mg ácido benzoico como estándar interno. Las muestras son digeridas y esterificadas por 2 h a 100  $^{\circ}\text{C}$ , con agitación vigorosa al menos cada 30 min. Una vez enfriada se le adiciona 3 mL de agua destilada. El contenido se agita intensamente y se centrifuga durante algunos minutos para obtener una satisfactoria y bien definida separación de fases. Se extrae aproximadamente 1 mL de la fase inferior (orgánica) y se filtra sobre una pequeña columna de sulfato de sodio anhidro en un vial de CG. Se recomienda correr 3 estándares para cada serie de 15 muestras. Cuando se emplea este procedimiento se inyecta 1  $\mu\text{L}$  de la fase inferior de la solución en el CG equipado y operado de la manera descrita a continuación: (i) utilizando una columna HP Innowax (30 m de longitud  $\times$  0.32 mm de diámetro interno  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película), (ii) aplicando una relación de inyección de 1:10, (iii) usando He como gas transportador (a un flujo de 6.3  $\text{mL min}^{-1}$ ), (iv) operando el FID a 250  $^{\circ}\text{C}$ , y aplicando una temperatura de inyección de 200  $^{\circ}\text{C}$ , (v) con el horno a una temperatura inicial de 80  $^{\circ}\text{C}$ , manteniéndola durante 1 min, aumentando hasta 130  $^{\circ}\text{C}$  a un ritmo de 25  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  y entonces hasta 210  $^{\circ}\text{C}$  a razón de 15  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Finalmente, la temperatura se debe mantener a 210  $^{\circ}\text{C}$

durante 12 min. Se recomienda ese prolongado tiempo final para eluir compuestos que no sean de interés (por ejemplo, constituyentes de la pared celular). Por último, pero no menos importante, es que el contenido de PHA se reporta como porcentaje (%) de la concentración de los SSLM utilizada para calcular la concentración de PHA.

Si la muestra de lodo activado contiene altas concentraciones de sales, no se emplea agua del grifo para el lavado. En su lugar se recomienda usar una solución salina con presión osmótica similar a la de la muestra original para el lavado. Esta práctica evita la citólisis de la célula y preserva los compuestos intracelulares (tales como los PHAs y glucógeno), evitando su disolución y su pérdida potencial en el sobrenadante. Sin embargo, cuando para el lavado se utiliza la solución salina puede precipitar una alta concentración de sólidos totales disueltos (STD) contenidos en el líquido (después de la centrifugación) y causar interferencias en el valor de la concentración de SSLM de la muestra original y a partir de la cuál será determinada la concentración de PHAs. Para compensar esto, cuando se determine la concentración de PHAs, se necesitará un factor de corrección que considere el efecto potencial de los STD sobre la muestra final de sólidos.

Aunque los dos procedimientos anteriores son razonablemente satisfactorios para la determinación de PHB y PHV, ninguno de ellos puede ser utilizado directamente para la determinación de  $\text{PH}_2\text{MV}$  (de importancia particular cuando en cultivos EBPR está presente el propionato como fuente de carbono). Así, para mejorar la extracción de  $\text{PH}_2\text{MV}$  Oehmen *et al.* (2005b) recomiendan aplicar el mismo procedimiento descrito para la determinación de PHB y PHV, pero utilizando una solución acidificada de etanol, que contenga 10 % de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (en lugar de 3 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y prolongando la digestión a 100  $^{\circ}\text{C}$  hasta 20 h. En ausencia del producto comercial que se emplea como estándar directo para la determinación de  $\text{PH}_2\text{MV}$ , Oehmen *et al.* (2005b) recomiendan el uso del ácido 2-hidroxiproico, el que se asume tiene una respuesta similar a el  $\text{PH}_2\text{MV}$  debido a que ambos son isómeros. Este procedimiento puede ser de utilidad para la determinación simultánea del PHV y  $\text{PH}_2\text{MV}$ , pero no del PHB. Consecuentemente, si los tres polímeros (PHB, PHV y  $\text{PH}_2\text{MV}$ ) necesitan ser determinados, deben emplearse dos procedimientos. Para mayor detalle acerca de las técnicas para la determinación analítica de PHAs se sugiere consultar las fuentes originales (Baetens *et al.*, 2002; Oehmen *et al.*, 2005b).

Desde la perspectiva de la visualización microscópica de PHAs puede utilizarse la tinción Nile azul A para la visualización cualitativa de PHAs y la tinción Neisser para poli-P (Mino *et al.*, 1998; Mesquita *et al.*, 2013). Mayores detalles acerca de observaciones microscópicas de estos u otros polímeros intracelulares y sobre el uso de tinciones, pueden encontrarse en el Capítulo 7 en Microscopía.

#### • Glucógeno

Los cultivos para la remoción de fósforo (EBPR) utilizan el glucógeno como fuente de energía y aceptor de electrones para el almacenamiento de PHAs. El glucógeno ( $C_6H_{10}O_5$ ) es un polisacárido de la glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), similar al almidón y la celulosa, pero con diferente enlace glucosídico y geometría entre las moléculas (Dircks *et al.*, 2001; Wentzel *et al.*, 2008). Su presencia relativa entre compuestos intracelulares almacenados en los procesos por los cultivos EBPR, depende de la composición de los AGV (acético o propiónico), la relación P/C en el influente, y del organismo predominante (PAOs o GAOs) (Schuler and Jenkins, 2003; Oehmen *et al.*, 2007). En cultivos de laboratorio enriquecidos con PAOs cultivados con ácido acético como fuente de carbono (donde la composición de PAOs constituye más del 90 % de la biomasa total), con una relación P/C inferior a  $0.04 \text{ mol mol}^{-1}$ , las fracciones de glucógeno pueden alcanzar más del 20 % de la concentración de los SSVLM, mientras que para influentes con una relación P/C mayor a  $0.04 \text{ mol mol}^{-1}$  las fracciones de glucógeno usualmente son menores del 15 % (Smolders *et al.*, 1995; Schuler and Jenkins, 2003; Welles *et al.*, 2016). Similarmente cultivos de laboratorio enriquecidos con PAOs, pero cultivados con ácido propiónico como fuente de carbono, tienden a almacenar intracelularmente menos glucógeno que con frecuencia no alcanza más del 15 % de los SSVLM. Esto debido a que el metabolismo anaerobio de los PAOs sobre el ácido propiónico requiere menos hidrólisis de glucógeno para la liberación anaerobia del fósforo y el almacenamiento intracelular de PHA (Oehmen *et al.*, 2005c). Por el contrario, cultivos de laboratorio enriquecidos con GAOs que utilizan acético o propiónico como fuente de carbono pueden tener fracciones de glucógeno tan altas como del 30 % de los SSVLM independientemente de la fuente utilizada para la alimentación de los cultivos (Filipe *et al.*, 2001b; Zeng *et al.*, 2003a; Oehmen *et al.*, 2005a, c; Dai *et al.*, 2007; Lopez-Vazquez *et al.*, 2009a). De manera similar a lo que ocurre en la determinación de PHA, el contenido de glucógeno intracelular es más fácil de

estimar en sistemas a escala de laboratorio, donde los cultivos EBPR constituyen más del 90 % de la población microbiana total. La estimación se dificulta en sistemas de plantas a escala real, donde los PAOs y GAOs escasamente alcanzan el 15 % del total de la población microbiana (Lopez-Vazquez *et al.*, 2008a). Consecuentemente, las fracciones de glucógeno presentes en sistemas EBPR rara vez alcanzan más de 5% de los SSVLM, lo que dificulta la determinación y la convierte en un mayor reto, cuando se compara con los sistemas de laboratorio. Es posible hacerlo, pero la determinación analítica requiere mayor precisión (Lanham *et al.*, 2014). Desafortunadamente, todavía no se dispone de un método directo de determinación de glucógeno. El glucógeno debe ser hidrolizado y “extraído” con anterioridad a su determinación. Han sido propuestos diferentes métodos para su determinación analítica. Los métodos van desde los ensayos de hidrólisis enzimática (Parrou y Francois, 1997) hasta aquellos fundamentados bioquímicamente (Brdjanovic *et al.*, 1997) a través de su determinación indirecta (como glucosa después de una hidrólisis ácida y extracción) mediante HPLC (Smolders *et al.*, 1994a; Lanham *et al.*, 2012). Desde el punto de vista práctico, y después de varias mejoras, este es uno de los procedimientos más empleados. El método consiste en la digestión de una muestra diluida de lodo activado con HCl 6 M, llegando a una concentración final de 0.6 M y digiriendo la muestra a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 h. Con posterioridad a la digestión, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y el sobrenadante se filtra a través de filtros con un tamaño de poro de 0.2 o  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ . El sobrenadante filtrado se coloca en un vial y el glucógeno se cuantifica como glucosa mediante HPLC (Smolders *et al.*, 1994a). Esto puede hacerse porque el glucógeno y la glucosa poseen el mismo contenido de carbono por mol. Sin embargo, la determinación de glucógeno como contenido de glucosa que se extrae de la biomasa no expresa su verdadera concentración, ya que la glucosa contenida en la biomasa, que no forma parte del glucógeno, también estará presente en el material extraído, y el glucógeno contenido en otras poblaciones (por ejemplo, en GAOs), también afectarán el resultado. Recientemente, Lanham *et al.* (2012) han introducido mejoras en la extracción de glucógeno. Pueden emplearse muestras secadas por liofilización y preparadas al igual que para la determinación de PHA: el lodo activado puede colectarse *in situ*, puesto en un tubo de centrifuga de 15 mL conteniendo 4-5 gotas de formaldehído (37 %), almacenado a  $0-4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h, lavado con agua del grifo y liofilizado. Para introducir mejoras en la hidrólisis ácida y extracción de

glucógeno, esos autores recomiendan utilizar una relación de 1 mg de lodo liofilizado por cada 1 mL de HCl 0.9 M. Entonces, dependiendo del nivel de agregación que presente el lodo (floculento o granular), así será el tiempo de digestión: para lodos floculentos 2 h, lodos granulares 5 h, y si no se conoce el estado de agregación, 3 h. Posteriormente, se añaden 5 mg de lodo liofilizado a 5 mL de una solución 0.9 M de HCl. Se digiere durante el tiempo requerido a 100 °C. El sobrenadante filtrado por un filtro de 0.2 µm de tamaño de poro es analizado como glucosa mediante HPLC. Si se aplica este último procedimiento, los 5 mg de lodo liofilizado deben ser pesados con precisión, y los resultados finales se reportarán como % de SSLM. La determinación mediante HPLC ha demostrado ser suficientemente precisa y confiable para su empleo en cultivos de laboratorio donde predomine una población capaz de remover fósforo. Sin embargo, como ha sido discutido con anterioridad, los resultados obtenidos en muestras provenientes de plantas a escala real no siempre son precisos. Tentativamente puede emplearse la tinción Schiff (PAS, ácido peryódico de Schiff) para obtener una estimación cualitativa de la presencia de glucógeno y otros gránulos de carbohidratos presentes en las células (Mesquita *et al.*, 2013).

### 2.2.2.6 Parametros de interés

Para determinar y valorar la actividad metabólica de los PAOs pueden emplearse diferentes relaciones estequiométricas y consideraciones cinéticas en las etapas anaerobia, anóxica y aerobia, basados en la ejecución de ensayos de actividad en batch. La Tabla 2.2.1 muestra la descripción de algunos parámetros de interés.

## 2.2.3 Ensayos de actividad EBPR en batch: preparación

Esta sección no solo describe las diferentes etapas en la preparación, sino también las características del equipamiento y materiales necesarios para la realización de los ensayos de actividad en batch.

### 2.2.3.1 Aparatos

1. Un bioreactor hermético equipado con sistema de agitación y puertos de muestreo (tal como se describe en la Sección 2.2.2.1).
2. Suministro de gas nitrógeno (recomendado).

3. Suministro de oxígeno (aire comprimido u oxígeno puro).
4. Electrodo de pH (si no está incluido/incorporado a la configuración del reactor).
5. Controlador de pH de dos vías para la adición de HCl y NaOH (alternativamente uno de una vía para la adición de HCl, o controlador manual para la adición manual de HCl y NaOH).
6. Termómetro (se recomienda de un intervalo entre 0 y 40 °C).
7. Sistema de control de temperatura (si no está contemplado en la configuración actual del biodigestor).
8. Medidor de oxígeno con electrodo.
9. Controlador automático de oxígeno de dos vías (nitrógeno y oxígeno).
10. Confirmar que todos los electrodos y medidores (pH, temperatura y OD) hayan sido calibrados menos de 24 h antes de la realización del ensayo de actividad.
11. Centrífuga con un volumen de trabajo de al menos 250 mL para efectuar el proceso de lavado (de ser requerido).
12. Cronómetro.

### 2.2.3.2 Materiales

1. Dos probetas graduadas de 1 o 2 L (dependiendo del volumen de lodo usado) para que contenga el lodo y lavarlo si es necesario.
2. Al menos 2 jeringas plásticas (preferiblemente de 10 mL) para la colección y determinación de compuestos solubles (después de filtración)
3. Al menos 3 jeringas plásticas (preferiblemente de 20 mL) para la colección de sólidos, particulados o compuestos intracelulares (sin filtración)
4. Filtros de 0.45 µm de tamaño de poro. Es preferible que no sean de acetato de celulosa debido a que estos pueden dejar trazas en la muestra de agua colectada. Considere tener al menos la doble cantidad que el número de muestras que serán filtradas
5. Recipientes plásticos transparentes de 10 a 20 mL para coleccionar muestras para la determinación de compuestos solubles (por ejemplo, DQO soluble, acetato, propionato, ortofosfato, nitrato, nitrito).
6. Recipientes plásticos transparentes de 10 a 20 mL para muestras para determinación de SSLM y SSVLM por triplicado.

**Tabla 2.2.1** Parámetros estequiométricos y cinéticos de interés para muestras de lodo activado de sistemas EBPR.

Parámetro	Símbolo	Unidades típicas (en base molar)	Unidades típicas (en base mg o g)
<b>PARÁMETROS ANAEROBIOS</b>			
<b>Estequiométricos</b>			
Ortofosfato liberado/AGV consumido	$Y_{VFA\_PO4,An}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg P mg AGV <sup>-1</sup>
Utilización de glucógeno/AGV consumido	$Y_{Gly/VFA,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg AGV <sup>-1</sup>
Producción de PHA/AGV consumido	$Y_{VFA\_PHA,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg AGV <sup>-1</sup>
Producción de PHB/AGV consumido	$Y_{VFA\_PHB,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg AGV <sup>-1</sup>
Formación de PHV/AGV consumido	$Y_{VFA\_PHV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg AGV <sup>-1</sup>
Formación de PH <sub>2</sub> MV/AGV consumido	$Y_{VFA\_PH2MV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg AGV <sup>-1</sup>
Formación de PHV/formación de PHB	$Y_{PHV/PHB,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg C <sup>-1</sup>
<b>Cinéticos</b>			
Velocidad específica máxima de consumo de AGV	$Q_{VFA,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg AGV mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica máxima de liberación de PO <sub>4</sub>	$Q_{PP\_PO4,An}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg P mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica máxima de producción de PHA	$Q_{VFA\_PHA,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg PHA mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad de liberación de PO <sub>4</sub> en mantenimiento	$m_{PP\_PO4,An}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg P mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ATP mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Coefficiente ATP de mantenimiento	$m_{ATP,An}$	mol ATP C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad de liberación secundaria de PO <sub>4</sub>	$m_{PP\_PO4,Sec,An}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg P mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
<b>PARÁMETROS ANÓXICOS</b>			
<b>Estequiométricos</b>			
Degradación de PHA/consumo de NO <sub>x</sub>	$Y_{NOx\_PHA,Ax}$	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	mg C mg NO <sub>x</sub> <sup>-1</sup>
Formación de glucógeno/consumo de NO <sub>x</sub>	$Y_{NOx\_Gly,Ax}$	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	mg C mg NO <sub>x</sub> <sup>-1</sup>
Formación de poly-P/consumo de NO <sub>x</sub>	$Y_{NOx\_PP,Ax}$	P-mol N-mol <sup>-1</sup>	mg P mg NO <sub>x</sub> <sup>-1</sup>
Crecimiento de biomasa/consumo de NO <sub>x</sub>	$Y_{NOx,Bio,Ax}$	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	mg C mg NO <sub>x</sub> <sup>-1</sup>
Formación de glucógeno/consumo de PHA	$Y_{PHA\_Gly,Ax}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg C <sup>-1</sup>
Formación de poly-P/consumo de PHA	$Y_{PHA\_PP,Ax}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg P mg C <sup>-1</sup>
Crecimiento de biomasa/consumo de PHA	$Y_{PHA\_Bio,Ax}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg C <sup>-1</sup>
<b>Cinéticos</b>			
Velocidad específica máxima de degradación de PHA	$Q_{PHA,Ax}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg PHA mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica máxima de formación de glucógeno	$Q_{PHA\_Gly,Ax}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg Gly mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica máxima de formación de poly-P	$Q_{PO4\_PP,Ax}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg PP mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica máxima de crecimiento de biomasa	$Q_{Bio,Ax}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg biomasa activa mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Coefficiente de mantenimiento anóxico ATP	$m_{ATP,Ax}$	mol ATP C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg ATP mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad de respiración endógena anóxica	$m_{NOx}$	N-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg NO <sub>x</sub> mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
<b>PARÁMETROS AEROBIOS</b>			
<b>Estequiométricos</b>			
Degradación de PHA/consumo O <sub>2</sub>	$Y_{PHA}$	C-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	mg C mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>
Formación de glucógeno/consumo de O <sub>2</sub>	$Y_{Gly}$	C-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	mg C mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>
Formación de Poly-P/consumo O <sub>2</sub>	$Y_{PP}$	P-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	mg P mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>
Crecimiento de biomasa PAO/consumo O <sub>2</sub>	$Y_{PAO}$	C-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	mg C mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>
Formación de glucógeno/consumo de PHA	$Y_{PHA\_Gly,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg C <sup>-1</sup>
Formación de Poly-P/consumo de PHA	$Y_{PHA\_PP,Ox}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg P mg C <sup>-1</sup>
Crecimiento de biomasa/consumo de PHA	$Y_{PHA\_Bio,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	mg C mg C <sup>-1</sup>
<b>Cinéticas</b>			
Velocidad específica máxima de degradación de PHA	$Q_{PHA,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg PHA mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica máxima de formación de glucógeno	$Q_{PHA\_Gly,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg Gly mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica máxima de formación de Poly-P	$Q_{PO4\_PP,Ox}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg PP mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica máxima de crecimiento de biomasa	$Q_{Bio,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg biomasa activa mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Coefficiente ATP de mantenimiento ATP	$m_{ATP,Ox}$	mol ATP C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg ATP mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad de respiración endógena de un cultivo	$m_{O2}$	mol O <sub>2</sub> C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	mg O <sub>2</sub> mg biomasa activa <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

7. Tubos para centrifugación plásticos de 15 mL para la determinación de PHA y/o glucógeno.
8. Caja plástica o caja para hielo seco, con hielo, de una capacidad tal que permita almacenar temporalmente los recipientes y tubos de centrifuga plásticos después de recolectada la muestra (1-2 h después de concluir los ensayos de actividad).
9. Guantes plásticos y espejuelos de seguridad.
10. Pipetas de Pasteur o plásticas para la adición de HCl y/o NaOH cuando el pH se controla manualmente.
11. Pinzas metálicas de laboratorio o abrazaderas para cerrar los puertos de muestreo con las mangueras de goma.

### 2.2.3.3 Preparación de medios y soluciones de trabajo

#### • Agua residual real

Si para realizar el ensayo de actividad en batch se va a emplear un agua residual real, la muestra debe colectarse en el influente de la EDAR y ejecutar el ensayo tan pronto como sea posible. Dependiendo de las características del ensayo, el investigador debe decidir si tomar la muestra del residual crudo o sedimentado (en caso que la EDAR tenga sedimentador primario). Si debido al lugar donde se encuentra ubicada la EDAR, problemas de transporte o cualquier otra situación logística los ensayos no pueden realizarse dentro de las 2 primeras horas transcurridas desde la toma de muestras, éstas deben ser refrigeradas hasta que pueda trabajarse con ellas (manteniendo el recipiente que la contiene a 4 °C). Sin embargo, la temperatura del agua residual deberá ajustarse al valor que tendrá en las condiciones en las que se realizarán los ensayos de actividad en batch (preferiblemente alcanzando la temperatura de trabajo en menos de 1 h). Con ese propósito puede utilizarse un baño termostataado o una habitación con temperatura controlada, como se describe en la Sección 2.2.2.1.

#### • Medio sintético influente o sustrato

Si se pretende realizar los ensayos con medio sintético, éste debe contener fuentes de carbono y ortofosfato además de macro y micronutrientes dependiendo del tipo de ensayo (anaerobio, anóxico o aerobio). Todos estos compuestos pueden estar mezclados o separados en dos soluciones: (i) fuente de carbono y (ii) fuente de fósforo y solución de nutrientes. Si necesitan ser añadidos en diferentes fases o tiempos, pueden ser preparados

separadamente. La composición y concentración usuales se explican a continuación:

- a. Solución de fuente de carbono: Normalmente está compuesta por una fuente de RBDQO, preferiblemente AGV como el acetato o el propionato, dependiendo de la naturaleza u objetivo del ensayo. Algunas veces se emplean sustratos más complejos, conteniendo una mezcla de compuestos RBDQO y lentamente biodegradables (SBDQO). Sin embargo, estos últimos no son aplicados en los ensayos descritos en este capítulo, y por tanto son omitidos. Para el ensayo de actividad anaerobia en batch, es necesario que la concentración de DQO de la alimentación se consuma en la etapa anaerobia. Se recomienda que para los ensayos de actividad de lodos activados llevados a cabo en plantas a escala real la concentración de DQO no tenga un valor superior a 100 mg L<sup>-1</sup>. Para muestras de lodo activado a escala de laboratorio la concentración de DQO puede ser tan alta como el valor de la DQO en el influente en el sistema a nivel de laboratorio (y hasta 2 o 3 veces mayor), en la medida que la RBDQO alimentada sea totalmente removida en la etapa anaerobia y no sea inhibitorio ni tóxico a los PAOs.
- b. Solución de fuente de ortofosfato: La concentración de ortofosfato puede ajustarse según se necesite dependiendo del propósito del experimento. Para un simple ensayo anaerobio en batch, la concentración de ortofosfato puede ser tan baja como 2-3 mg PO<sub>4</sub>-P L<sup>-1</sup> y hasta estar ausente, mientras para muestras a escala completa puede ser tan alta como 75 mg PO<sub>4</sub>-P L<sup>-1</sup>. Cuando se desea evaluar la máxima capacidad de asimilación de fósforo bajo condiciones anóxicas o aerobias precedidas de una fase anaerobia y con empleo de cultivo enriquecido en el laboratorio, la concentración de ortofosfato puede ser tan o más alta que 120 mg PO<sub>4</sub>-P L<sup>-1</sup> (Wentzel *et al.*, 1987).
- c. Solución de fuente de nutrientes: Esta solución debe contener todos los macro-nutrientes requeridos (amonio, magnesio, sulfato, calcio, potasio) al igual que los micro-nutrientes (hierro, boro, cobre, manganeso, molibdato, zinc, yodo, cobalto) para asegurar que no estén en concentraciones limitantes para las células y evitar la obtención de malos resultados y, en caso extremo, que se fracase en el ensayo. Independientemente del hecho que sus concentraciones puedan parecer



muy bajas, es necesario asegurar que todos los constituyentes sean adicionados a la solución. Se recomienda la siguiente composición (según Smolders *et al.*, 1994a) (cantidades de nutriente por litro de solución): 107 mg NH<sub>4</sub>Cl; 90 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 14 mg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 36 mg KCl; 1 mg de extracto de levadura y 0.3 mL de solución de elementos traza (que incluye por litro: 10 g EDTA; 1.5 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.15 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0.03 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0.12 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.12 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.18 g KI y 0.15 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O). Pueden utilizarse soluciones de nutrientes similares, en la medida que contengan todos los compuestos anteriormente mencionados

- **Soluciones de nitrato o nitrito**

Para crear las condiciones para realizar un ensayo de actividad anóxico en batch, pueden utilizarse soluciones de nitrato o nitrito (según el caso) para crear las condiciones adecuadas anóxicas (Sección 2.2.2.4). Para ese propósito pueden emplearse sales de KNO<sub>3</sub> o NaNO<sub>2</sub>, respectivamente. Sin embargo, para asegurar que su presencia no origine ningún efecto inhibitorio o tóxico sobre la biomasa, debe vigilarse cuidadosamente su adición. De esta manera se recomienda mantener sus concentraciones por debajo de 20 mg NO<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> y 10 mg NO<sub>2</sub>-N L<sup>-1</sup> (a pH 7.0).

- **Medio para lavado**

Si la muestra de lodo activado debe ser lavada para remover compuestos no deseados (que incluso pueden ser inhibitorios o tóxicos), es necesario preparar una solución de nutrientes para lavar el lodo. Esta solución puede contener, por litro (Smolders *et al.*, 1994a): 107 mg NH<sub>4</sub>Cl; 90 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 14 mg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 36 mg KCl; 1 mg de extracto de levadura y 0.3 mL de la solución de elementos traza (que incluye por litro: 10 g EDTA; 1.5 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.15 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0.03 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0.12 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.12 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.18 g KI y 0.15 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O). El proceso de lavado se repite 2 o 3 veces. Después de eso pueden ejecutarse las etapas siguientes de preparación del ensayo de actividad en batch. En casos especiales en los que se utilice lodo procedente de una planta a escala real, el efluente de la misma puede emplearse como agua para lavado.

- **Solución de formaldehído**

Con el objetivo de preparar y preservar muestras para las determinaciones de PHAs y glucógeno, se utiliza una solución de formaldehído al 37 %.

- **Solución de Allyl-N-thiourea (ATU)**

Para inhibir la nitrificación puede utilizarse una solución de ATU, preparada de manera tal que se alcance una concentración inicial en el lodo de aproximadamente 20 mg L<sup>-1</sup>. El ATU se adiciona con anterioridad a que el lodo sea expuesto a cualquier condición aerobia (incluyendo cuando la muestra de lodo está preparándose para su aclimatación).

- **Soluciones de ácido y base**

Los volúmenes y concentraciones de estas soluciones deben ser 100-250 mL de 0.2 M HCl y 100-250 mL 0.2 M NaOH para control automático o manual del pH, y 10-50 mL de HCl 1 M y 10-50 mL NaOH de 1 M para ajuste inicial de pH en aquellos casos en los que el pH deseado sea muy diferente del pKa del agente amortiguante o tampón (buffer).

- Las soluciones de trabajo y las estándar necesarias para realizar las determinaciones analíticas deben prepararse siguiendo las instrucciones de los métodos estándar de acuerdo con el Standard Methods (APHA *et al.*, 2012) y los protocolos correspondientes.
- Se recomienda que antes de iniciar los experimentos se verifique si el valor de las concentraciones de los parámetros de interés es el deseado (por ejemplo, DQO, ortofosfato, etc.).

### 2.2.3.4 Preparación de materiales

- El volumen y número de muestras que se necesitan recolectar deben definirse de acuerdo al tipo de análisis, volumen requerido para la determinación analítica y el número de réplicas del parámetro de interés:
  - a. Por ejemplo, debe recolectarse una muestra de 3 mL si ese es el mínimo volumen requerido para determinar la concentración de acetato por duplicado.
  - b. Cuando se van a determinar dos o más parámetros utilizando la misma muestra, entonces el volumen debe sumarse: si se necesitan 3 mL para acetato, 5 mL amonio, y 6 mL para la determinación de ortofosfato

entonces al final deben recolectarse 14 mL de muestra.

En los sistemas que están bien mezclados las muestras líquidas solo se toman una vez, aunque haya análisis que se realicen con réplica, porque el muestreo usualmente no afecta la calidad de la muestra (a menos que sea no filtrada).

- La definición del volumen y número de muestras a recolectar está dado por la masa o volumen necesario para la determinación de los parámetros de interés y el número de réplicas por análisis (por ejemplo, 3 muestras de 10 mL cada una para la determinación de SSLM/SSVLM por triplicado, 20 mg SST por cada análisis de PHA y 5 mg SST para cada análisis de glucógeno). En el caso de las muestras enfocadas a la concentración de sólidos puede haber una cierta diferencia entre muestra y muestra debido a la naturaleza de los procedimientos de muestreo. Por tanto, es preferible realizar el muestreo y los análisis por triplicado.
- Frecuencia de la toma o recolección de muestras:
  - a. Si se desea obtener velocidades específicas iniciales máximas (por ejemplo, velocidad máxima específica de consumo de acetato, o de ortofosfato), entonces deben tomarse un mayor número de muestras al inicio de la etapa o fase correspondiente (anaerobia, anóxica o aerobia). Puede necesitarse tomar muestras cada 5 minutos durante los primeros 30-40 min de duración del ensayo en batch. Los 5 min son, desde el punto de vista práctico, el período mínimo necesario para la toma y manejo de la muestra.
  - b. Si solamente se busca evaluar relaciones estequiométricas (por ejemplo, la relación fósforo liberado anaeróbicamente/acetato consumido o PHB formado/acetato consumido), y no estudios cinéticos, entonces las muestras serán colectadas solamente al inicio y final de cada etapa para hallar la conversión final de interés.
- Para aumentar la fiabilidad de los datos y conocer las condiciones iniciales del lodo se recomienda insistentemente recolectar una serie de muestras de lodo antes que se adicione cualquier medio. Particularmente, para la determinación de PHAs y glucógeno (que requieren un tiempo prolongado de muestreo a partir de la alta velocidad de conversión de la biomasa), y al igual que para los análisis de SSLM y SSVLM, las muestras frecuentemente se toman por triplicado.
- Defina cuidadosamente el volumen máximo y mínimo de trabajo en el reactor :
  - a. La estimación del volumen final restante al concluir los ensayos (después de recolectar todas las muestras) sin dudas evitará problemas de muestreo (por ejemplo, cuando la manguera o tubo para la extracción de la muestra no alcanza la altura del líquido en el reactor), y de control de las condiciones operacionales (si los electrodos no quedan sumergidos en el líquido que necesitan medir). También puede prevenir una aireación y/o agitación insuficiente, y pérdida de biomasa por el salpicado excesivo sobre las paredes.
  - b. El volumen mínimo que debe contener el reactor al inicio del ensayo debe tener en cuenta: el volumen que necesariamente debe quedar al final, además del inicial de lodo activado, el de la adición de medios y otras soluciones, y el que se extrae con propósitos de muestreo medio. Debe verificarse que éstos últimos no excedan el máximo volumen de trabajo del reactor, lo que podría ocasionar derrames e inundaciones. En la definición del volumen de trabajo no debe olvidarse considerar el incremento de volumen por la inyección de aire comprimido y nitrógeno.
- Una vez que el número de muestras y su frecuencia sean definidos, entonces se ponen etiquetas a todos los frascos plásticos. Se recomienda definir una nomenclatura y/o forma abreviada que permita identificar fácilmente el ensayo, hora que fue tomada la muestra, y parámetro(s) de interés a determinar en esa muestra. Etiquetando el frasco y su tapa se hará más fácil la identificación.
- La creación de una hoja de trabajo puede ser de mucha utilidad para seguir la historia de la muestra, el desarrollo de los ensayos, y los resultados de las diferentes pruebas realizadas. La Tabla 2.2.10 (descrita en secciones siguientes) contiene el ejemplo de una hoja de trabajo. Adicionalmente, se recomienda llevar un diario de incidencias.
- Organice en un radio pequeño de espacio alrededor de la configuración del reactor, todo lo que se vaya a necesitar de manera que se eviten atrasos en el manejo y preparación de las muestras. De otra forma será difícil mantener la

frecuencia mínima de muestreo de 5 min entre muestras.

- Cuando se pretende recolectar muestras para determinar PHA y glucógeno, debe preverse con anterioridad la adición de 4-5 gotas de solución de formaldehído al 37%, con una pipeta Pasteur. Una vez adicionado, se cierra el tubo y se mantiene así hasta que la muestra vaya a ser añadida. Siempre utilice guantes de protección y considere posteriormente todo el material utilizado como si fuera contaminado con residuos químicos.
- Calibre todos los medidores (pH, OD, termómetro) dentro de las 24 horas anteriores a la realización del ensayo y mantenga los sensores dentro de las soluciones adecuadas hasta que vayan a ser usados. Para la calibración deben seguirse las recomendaciones del fabricante.
- Una vez que se haya asegurado una correcta recolección de cada muestra, realice lo que sea necesario y guárdela antes que la siguiente sea tomada (Tabla 2.2.2).

**Tabla 2.2.2** Sugerencias para el almacenamiento y preservación de muestras en función de la determinación analítica del parámetro de interés.

Parámetro de interés	Material del recipiente	Método de preservación	Máximo tiempo recomendado entre recolección, preservación y análisis
DBO total	Plástico o vidrio	Enfriar a 1-5 °C; o, congelar a -20 °C y almacenar en la oscuridad	24 h para muestras almacenadas a 1-5 °C; hasta 1 mes para muestras congeladas
DBO soluble	Plástico o vidrio	Filtrar inmediatamente a través de un filtro de 0.45 µm y enfriar a 1-5 °C; o, congelar a -20 °C y almacenar en la oscuridad	24 h para muestras almacenadas a 1-5 °C; hasta 1 mes para muestras congeladas
DQO total	Plástico o vidrio	Enfriar a 1-5 °C; o adicionar H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado para disminuir el pH a 1-2, y congelar a -20 °C y almacenar en la oscuridad	
DQO soluble	Plástico o vidrio	Filtrar inmediatamente a través de filtro de 0.45 µm y enfriar a 1-5 °C	
AGV	Plástico o vidrio	24 h para muestras almacenadas a 1-5 °C; hasta 6 meses para muestras acidificadas y almacenadas en la oscuridad	
P total	Plástico o vidrio lavado (con 0.1 M HCl)	24 h para muestras almacenadas a 1-5 °C; hasta 6 meses para muestras acidificadas y almacenadas en la oscuridad.	6 meses
PO <sub>4</sub>	Plástico o vidrio lavado con (0.1 M HCl)	24 h para muestras almacenadas a 1-5 °C; hasta 6 meses para muestras acidificadas y almacenadas en la oscuridad	24 h
NH <sub>4</sub>	Plástico o vidrio	Filtrar inmediatamente a través de filtros de 0.45 µm, enfriar a 1-5 °C; o, adicionar H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado para disminuir el pH a 1-2, y congelar a -20 °C y almacenar en la oscuridad.	24 h para muestras almacenadas a 1-5 °C; hasta 21 días para muestras acidificadas y almacenadas en la oscuridad.
NO <sub>2</sub>	Plástico o vidrio	Filtrar inmediatamente después de recolectar a través de un poro de 0.45 µm y enfriar a 1-5 °C	24 h
NO <sub>3</sub>	Plástico o vidrio	Filtrar inmediatamente después de recolectar a través de poro 0.45 µm, enfriar a 1-5 °C; o, adicionar H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado para disminuir el pH a 1-2, congelar a -20 °C y almacenar en la oscuridad.	24 h para muestras almacenadas a 1-5 °C; hasta 7 días para muestras acidificadas y almacenadas en oscuridad
PHAs	Plástico	Después del muestreo y el procedimiento de preparación (ver Sección 2.2.2.5) almacene a -20 °C o -80 °C; muestras liofilizadas también pueden almacenarse a -20 or -80 °C.	Hasta 6 meses
Glucógeno	Plástico o vidrio	Después del muestreo y preparación (ver Sección 2.2.2.5) almacene a -20 °C; después de digerir, también almacene a -20 °C.	Hasta 6 meses
SSLM	Plástico o vidrio	Enfriar a 1-5 °C.	2 días
SSVLM	Plástico o vidrio	Enfriar a 1-5 °C.	24 h

### 2.2.3.5 Preparación del lodo activado

Este procedimiento da por hecho que el ensayo de actividad en batch se realizará tan pronto como sea posible después de recolectar las muestras del sistema a escala real o de escala de laboratorio, o en el peor escenario, dentro de las 24 horas siguientes a su colección. No es recomendable la ejecución del ensayo después de las 24 horas de la recolección del lodo activado debido a los cambios potenciales que puedan presentarse en el cultivo de EBPR (a menos que esa demora sea de particular interés). Teniendo en cuenta los comentarios anteriores, la preparación de las muestras de lodo activado para la ejecución de ensayos de actividad en batch se recomiendan los siguientes procedimientos:

- Si el ensayo de actividad en batch se va a realizar dentro de la primera hora posterior a la colección del lodo, y si la muestra de lodo no necesita ser lavada:
  - a. Ajuste la temperatura del bioreactor que será utilizado a la temperatura deseada para el ensayo
  - b. Colecte el lodo:
    - i. Al final de la etapa aerobia si es que se desea realizar el ensayo anaerobio.
    - ii. O al final de la etapa anaerobia si se desea llevar a cabo ensayos anóxicos o aerobios.
  - c. Transfiera la muestra de lodo al bioreactor donde se realizará la prueba de actividad en batch.
  - d. Añada solución de ATU (si se necesita para el objetivo del ensayo) hasta obtener una concentración final de 20 mg L<sup>-1</sup> (vea la Sección 2.2.3.3).
  - e. Inicie una agitación lenta (50 - 100 rpm) y vigile la temperatura del lodo colocando un termómetro dentro del bioreactor (si no lo tiene incorporado).
  - f. Mantenga la agitación hasta que se alcance la temperatura deseada para el ensayo
  - g. Mantenga la misma condición redox prevaleciente en el punto de la recolección (anaerobio, anóxico o aerobio) hasta que el ensayo de actividad en batch esté listo para iniciarse:
    - i. Evite que la muestra recolectada bajo condiciones anaerobias se airee. Si existe disponible, utilice un reactor aislado o hermético e inyecte nitrógeno para evitar y/reducir la presencia de oxígeno.
    - ii. Evite que la muestra recolectada bajo condiciones anóxicas se airee y preferiblemente adicione nitrato hasta una concentración final alrededor de 10 mg NO<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> para preservar el ambiente anóxico mientras agita.
- iii. Airee la muestra de lodo en muestras recolectadas bajo condiciones aerobias, manteniendo una concentración de oxígeno disuelto mayor que 2 mg L<sup>-1</sup>.
- h. Lodo para la realización de ensayos anaerobios en batch: si se detecta nitrato en la muestra de lodo colectada para estos ensayos (ver Sección 2.2.2.3), debe detenerse la aireación y agitar la muestra lentamente hasta que no se observe más nitrato. En cuanto desaparezca el nitrato, el lodo puede ser utilizado para ejecutar el ensayo anaerobio en batch. Para la rápida estimación de la presencia de nitrato y nitrito pueden utilizarse tiras de detección rápida (Sigma-Aldrich).
  - i. El lodo para llevar a cabo el ensayo de actividad anóxico o aerobio, puede entonces ser utilizado, en el plazo de 1 h posterior a haber sido recolectado.
- Si en ensayo de actividad en batch va a realizarse en el transcurso de la primera hora posterior a la recolección de la muestra, pero necesita ser lavada:
  - a. Ajuste la temperatura del bioreactor donde va a tener lugar el ensayo a la temperatura de interés. Colecte el lodo al final de la etapa aerobia.
  - b. Lave el lodo con la solución mineral (Vea la Sección 2.2.3.3) como se describe a continuación:
    - i. Separe la biomasa mediante sedimentación o centrifugación (2 000-3 000 rpm durante 5 min) y elimine cuidadosamente el volumen teniendo cuidado de no perder biomasa.
    - ii. Reemplace el volumen de sobrenadante con el mismo volumen de solución de nutrientes y mezcle suavemente durante 5 minutos.
    - iii. Repita el procedimiento de lavado anterior al menos una vez más.
    - iv. Después del último ciclo de lavado separe la biomasa mediante sedimentación o centrifugación (2 000-3 000 rpm durante 5 min) y resuspenda el lodo en igual volumen de la solución mineral.
    - v. La muestra lavada debe tener la misma concentración de SSLM que la de la planta a escala real o la del laboratorio de donde fue tomada. Por tanto, defina y ajuste el volumen de la solución mineral añadida para resuspender el lodo lavado con el objetivo de

- tener la misma concentración de SSLM que la de la fuente que le dio origen.
- c. Transfiera la muestra de lodo lavado al bioreactor donde tendrá lugar el ensayo en batch.
  - d. Adicione la solución de ATU (si es aplicable para el objetivo del ensayo) hasta una concentración final de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (ver la Sección 2.2.3.3).
  - e. Realice un mezclado lento (50-100 rpm) y vigile la temperatura del lodo colocando un termómetro dentro del bioreactor (si no lo tiene incorporado).
  - f. Mantenga la agitación hasta que el lodo tenga la temperatura deseada para el ensayo durante al menos 30 min.
  - g. Inicie la aireación del lodo antes que la concentración de OD sea inferior a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , al mismo tiempo mantenga la agitación hasta el momento de iniciar el ensayo.
  - h. Debido a la exposición del lodo a condiciones aireadas y no aireadas, se recomienda usar este lodo solamente para realizar ensayos de actividad en batch que se inicien en la fase anaerobia (anaerobia-(anóxica)-aerobia). No se recomienda la realización de ensayos que inicien en las fases anóxicas o aerobias porque las etapas de lavado pueden producir disminución del PHA intracelular y del contenido de poli-P como consecuencia de la manipulación.
- Si como consecuencia de la localización y la distancia no puede realizarse el ensayo dentro de las primeras 2 h posteriores a la recolección de la muestra, pero si antes de las 24 h:
    - a. Ajuste la temperatura del bioreactor a la deseada para el ensayo.
    - b. Mantenga la muestra fría hasta el momento de realizar el ensayo, manteniendo el recipiente que lo contiene a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , y evitando la aireación de la muestra.
    - c. Con anterioridad al inicio del ensayo, extráigalo del sistema de refrigeración.
    - d. Agite lentamente el contenido para obtener una mezcla homogénea y representativa con una concentración similar de SSLM que la que estaba presente originalmente en el laboratorio o a escala real de donde fue tomada.
    - e. Si la muestra requiere ser lavada, esa operación se hace con solución mineral (ver Sección 2.2.3.3). En otro caso, ignore la etapa de lavado.
      - i. Separe la biomasa mediante sedimentación o centrifugación (2 000-3 000 rpm durante 5 min) y remueva cuidadosamente el sobrenadante evitando la pérdida de biomasa.
      - ii. Reemplace el volumen de sobrenadante con el mismo volumen de solución de nutrientes y agite lentamente durante 5 minutos.
      - iii. Repita el procedimiento de lavado al menos una vez más.
      - iv. Después del último ciclo de lavado separe la biomasa mediante sedimentación o centrifugación (2 000-3 000 rpm durante 5 min) y resuspenda el lodo en un volumen similar de una solución de nutrientes.
      - v. La muestra lavada debe tener la misma concentración de SSLM que la de la planta completa o la de laboratorio de donde fue tomada. Por tanto, defina y ajuste el volumen de la solución mineral añadida para resuspender el lodo lavado, con el objetivo de tener la misma concentración de SSLM que la de la fuente que le dio origen.
- f. Transfiera el lodo lavado al bioreactor donde se realizará el ensayo de actividad en batch.
  - g. Adicione la solución de ATU hasta que se alcance una concentración final de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (ver Sección 2.2.3.3).
  - h. Inicie la aireación de la muestra de lodo manteniendo una concentración de OD superior a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  mientras se agita lentamente.
  - i. Vigile la temperatura del lodo colocando un termómetro dentro del bioreactor (si no lo tiene incorporado).
  - j. Mantenga la aireación y agitación al menos durante 1 h (máximo 2 h) pero asegurando que el lodo esté expuesto a la temperatura deseada al menos durante 30 min.
  - k. Si después del ajuste de temperatura se detecta nitrato (ver Sección 2.2.2.3 sobre preparación de la muestra de lodo activado), detenga la aireación y agite suavemente hasta que no se observe más nitrato. Posteriormente el lodo debe ser usado inmediatamente para iniciar y ejecutar la fase anaerobia del ensayo.
  - l. Si la muestra fue lavada, entonces se puede usar el lodo para realizar el ensayo de actividad, pero iniciando en la fase anaerobia (anaerobia-(anóxica)-aerobia), debido a que durante la etapa de lavado puede disminuir el contenido intracelular de PHA y poli-P como consecuencia de la preparación de la muestra. La etapa anaerobia se necesita para reponer el contenido de PHA de la biomasa.



## 2.2.4 Ensayos de actividad EBPR en batch: implementación

Una vez que la configuración experimental, materiales, soluciones y el lodo activado están listos, puede realizarse el ensayo experimental en batch. Para facilitar la ejecución exitosa del ensayo, así como para el registro y almacenamiento de datos debe concebirse de antemano un plan de implementación. La Tabla 2.2.10 (presentada y descrita más adelante) presenta una planilla que se propone para reflejar un plan de implementación experimental. El plan propuesto a

modo de ejemplo puede ser usado con las modificaciones que requiera la realización de cada ensayo de los descritos en las secciones que siguen. Debido al metabolismo particular de los cultivos EBPR, los ensayos de actividad en batch para la remoción de fósforo incluyen varias combinaciones de procesos anaerobios, anóxicos y aerobios, dependiendo del propósito del ensayo.

Por ello, en este capítulo serán presentados los ensayos de actividad en batch para la remoción de fósforo (ensayos EBPR) que se mencionan a continuación:

Código del ensayo	Condiciones redox	Breve descripción y propósito
<b>EBPR.ANA.1</b>	Anaerobio	Realizado en ausencia de fuente externa de carbono para estudiar la actividad de mantenimiento endógeno de los cultivos EBPR
<b>EBPR.ANA.2</b>	Anaerobio	Realizado después de la adición de una concentración definida de carbono para determinar la máxima actividad anaerobia de los cultivos EBPR
<b>EBPR.ANA.3</b>	Anaerobio	Conducido después de la adición, en exceso, de una fuente de carbono, para estimar la máxima actividad anaerobia de los cultivos EBPR en condiciones no limitantes de carbono
<b>EBPR.ANOX.1</b>	Anoxico	Realizado con muestras de lodo activado recolectadas al final de la fase o etapa anaerobia
<b>EBPR.ANOX.2</b>	Combinación anaerobio-anóxico	Ensayo anaerobio-anóxico realizado con lodo recolectado al final de la etapa anaerobia
<b>EBPR.AER.1</b>	Aerobio	Realizado con lodo recolectado al final de la etapa anaerobia o anóxica para evaluar la actividad aerobia de los EBPR
<b>EBPR.AER.2</b>	Combinación anaerobio-aerobio	Ensayo anaerobio-aerobio realizado con lodo recolectado al final de la etapa aerobia
<b>EBPR.AER.3</b>	Combinación anaerobio-anoxic-aerobio en serie	Ensayo Anaerobio-anóxico-aerobio realizado con lodo recolectado al final de la etapa aerobia, para evaluar la actividad EBPR de la secuencia anaerobio-anóxico-aerobio
<b>EBPR.AER.4</b>	Combinación anaerobio-anóxico-aerobio en paralelo	Después de realizar la fase anaerobia común, se ejecuta en paralelo una fase anaerobia y una anóxica, con el mismo lodo, para comparar las actividades EBPR entre esas variantes.

### 2.2.4.1 Ensayos anaerobios de actividad EBPR en batch

La duración de un ensayo de actividad en batch puede ir desde 1 h hasta un máximo de 8 h. Teniendo en cuenta que la biomasa es muy sensible a la temperatura y pH, los ensayos deben realizarse a la temperatura y pH de interés, evitando sus variaciones, así como la presencia de cualquier aceptor externo de electrones (oxígeno molecular, nitrato o nitrito) (esto es, en condiciones estrictamente anaerobias). Se recomienda utilizar bioreactores herméticos para eliminar o minimizar la posible entrada de oxígeno. Si es posible, puede inyectarse gas N<sub>2</sub> durante la ejecución del ensayo. Para remover el nitrato presente en la muestra debe añadirse

ATU durante su preparación (antes que sea aireada). Agite el lodo lentamente durante algunos minutos para eliminar el nitrato residual.

Dependiendo de los propósitos del ensayo anaerobio, cambiará la disponibilidad y presencia del compuesto donante de electrones. Los siguientes ensayos anaerobios se presentan frecuentemente:

**1. Ensayo EBPR.ANA.1** Realizado en ausencia de fuente externa de carbono, para evaluar la actividad anaerobia de mantenimiento endógeno de cultivos EBPR.

**2. Ensayo EBPR.ANA.2** Realizado después de adicionar una concentración definida de carbono (que debe ser consumida totalmente durante el ensayo): para

determinar la máxima velocidad de consumo o asimilación carbono, la máxima velocidad de liberación de fósforo, la constante de media saturación de consumo de carbono y la estequiometría asociada como la relación P-liberado/ del carbono consumido.

**3. Ensayo EBPR.ANA.3** Ejecutado después de adicionar carbono en exceso (más del que puede ser consumido por las EBPR durante el ensayo) a partir de una fuente externa, para estimar la máxima concentración de fósforo que puede ser liberada y la máxima concentración de carbono que puede ser consumido por cultivos EBPR en condiciones no limitantes de carbono.

Además de que la presencia y fuente de carbono es de suma relevancia en los procesos de remoción de fósforo (procesos EBPR), la colección y preparación del lodo es importante. Para ejecutar estos ensayos es preferible obtener el lodo al final de la etapa aerobia (de esa manera se minimiza la influencia de la fuente de carbono original), independientemente de que sea lavado o no. Entonces, dependiendo de la presencia y disponibilidad de la fuente externa de carbono, se sugieren los siguientes protocolos para la realización de ensayos anaerobios en batch:

**Ensayo EBPR.ANA.1 Ensayo anaerobio en batch realizado en ausencia de un compuesto donante externo de electrones**

- a. Después de coleccionar el lodo, prepárelo y transfíralo al bioreactor donde se realizará el ensayo en batch (ver Sección 2.2.3.5), mantenga la muestra aireada durante al menos 30 min mientras confirma que el pH y la temperatura tienen los valores de interés. De otra manera, procure ajustarlo utilizando las posibilidades que tiene para ello. Espere hasta que se alcancen condiciones estables.
- b. Una vez que se haya alcanzado estabilidad en las condiciones de trabajo deseadas, y antes de iniciar el ensayo, se recolecta la primera muestra de la fase acuosa y de biomasa unos 20 minutos antes de iniciar el ensayo, para determinar las concentraciones iniciales de los parámetros de interés: carbono, fósforo total (P-total), fosfato, SSLM y SSVLM. También se coleccionan muestras para la determinación de PHAs y glucógeno para valorar la estequiometría anaerobia de conversión. Se recomienda recolectar muestra del medio utilizado para revisar y verificar sus concentraciones iniciales.
- c. Para extraer la muestra conecte la jeringa, abra o libere la presilla que mantiene cerrado el puerto de

la toma, recoja y expulse varias veces con la jeringa (usualmente alrededor de 5 veces) hasta que colecciona una muestra homogénea. Una vez llena la jeringa con la muestra, cierre la presilla y quite la jeringa.

- d. Las muestras para determinar componentes solubles debe ser filtrada inmediatamente (a través de un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ). Otras muestras, como aquellas para determinar PHAs y glucógeno, serán preparadas de acuerdo al protocolo correspondiente ya explicado con anterioridad.
- e. Mientras se realiza el ensayo, las muestras se guardan temporalmente en refrigeración 4  $^{\circ}\text{C}$  (o preferiblemente en una caja con hielo).
- f. Detenga la aireación 10 min antes de iniciar el ensayo y cierre el bioreactor.
- g. En caso de contar con la disponibilidad de gas nitrógeno, inyéctelo al bioreactor y mantenga esa inyección durante todo el ensayo. Debe estar prevista una salida de gases para que el nitrógeno no produzca una sobrepresión en el bioreactor, que pueda ser causa de inundación y pérdida de biomasa. Si el nitrógeno no puede inyectarse de manera continua, hágalo al menos durante 10 min (para eliminar el oxígeno presente y evitar su entrada puede utilizar alternativamente otro gas que sea inerte al medio). Posteriormente mantenga hermético el bioreactor.
- h. Inicie la realización del ensayo anaerobio “en el tiempo cero”. Controle el tiempo de ejecución con un cronómetro.
- i. Duración y toma o colección de muestra:
  - i. Si solamente se va a determinar la velocidad de liberación endógena anaerobia de fósforo el ensayo puede durar 1 h o como máximo 2 h, tomando muestras cada 15 min para determinar el ortofosfato liberado por la biomasa (PAOs), en ausencia de una fuente externa de carbono.
  - ii. Si además se desea estimar la velocidad de conversión anaerobia endógena de glucógeno y las estequiometrías asociadas, el ensayo debe durar más de 6 u 8 h (recomendado). Deben coleccionarse muestras para fosfato cada 30 min, junto con las muestras para la determinación de PHAs y glucógeno.
  - iii. Si además se desea estimar la velocidad de conversión anaerobia endógena de glucógeno y la estequiometrías asociadas, además deben recolectarse muestras para la determinación de PHAs y glucógeno.
  - iv. Finalice el ensayo anaerobio recolectando muestras para la determinación de las concentraciones de DQO, fósforo total (P-total,

- SSLM y SSVLM, al igual que de PHAs y glucógeno (si es aplicable al caso).
- j. Asegure que durante el ensayo en batch no haya variaciones significativas de pH ( $\pm 0.1$ ) o temperatura (mayor que 1 °C), y que la concentración de OD permanezca por debajo de los límites de detección. Verifique que todos los electrodos utilizados estén recientemente calibrados.
  - k. Organice las muestras y asegure que todas estén completas y adecuadamente etiquetadas para evitar confundir las muestras u otros errores triviales.
  - l. Hasta que las muestras no sean analizadas, presérvelas y almacénelas según se recomienda en el procedimiento analítico.
  - m. Limpie todo el equipo e instrumental utilizado y tenga la precaución de su adecuada preservación.
  - n. Guarde parte del lodo empleado en el ensayo para un posible interés posterior (por ejemplo, para identificación microbiológica, ver capítulos 7 y 8).

**Ensayo EBPR.ANA.2 Ensayo anaerobio de EBPR en batch realizado en condiciones de la adición definida de un compuesto donante de electrones**

- a. Repita las etapas desde la “a” hasta la “g” del ensayo EBPR.ANA.1.
- b. Para ensayos anaerobios realizados con la presencia de una fuente externa de carbono (donante de electrones), el “tiempo cero” de inicio estará dado por el instante en el que se adicione el agua residual como donante de electrones, ya sea real o sintética,).
- c. Para realizar los ensayos se recomiendan las siguientes concentraciones de SSVLM y de RBDQO, en dependencia del origen de la muestra de lodo:
  - i. Muestras de lodo procedentes de un sistema de lodo activado de una planta a escala real: se sugiere adicionar RBDQO hasta alcanzar en el bioreactor una relación inicial de RBDQO/SSVLM entre 0.025 y 0.050 mg DQO mg SSV<sup>-1</sup>. Para ello, agregar la fuente de RBDQO con lodo activado fresco en una cantidad tal que la concentración inicial de RBDQO en el reactor esté entre 50 and 100 mg DQO L<sup>-1</sup> y la concentración inicial de SSVLM alrededor de 2 000 mg SSV L<sup>-1</sup>. Es preferible una baja relación RBDQO/SSVLM para asegurar todo el consumo de RBDQO durante el ensayo anaerobio.
  - ii. Muestras de lodo procedentes de un sistema de lodo activado a escala de laboratorio: se sugiere adicionar RBCOD hasta alcanzar en el

bioreactor una relación inicial de RBDQO/SSVLM entre 0.05 y 0.10 mg DQO mg SSV<sup>-1</sup>. Por ejemplo, la concentración inicial de RBDQO y SSVLM después de mezclado pueden estar contenidos dentro del intervalo comprendido entre los 100 y 300 mg DQO L<sup>-1</sup> y entre 2000 y 3000 mg SSV L<sup>-1</sup>, respectivamente. También se aceptan concentraciones mayores en la medida que la DQO sea totalmente consumida en el tiempo que dure la etapa anaerobia. Sin embargo, deben evitarse concentraciones de DQO superiores a 800 mg DQO L<sup>-1</sup> debido a que puede inhibir la biomasa (observación personal del autor).

- d. Después de la adición del agua residual, controle el tiempo de ejecución y de la toma de muestra con el cronómetro
- e. Duración y toma de muestra:
  - i. Los ensayos pueden durar entre 2 y 4 h.
  - ii. Para determinar los parámetros cinéticos anaerobios: las muestras para medir la DQO soluble y el fosfato deben recolectarse cada 5 min durante los primeros 30-40 min de ejecución del ensayo. Después de ese período la frecuencia de la toma de muestra puede reducirse a 10-15 min durante la primera hora y posteriormente cada 15-30 min hasta concluir el ensayo.
  - iii. Si es de interés la cinética de conversión anaerobia de PHAs y glucógeno: las muestras deben recolectarse al mismo tiempo que las muestras para la determinación de DQO y fosfato.
  - iv. Concluya el ensayo anaerobio con la toma de muestras para la determinación de la concentración de la fuente de carbono y/o DQO (como se desee dependiendo de los parámetros de interés), P-total, SSLM y SSVLM, así como las concentraciones de PHAs y glucógeno (si fuese requerido).
- f. Repita las etapas ‘j’ a ‘n’ del ensayo EBPR.ANA.1.

**Ensayo EBPR.ANA.3 Ensayos anaerobios EBPR en batch realizados después de la adición de un compuesto donante de electrones en exceso**

- a. Repita las etapas desde ‘a’ hasta ‘g’ del ensayo EBPR.ANA.1.
- b. Para ensayos anaerobios realizados con la presencia de una fuente externa de carbono (donante de electrones), el “tiempo cero” de inicio estará dado

por el momento en el que se adicione el agua residual, ya sea real o sintética, como donante de electrones.

c. Para realizar los ensayos se recomiendan las siguientes concentraciones de de SSVLM y de RBCOD, en dependencia del origen de la muestra de lodo:

i. Muestras de lodo procedentes de plantas completas de lodo activado: Realice el ensayo anaerobio con una relación inicial de RBDQO/SSLM en el bioreactor (después de mezclar la solución fuente de carbono con el lodo) mayor a  $0.15 \text{ mg DQO mg SSV}^{-1}$ . Para ello, a muestras de lodo con una concentración de SSVLM de  $2\,000 \text{ mg L}^{-1}$  aproximadamente, se adiciona  $300 \text{ mg DQO L}^{-1}$  de RBDQO de la fuente seleccionada. Aunque puede adicionarse una concentración de RBDQO mayor, nunca debe sobrepasar  $800 \text{ mg DQO L}^{-1}$  ya que ha sido demostrado que puede ser inhibitorio para los cultivos EBPR (observación personal del autor). Si se consume todo el RBDQO, debe adicionarse más RBDQO hasta que quede una fracción sin ser consumida. Una manera indirecta de conocer si el lodo ha alcanzado su máxima capacidad de remoción de RBDQO es siguiendo el perfil de la concentración de fosfato durante la realización del ensayo. Esto puede aplicarse si durante la alimentación adicional de RBDQO no hay un incremento considerable en la concentración de fosfato (por ejemplo, concentraciones menores de  $2\text{-}3 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$  durante 30-60 min, que son las que corresponden a la liberación endógena anaerobia de fósforo (P)).

ii. Muestras de lodo procedentes de sistemas de lodo activado a escala de laboratorio: de manera similar a las muestras de lodo de plantas completas, aplique una relación inicial RBDQO/SSVLM en el bioreactor mayor de  $0.2 \text{ mg DQO mg SSV}^{-1}$  (después de mezclar la solución fuente de carbono con el lodo). Cultivos procedentes del laboratorio, particularmente de sistemas EBPR, tienen una alta capacidad de remoción de RBDQO, por tanto es posible que se requiera repetir la adición más de dos veces hasta que no se observe mayor reducción de RBDQO. De esta manera, para muestras de lodo con una concentración de SSVLM entre  $2\,000$  y  $3\,000 \text{ mg L}^{-1}$ , se adiciona al menos  $400 \text{ mg DQO L}^{-1}$  de RBCOD de la fuente seleccionada, pero evite adicionar más de  $800 \text{ mg DQO L}^{-1}$  (debido a la potencial

inhibición sobre el cultivo de EBPR). Si todo el RBDQO es consumido, puede añadirse más RBDQO hasta que se observe DQO residual. Una manera indirecta de conocer si el lodo ha alcanzado su máxima capacidad de remoción de RBDQO es siguiendo el perfil de la concentración de fosfato durante la realización del ensayo. Esto puede aplicarse si durante la alimentación adicional de RBDQO no hay incremento considerable de la concentración de fosfato (por ejemplo, concentraciones menores de  $2\text{-}3 \text{ PO}_4\text{-P L}^{-1}$  durante 30-60 min, que son las que corresponden a la liberación de fósforo (P)).

d. Inicie la realización del ensayo anaerobio “en el tiempo cero” una vez que adicione el agua residual. Controle el tiempo de ejecución mediante cronómetro.

e. Duración y toma de muestra:

i. Para lodo procedente de plantas a escala real, los ensayos pueden durar más de 2-4 h y las procedentes de escala de laboratorio aún más, dependiendo del contenido de poli-P y glucógeno en la biomasa.

ii. Para determinar los parámetros cinéticos anaerobios, las muestras para medir la DQO soluble y el fosfato deben recolectarse cada 5 min durante los primeros 30 min de ejecución del ensayo. Después de ese período la frecuencia de la toma de muestra puede reducirse a 10-15 min durante la primera hora y posteriormente cada 15-30 min hasta concluir el ensayo.

iii. Si la cinética de conversión anaerobia de PHAs y glucógeno es de interés, las muestras deben recolectarse al mismo tiempo que las muestras para la determinación de DQO y fosfato.

iv. Para la estequiometría de las conversiones, deben tomarse muestras de PHAs y glucógeno al inicio y final de los ensayos.

v. Antes de concluir los ensayos, añada una concentración adicional de DQO. Espere durante 10-15 min y tome la última muestra para la determinación de DQO y  $\text{PO}_4^{3-}$ . Si no se aprecia más consumo de DQO ni producción de fósforo, puede confirmarse que el ensayo fue realizado en condiciones no limitantes en DQO.

iv. Concluya el ensayo anaerobio con la colección de muestras para determinar las concentraciones de DQO, P-total,  $\text{PO}_4^{3-}$ , SSVLM y SSVLM, así como de PHAs y glucógeno (si se necesita).

f. Repita los pasos o etapas de la 'j' hasta la 'n' del ensayo EBPR.ANA.1.

### 2.2.4.2 Ensayos anóxicos de actividad EBPR en batch

La remoción simultánea de fósforo (ortofosfato) y nitrógeno (nitrato y nitrito) por las bacterias acumuladoras de fósforo (PAOs) puede evaluarse en ensayos de actividad anóxicos en batch de estos organismos. Los estudios pueden realizarse empleando muestras procedentes de plantas a escala real o de escala de laboratorio, utilizando agua residual real o soluciones sintéticas. Es importante que la biomasa EBPR posea almacenado suficiente PHAs intracelularmente para que esté disponible como fuente de carbono y energía: para el consumo de P, formación de glucógeno, crecimiento de biomasa, y mantenimiento, cuando sea expuesta a condiciones anóxicas (Figura 2.2.1). En cualquier caso, no puede suministrarse ninguna fuente externa de carbono. Las muestras de lodo deben recolectarse al final de la etapa o fase anaerobia en la que los RBDQO hayan sido totalmente consumidos y que por tanto no esté presente en el lodo activado. Para asegurar la disponibilidad de los PHAs debe tener muy presente no lavar el lodo activado o biomasa entre el momento que se colecte y se manipule al final de la etapa anaerobia y el inicio del ensayo en batch. Solamente bajo condiciones excepcionales (por ejemplo, sospecha de presencia de compuestos tóxicos) puede lavarse el lodo, y en ese caso, en la medida que se hayan creado condiciones anaerobias para el procedimiento de lavado (procedimiento muy complicado desde el punto de vista práctico). Como alternativa, el lodo puede recolectarse al final de la etapa aerobia y el ensayo de EBPR anóxico iniciarse entonces en la etapa anaerobia anterior (ensayo anaerobio) bajo la adición definida del donante de electrones (similar al ensayo EBPR.ANA.2 descrito en la Sección 2.2.4.1). Entonces, se sugieren los siguientes ensayos de actividad anóxica en batch:

**1. Ensayo EBPR.ANOX.1** Ensayo anóxico simple con EBPR, realizado con muestras de lodo activado recolectadas al final de la etapa anaerobia.

**2. Ensayo EBPR.ANOX.2** Combinando ensayos anaerobio-anóxico en batch con EBPR. El ensayo anóxico se realiza después de la etapa anaerobia precedente, con lodo tomado al final de la etapa aerobia.

La descripción de cada ensayo se presenta a continuación:

#### Ensayo EBPR.ANOX.1 Ensayo anóxico simple en batch, con EBPR

- a. Colecte la muestra de lodo activado de la planta a escala real o del sistema a escala de laboratorio al final de la etapa aerobia. Prepare y transfiera el lodo al bioreactor en el que se realizará el ensayo en batch, según se describe en la Sección 2.2.3.5. Mantenga la muestra en condiciones anaerobias durante al menos 30 min mientras confirma que el pH, la temperatura y el OD tengan los valores de interés (en otro caso, ajústelo y espere hasta que se alcancen condiciones estables).
- b. Repita los pasos desde 'b' hasta 'e' del ensayo EBPR.ANA.1.
- c. En caso de haber disponibilidad de gas nitrógeno, inyéctelo al bioreactor y mantenga esa inyección durante todo el ensayo. Debe estar prevista una salida de gases para que el nitrógeno no produzca una sobrepresión en el bioreactor, que pueda ser causa de inundación y pérdida de biomasa. Si el nitrógeno no puede inyectarse de manera continua, hágalo al menos durante 10 min (para eliminar el oxígeno presente y evitar su entrada puede utilizar alternativamente otro gas que sea inerte al medio). Posteriormente mantenga hermético el bioreactor.
- d. Inicie la ejecución del ensayo EBPR anóxico en el “tiempo cero”, con la adición de nitrato o nitrito (dependiendo del aceptor final de electrones de interés). Deben establecerse las mismas condiciones recomendadas para los ensayos anaerobios (ver ensayo EBPR.ANA.1) para evitar la entrada de oxígeno.
- e. Duración y toma de muestras para el ensayo anóxico EBPR en batch:
  - i. El ensayo anóxico EBPR puede durar entre 2 y 4 h.
  - ii. Dependiendo del aceptor final de electrones:
    - Ensayo anóxico EBPR con el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) como aceptor terminal de electrones:  
Al inicio de la etapa anóxica se adiciona al lodo  $20 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$ . No se recomienda una concentración mayor cuando el lodo no está expuesto habitualmente a esas altas concentraciones. Sin embargo, si todo el nitrato adicionado se consume, otros  $20 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$  pueden agregarse para prolongar la etapa anóxica hasta que no se observe más consumo anóxico de fósforo.
    - Ensayo anóxico EBPR con nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) como aceptor terminal de electrones:



No es usual que las muestras de lodo activado estén expuestas a altas concentraciones de nitrito a menos que estén adaptados a este aceptor de electrones (en casos excepcionales). Entonces, al inicio de la etapa anóxica puede adicionarse hasta una concentración de 20 mg NO<sub>2</sub>-N L<sup>-1</sup>. Sin embargo, no se recomienda agregar más de 10 mg NO<sub>2</sub>-N L<sup>-1</sup> cuando las muestras de lodo activado no están regularmente expuestas a altas concentraciones de nitrito. En este último caso, si todo el nitrito se consume, pueden agregarse 10 mg NO<sub>2</sub>-N L<sup>-1</sup> para asegurar la disponibilidad del aceptor de electrones, y extender la fase anóxica hasta que no se aprecie más consumo anóxico de fósforo.

- iii. En el caso en el que la determinación analítica de nitrato o nitrito no pueda hacerse lo suficientemente rápido como para seguir su presencia durante el ensayo, pueden utilizarse tiras de detección cualitativa rápida (Sigma-Aldrich) (y en cierta medida tener una idea de su concentración) y conocer si las condiciones anóxicas están aún presentes o si debe dosificarse más nitrito o nitrato.
- iv. Para la estimación de los parámetros cinéticos anóxicos deben recolectarse muestras del compuesto que se utiliza como fuente de carbono (o DQO soluble, según interese), y fosfato. Durante los primeros 30 min del ensayo, las muestras deben colectarse cada 5 min. Después de ese período la frecuencia puede reducirse a 10 o 15 min durante la primera hora y más tarde a 15 o 30 min hasta concluir el ensayo.
- v. En caso que interese conocer la cinética de conversión de los PHAs y el glucógeno, las muestras correspondientes pueden tomarse al mismo tiempo que las de la determinación del fosfato.
- vi. Para estimar la estequiometría de las conversiones anóxicas deben tomarse muestras (al inicio y al finalizar la fase anóxica) para la determinación de P-total, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SSLM, SSVLM, así como de PHAs y glucógeno (en caso necesario).
- f. Concluya el ensayo anóxico con la colección de las últimas muestras que necesite para la estimación de la estequiometría de conversión anóxica.

- g. Repita los pasos desde 'j' hasta 'n' del ensayo EBPR.ANA.1

#### **Ensayo EBPR.ANOX.2. Ensayo en batch de la combinación anaerobia-anóxica de EBPR**

- a. Repita los pasos desde el 'a' hasta el 'g' del ensayo EBPR.ANA.1 y los pasos desde el 'b' hasta el 'f' del ensayo EBPR.ANA.2. Continúe posteriormente con la ejecución de la etapa anóxica.
- b. En cuanto termine la etapa anaerobia del ensayo, comience la anóxica, con la adición de nitrato o nitrito (Ensayo EBPR.ANOX.1, paso 'd'). Para evitar la entrada de oxígeno, se aplican las mismas condiciones de operación que para los ensayos anaerobios (Ensayo EBPR.ANA.1).
- c. Duración y toma de muestras del ensayo anóxico EBPR en batch: repita el paso 'e' del ensayo EBPR.ANOX.1.
- d. Repita los pasos desde el 'j' hasta el 'n' del ensayo EBPR.ANA.1.

#### **2.2.4.3 Ensayos aerobios de actividad EBPR en batch**

Los ensayos EBPR aerobios en batch se ejecutan para evaluar el consumo de orto-fosfato por los PAOs en sistemas de lodo activado. Este ensayo puede realizarse con lodo activado procedente de una planta a escala real o de un sistema a escala de laboratorio, y lo mismo sea empleando agua residual real que una solución preparada al efecto (agua residual sintética). Al igual que ocurre en los ensayos anóxicos, en los aerobios es importante que cuando la biomasa EBPR se exponga al ambiente aerobio, tenga almacenado intracelularmente suficiente PHA disponible sobretodo para que sirva como fuente de carbono y de energía necesarias para propiciar la remoción de fósforo, entre otros procesos (Figura 2.2.1). Para asegurar la disponibilidad del PHA almacenado intracelularmente, el ensayo aerobio en batch debe: (i) realizarse con muestras de lodo activado recolectadas al final de la fase anaerobia o anóxica (dependiendo de la configuración de la instalación de tratamiento) o, en su defecto, (ii) realizado de un ensayo anaerobio en batch y antes que se ejecute el ensayo aerobio. En cualquiera de los casos no debe añadirse ninguna fuente externa de carbono mientras tenga lugar la fase aerobia. Así, las muestras deben tomarse al final de la fase anaerobia, en la medida que no se detecte presencia de RBDQO. Alternativamente, el ensayo aerobio puede realizarse de un modo secuencial a continuación de un ensayo anaerobio-anóxico (ensayo

EBPR.ANOX.1) resultando en un ensayo secuencial anaerobio-anóxico-aerobio o también en paralelo con un ensayo anóxico después de la realización de un ensayo anaerobio (ensayo EBPR.ANA.2) (Wachtmeister *et al.*, 1997). Se recomienda insistentemente evitar el lavado del lodo activado o biomasa entre el muestreo y manipulación del lodo a la salida de la etapa anaerobia o anóxica. Si la biomasa necesita ser lavada (por ejemplo, si se sospecha de presencia de sustancia tóxica), entonces siempre tendría que realizarse un ensayo anaerobio en presencia de un donante de electrones (ensayo EBPR.ANA.2), previo a la ejecución del ensayo aerobio. Entonces, se proponen los siguientes ensayos aerobios EBPR en batch (con y sin las etapas anaerobias o anóxicas precedentes):

**1. Ensayo EBPR.AER.1** Un ensayo aerobio sencillo o simple con organismos acumuladores de fósforo (EBPR) realizado en el lugar de procedencia del lodo con lodo recolectado al final de una etapa anaerobia o anóxica para evaluar la actividad aeróbica EBPR sobre los polímeros intracelulares almacenados en el lodo.

**2. Ensayo EBPR.AER.2** Combinación de ensayos (conjuntos) con EBPR batch con etapas en serie, anaerobio-anóxico, realizados para asegurar la concentración de PHAs que cubra los requerimientos del metabolismo aerobio utilizando lodo del final de una etapa aerobia.

**3. Ensayo EBPR.AER.3** Combinación de ensayos (conjuntos) con EBPR en batch empleando etapas en serie, anaerobia-anóxico-aerobia, conducida con lodo muestreado al final de una etapa aerobia para evaluar la actividad EBPR secuencial anaerobia-anóxico-aerobia, después de asegurar tener almacenada intracelularmente una concentración definida de PHAs.

**4. Ensayo EBPR.AER.4** Combinación ensayos con EBPR en batch, empleando las etapas anaerobio-anóxico-aerobio en paralelo conducida con una muestra de lodo tomada al final de una etapa aerobia para evaluar las actividades anóxica y aerobia en paralelo, después de una etapa anaerobia. Como la etapa anaerobia es una etapa común a ambos, la cantidad de polímeros intracelulares almacenados será la misma al inicio de los ensayos anóxico y aerobio. Así ambas actividades EBPR pueden ser comparadas entre sí, y en algunos casos conducidos en paralelo (posibilidad reservada para los investigadores más experimentados).

La descripción de las diferentes etapas involucradas en la ejecución de ensayos aerobios en batch empleando organismos acumuladores de fósforo (EBPR) es la siguiente:

### Ensayos EBPR.AER.1 Ensayos sencillos EBPR aerobios

- a. Colecte el lodo en la etapa anaerobia o anóxica siguiendo las recomendaciones para la toma de muestras y preparación del lodo activado descrito en la Sección 2.2.3.5. Es importante destacar que el ensayo aerobio sencillo solamente se puede realizar cuando se ejecuta inmediatamente después de la toma de la muestra de lodo (preferiblemente evitando el procedimiento lavado).
- b. Después que el lodo activado ha sido transferido deben mantenerse las mismas condiciones redox que prevalecían en el tanque de donde procede (anaerobia o anóxica), tal como se describe en la Sección 2.2.3.5 por al menos 30 min, mientras confirma que el pH y la temperatura tienen los valores deseados (en caso contrario, deben ajustarse y esperar hasta que se alcancen condiciones estables). No empiece a airear la muestra y, si es posible, inyecte gas  $N_2$  (u otro gas disponible) para evitar la entrada no controlada de oxígeno.
- c. Repita los pasos desde 'b' hasta 'e' del ensayo EBPR.ANA.1.
- d. El ensayo inicia en el "tiempo cero" con el suministro de aire (u oxígeno puro), asegurando que la concentración de OD del ensayo alcance al menos  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  durante los primeros 10 min de ejecución y alrededor de  $4\text{-}5 \text{ mg L}^{-1}$  pasado ya un tiempo.
- e. Después que inicie el ensayo, vigile cuidadosamente el proceso y el muestreo.
- f. Duración y toma de muestra en la etapa aerobia:
  - i. El ensayo aerobio EBPR dura entre 3 y 4 h.
  - ii. La concentración de OD en el seno del líquido debe vigilarse durante todo el ensayo empleando un electrodo de OD.
  - iii. Para estimar los parámetros cinéticos aerobios deben tomarse muestras para la determinación de  $PO_4^{3-}$  cada 5 min durante los primeros 30-40 min de ejecución del ensayo. Posteriormente, puede reducirse la frecuencia a cada 10-15 min durante la primera hora y por último cada 15-30 min hasta concluir en ensayo.
  - iv. Si se desea calcular la cinética de conversión de PHAs y glucógeno deben tomarse las muestras correspondientes en el mismo momento en que se toman para la determinación de  $PO_4^{3-}$ .
  - v. Para estimar la estequiometría de conversión aerobia, deben tomarse muestras para la determinación analítica, al inicio y final del ensayo, de las concentraciones de P-total,  $PO_4^{3-}$ , SSLM y SSVLM, al igual que para PHAs y

glucógeno (si interesa). Sin embargo el consumo de oxígeno debe determinarse mediante respirometría (como se presenta en el Capítulo 3).

- g. Concluya el ensayo aerobio EBPR en batch con la toma de la última muestra que se necesita para la estimación de la estequiometría de conversión aerobia.
- h. Repita los pasos desde el 'j' hasta el 'n' del ensayo EBPR.ANA.1.

#### **Ensayos EBPR.AER.2 Ensayos EBPR en batch de conjunto (o combinado) anaerobio-anóxico**

- a. Ejecute el ensayo anaerobio como sigue:
- i. Repita los pasos desde 'a' hasta 'g' del ensayo EBPR.ANA.1.
  - ii. Posteriormente ejecute los pasos desde 'b' hasta 'e' del ensayo EBPR.ANA.2.
- b. Inmediatamente después de realizar el ensayo anaerobio, inicie la ejecución del ensayo aerobio en batch con EBPR, inyectando aire u oxígeno puro asegurándose que la concentración de OD alcance al menos  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  dentro de los primeros 10 min de ejecución del ensayo aerobio y alrededor de  $4\text{-}5 \text{ mg L}^{-1}$  posteriormente.
- c. Repita los pasos desde 'f' del ensayo EBPR.AER.1.
- d. Repita los pasos desde 'j' hasta 'n' del ensayo EBPR.ANA.1.

#### **Ensayo EBPR.AER.3 Ensayo EBPR aerobio en batch con combinación anaerobio-anóxico-aerobio en serie**

- a. Ejecute el ensayo anaerobio como sigue:
- i. Repita los pasos desde 'a' hasta 'g' según el ensayo EBPR.ANA.1.
  - ii. Posteriormente, ejecute los pasos desde 'b' hasta 'e' del ensayo EBPR.ANA.2.
- b. Continúe inmediatamente con la realización del ensayo anóxico repitiendo los pasos 'd' y 'e' del ensayo EBPR.ANOX.1.
- c. Después del ensayo anóxico, realice el ensayo aerobio repitiendo los pasos desde el 'd' hasta el 'g' del ensayo EBPR.AER.1.
- d. Repita los pasos desde 'j' hasta 'n' del ensayo EBPR.ANA.1.

#### **Ensayo EBPR.AER.4 Ensayo EBPR aerobio en batch con combinación anaerobio-anóxico-aerobio en paralelo**

- a. Este ensayo requiere dos reactores (preferiblemente iguales): uno de ellos para desarrollar la secuencia anaerobio-anóxico-aerobio y el otro para la

ejecución del ensayo aerobio sencillo o simple. Esto se hace transfiriendo, al final del ensayo anaerobio, un volumen dado (usualmente 50%) del bioreactor donde tendrá lugar el ensayo anaerobio-anóxico, al segundo reactor, que es donde se realizará el ensayo aerobio. Por esta razón se recomiendan las etapas que se describen a continuación:

- b. Ejecute el ensayo anaerobio como se describe:
- i. Repita los pasos desde el 'a' hasta el 'g' del ensayo EBPR.ANA.1.
  - ii. Posteriormente ejecute los pasos desde 'b' hasta 'e' del ensayo EBPR.ANA.2.
- c. Una vez que se haya completado la etapa anaerobia, transfiera el 50% del lodo presente en el bioreactor anaerobio, a un bioreactor vacío (que será el bioreactor aerobio).
- d. Continúe con la ejecución del ensayo anóxico en el mismo reactor en el que tuvo lugar el ensayo anaerobio, repitiendo los pasos 'd' y 'e' del ensayo EBPR.ANOX.1.
- e. En paralelo, ejecute el ensayo aerobio en el segundo reactor (al que fue transferido el lodo), repitiendo los pasos desde el 'd' hasta 'g' del ensayo EBPR.AER.1. Debe destacarse que la ejecución de dos ensayos (anóxico y aerobio) en paralelo demanda mayores habilidades experimentales que otros ensayos. La ejecución de estos dos métodos necesita la participación de dos personas o realizar uno de los dos ensayos posteriores (el aerobio o el anóxico) con un desfase que permita llevar a cabo la toma de muestras y no simultáneamente.
- f. Repita los pasos desde 'j' hasta 'n' del ensayo EBPR.ANA.1.

## **2.2.5 Análisis de datos**

### **2.2.5.1 Estimación de parámetros estequiométricos**

Previo a la estimación de los parámetros estequiométricos y cinéticos, deben validarse los resultados obtenidos y su consistencia. Con ese propósito se realiza un balance de DQO (Barker and Dold, 1995).

Teóricamente en un sistema anaerobio la DQO debe cumplir la ley de la conservación, de manera tal que la DQO que ingresa a la etapa anaerobia debe ser igual a la que sale de la misma (Wentzel *et al.*, 2008). Entonces, asumiendo que la DQO soluble, y los compuestos intracelulares (el PHAs y glucógeno), son los únicos componentes carbónicos involucrados en las

transformaciones químicas, el balance de DQO se formula como sigue:

$$DQO_{B,cons} + DQO_{GLY,cons} = DQO_{PHA,prod} \quad \text{Ec. 2.2.1}$$

Donde:

$DQO_{B,cons}$  es la concentración de sustrato biodegradable consumido, expresado en DQO, durante la duración del ensayo de actividad en batch, mg DQO L<sup>-1</sup>.

$DQO_{GLY,cons}$  es la concentración de glucógeno intracelular consumido durante el ensayo de actividad anaerobia en batch, en mg DQO L<sup>-1</sup>.

$DQO_{PHA,prod}$  es la concentración de PHAs intracelular formado o almacenado durante el ensayo de actividad en batch, expresado en mg DQO L<sup>-1</sup>.

También, el porcentaje de error al realizar el balance de DQO ( $\Delta DQO$  (%)) puede estimarse como:

$$\% \text{ DQO balance} = [1 -$$

$$\frac{DQO_{B,cons} + DQO_{GLY,cons} - DQO_{PHA,prod}}{DQO_{B,cons} + DQO_{GLY,cons} + DQO_{PHA,prod}}] \cdot 100 \quad \text{Ec. 2.2.2}$$

Aunque idealmente el  $\Delta DQO$  (%) debe ser menor que 1-5 %, frecuentemente se han reportado valores tan altos como 15 % y han sido considerados aceptables debido a la incertidumbre en la determinación de algunos parámetros (particularmente del glucógeno). Para obtener mayor información sobre la evaluación de la calidad de los datos, puede consultarse el Capítulo 5.

De manera similar que en las transformaciones anaerobias, el balance de DQO puede constituir una herramienta importante para evaluar la validez de los datos obtenidos en los ensayos de actividad anóxicos y aerobios en batch (Ekama and Wentzel, 2008a,b). Entonces, la cantidad final total de aceptores de electrones consumidos deberá ser igual a la cantidad total de donantes de electrones oxidados. Para las transformaciones aerobias que tienen lugar durante el ensayo EBPR aerobio puede expresarse como:

$$\Delta DQO_{cons} = DQO_{input} - DQO_{output} = \Delta O_{2,cons} \quad \text{Ec. 2.2.3}$$

Asumiendo que los PHAs, el glucógeno (GLY) y la biomasa son los únicos componentes de la DQO que cambian durante la fase anóxica o aerobia, el consumo neto de DQO puede calcularse según:

$$DQO_{PHA,cons} - DQO_{GLY,prod} - DQO_{Bio,prod} = \Delta O_{2,cons} \quad \text{Ec. 2.2.4}$$

Donde:

$DQO_{PHA,cons}$  es la concentración total de consumo de PHA durante el ensayo de actividad aerobia en batch, en mg DQO L<sup>-1</sup>.

$DQO_{GLY,prod}$  es la concentración total de glucógeno producido durante el ensayo de actividad aerobia en batch, expresada como mg DQO L<sup>-1</sup>.

$DQO_{Bio,prod}$  es la concentración total de biomasa producida durante el ensayo de actividad aerobia en batch, expresada como mg DQO L<sup>-1</sup>.

$\Delta O_{2,cons}$  es la concentración total de oxígeno consumido en el ensayo de actividad aerobia en batch, estimado por respirometría y la velocidad de consumo de oxígeno, en mg DQO L<sup>-1</sup> (consultar el Capítulo 3 de Respirometría).

El porcentaje de error en el balance de DQO ( $\Delta DQO$  (%)) puede estimarse como:

$$\% \text{ DQO balance} = [1 -$$

$$\frac{DQO_{PHA,cons} - DQO_{GLY,prod} - DQO_{Bio,prod} - \Delta O_{2,cons}}{DQO_{PHA,cons} + DQO_{GLY,prod} + DQO_{Bio,prod} + \Delta O_{2,cons}}] \cdot 100 \quad \text{Ec. 2.2.5}$$

Idealmente, al igual que en la determinación de los balances de DQO en la etapa anaerobia de las pruebas EBPR de actividad en batch,  $\Delta DQO$ (%) debe ser menor de 1-5 %, pero son aceptables valores de hasta 10 %. El Capítulo 5 brinda diferentes herramientas para evaluar la calidad de los datos obtenidos y estimar los balances de DQO con menor grado de incertidumbre.

El balance de DQO también puede aplicarse en los procesos de actividad anóxica de EBPR en batch, donde el nitrato o el nitrito actúan como aceptores de electrones. Cuando se realiza el balance de DQO en pruebas de actividad en batch en los que el aceptor de electrones no es el oxígeno, se procede de manera similar, pero: (i) las concentraciones del aceptor terminal deben determinarse y ser expresadas en las mismas unidades que la DQO (DQO equivalente), como su capacidad de aceptar electrones, y (ii) el correspondiente rendimiento máximo (Y) de conversión metabólica del electrón final de interés (nitrato o nitrito) debe ser conocido. Para ensayos en los que el nitrato es el aceptor terminal de electrones, puede aceptarse el rendimiento máximo estimado según Kuba *et al.* (1996). Por último y no por eso menos importante, debe tenerse presente que el consumo total

del último aceptor de electrones durante la realización del ensayo de actividad anóxica de EBPR en batch puede ser estimado utilizando los métodos experimentales descritos en el Capítulo 3.

Una vez que la calidad y consistencia de los datos han sido confirmados, pueden estimarse los parámetros estequiométricos y cinéticos. Frecuentemente el fósforo neto liberado (P-neto liberado), la conversión de glucógeno y los PHAs producidos por carbono orgánico o DQO consumido (relaciones  $Y_{VFA\_PO4,An}$ ,  $Y_{Gly/VFA,An}$ ,  $Y_{VFA\_PHA,An}$ ,  $Y_{VFA\_PHB,An}$  y  $Y_{VFA\_PHV,An}$  respectivamente), son los parámetros de interés para evaluar la estequiometría de los procesos EBPR (Tabla 2.2.1).

En lo que concierne la ejecución de ensayos EBPR anaerobios en batch y la determinación de los parámetros estequiométricos en los mismos, la fuente de carbono más comúnmente utilizada es el acetato (Ac). La Figura 2.2.5 muestra una representación gráfica de la determinación de los parámetros estequiométricos y cinéticos por Ac consumido y ortofosfato liberado en un ensayo de actividad anaerobia en batch.

Debe destacarse que el P-neto liberado debe ser estimado después de excluir el fosfato secundario liberado ( $r_{PP\_PO4,Sec,An}$ ). Sin embargo, debido a que la liberación secundaria de fosfato ocurre durante todo el ensayo anaerobio como consecuencia de los requerimientos anaerobios de mantenimiento de las células (aunque usualmente solo puede apreciarse una vez que se agota toda la fuente de carbono), el fosfato acumulado liberado debido al mantenimiento aerobio debe excluirse del fosfato total liberado.

Entonces el P-neto liberado puede ser estimado como:

$$\text{Net } P_{\text{liberado}} = [(\text{Total } PO_4\text{-P}_{\text{liberado}})] - [(r_{PP\_PO4,Sec,An}) \cdot (\text{duración del ensayo})] \quad \text{Ec. 2.2.6}$$

Donde:

$\text{Net } P_{\text{liberado}}$  es el  $PO_4$  liberado debido exclusivamente al consumo de Ac,  $\text{mg } PO_4\text{-P } L^{-1}$ .

$r_{PP\_PO4, Sec, An}$  corresponde al  $PO_4$  liberado debido a los requerimientos del mantenimiento anaerobio de la biomasa  $\text{mg } PO_4\text{-P } L^{-1} h^{-1}$ .

El P-neto liberado puede emplearse para la determinación de la estequiometría anaerobia de la relación  $PO_4/AC$  ( $Y_{Ac\_PO4,An}$ ). Así, por ejemplo, si en un ensayo de actividad en batch el carbono es totalmente consumido, la relación anaerobia P-neto liberado/Ac consumido (que puede ser referida como relación P/C) para un cultivo dado puede calcularse como sigue:

$$Y_{AcPO4,An} = \frac{\text{Net } P_{\text{released}}}{S_{Ac,cons}} = \frac{S_{PO4,ini} - S_{PO4,final}}{S_{Ac,ini} - S_{Ac,final}} \quad \text{Ec. 2.2.7}$$

Donde:

$S_{Ac,cons}$  es la concentración de acetato consumido en el ensayo de actividad en batch,  $\text{mg } L^{-1}$ .

$S_{PO4,ini}$  es la concentración de ortofosfato en el seno del líquido al inicio del ensayo de actividad en batch,  $\text{mg } PO_4\text{-P } L^{-1}$ .

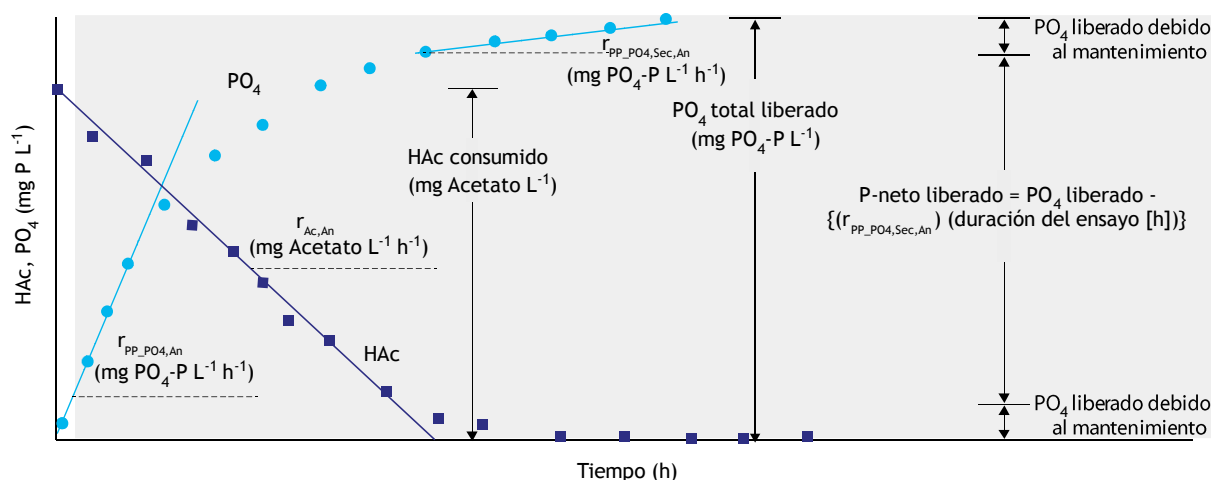
$S_{PO4-P,final}$  es la concentración de ortofosfato en el seno del líquido en el instante en el que toda la concentración de acetato es consumida, o al final del ensayo de actividad en batch si no ha sido consumido todo el acetato,  $\text{mg } PO_4\text{-P } L^{-1}$ .

$S_{Ac,ini}$  es la concentración de acetato en el líquido al inicio del ensayo de actividad,  $\text{mg } L^{-1}$ .

$S_{Ac,final}$  es la concentración de acetato en el líquido al final del ensayo de actividad,  $\text{mg } L^{-1}$ .

Sin embargo, si el carbono no se agota totalmente (por ejemplo, cuando se añade en exceso o la duración del ensayo es lo suficientemente corta como para no dar tiempo a que el carbono se agote), entonces, la diferencia entre la concentración inicial y final de los compuestos puede dividirse por la diferencia entre la concentración inicial y final de carbono (carbono neto consumido). Una aproximación similar puede ser aplicada para la determinación de otras relaciones estequiométricas anaerobias de interés (como la relación entre la hidrólisis anaerobia del glucógeno y PHA producido por carbono consumido). Hay otras relaciones que también son comunes en publicaciones científicas para expresar las conversiones anaerobias, como el uso de C-mol o P-mol en lugar de  $\text{mg } Ac$  o  $\text{mg } PO_4\text{-P}$ . El Apéndice I contiene una serie de coeficientes para la conversión de unidades de ciertos compuestos de interés (por ejemplo, para convertir unidades de ortofosfato de  $\text{g } PO_4\text{-P}$  a P-mmol).





**Figura 2.2.5** Ejemplo de la determinación de la máxima velocidad volumétrica de consumo anaeróbico de Ac y de liberación de ortofosfato ( $\text{PO}_4$ ) en un ensayo de actividad anaeróbica en batch en el que todo el carbono es consumido. Para la estimación del P-neto liberado, el P secundario liberado ( $r_{\text{PP-PO}_4,\text{Sec,An}}$ ) (correspondiente a los requerimientos de mantenimiento endógeno que ocurre durante todo el ensayo anaeróbico), debe excluirse (P-neto liberado = [(Total  $\text{PO}_4$  liberado)] - [( $r_{\text{PP-PO}_4,\text{Sec,An}}$ ) · (duración del ensayo)]). El P-neto liberado puede ser usado para la determinación de la relación estequiométrica anaeróbica  $\text{PO}_4/\text{Ac}$  ( $Y_{\text{Ac-PO}_4,\text{An}}$ ).

A diferencia de los parámetros estequiométricos anaeróbicos, en el caso de los anóxicos y aeróbicos, los parámetros no pueden ser determinados de forma directa. Debido a que los cultivos EBPR tienen diferentes metabolismos intracelulares bajo condiciones anóxicas y aeróbicas, también existen de manera simultánea diferentes conversiones (consumo de poli-P, acumulación intracelular de glucógeno, crecimiento y mantenimiento) (Tabla 2.2.1), el consumo neto del donante de electrones (PHAs) y del aceptor final (oxígeno, nitrato o nitrito) es el resultado de esas cuatro actividades metabólicas simultáneas (Smolders *et al.*, 1994b). No obstante, Smolders *et al.* (1994b) y Kuba *et al.* (1993, 1996), probaron que utilizando modelado metabólico, los cuatro procesos metabólicos (aerobio o anóxico) son dependientes de la relación entre los ATP producidos por NADH consumido durante la respiración anóxica o aerobia (llamada ‘relación- $\delta$ ’ o ‘valor- $\delta$ ’ (Smolders *et al.*, 1994b; Kuba *et al.*, 1996). Esto significa que para los cultivos EBPR, el valor aerobio o anóxico de ‘ $\delta$ ’ debe ser hallado para poder estimar los valores de los diferentes parámetros estequiométricos aeróbicos o anóxicos. Además, independientemente de los diferentes valores  $\delta$  que han sido reportados por la literatura para diversas poblaciones microbianas (en el intervalo entre 1.3 y 2.2) (Lopez-Vazquez *et al.*, 2009a), para cultivos EBPR el efecto del valor- $\delta$  en ese intervalo de valores, no es significativo para las relaciones estequiométricas

aeróbicas y anóxicas. Esto último sugiere que los parámetros estequiométricos son también poco significativos y no hay necesidad de su determinación si la planta a escala real o el sistema a escala de laboratorio opera bajo condiciones normales o condicionales. Sin embargo, si la determinación de  $\delta$  (valor  $\delta$ ) fuese necesaria, deben realizarse dos ensayos, con y sin la presencia de ortofosfato en el seno del líquido y midiendo la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) mediante respirometría (Capítulo 3). Calculando las diferentes velocidades de consumo de fósforo y OUR entre los ensayos realizados con y sin ortofosfato, el valor  $\delta$  puede ser estimado tal como es descrito por Smolders *et al.* (1994b). De manera alternativa, para calcular el valor  $\delta$  puede aplicarse la modelación matemática basándose en los perfiles anóxicos y aeróbicos de PHAs, glucógeno, ortofosfato, velocidad de crecimiento y requerimientos para el mantenimiento (Lopez-Vazquez *et al.*, 2009a). Sin embargo, si persiste el interés por determinar el valor  $\delta$  para cultivos EBPR, se sugiere acudir a la literatura citada, ya que el procedimiento para ello queda fuera del alcance de este libro.

Como referencia y orientación, la Tabla 2.2.3 muestra diferentes parámetros de interés para cultivos de EBPR a escala de laboratorio enriquecidos bajo diferentes condiciones de operación (por ejemplo, fuentes de carbono) y en los que prevalecen los PAOs o GAOs.

**Tabla 2.2.3** Parámetros estequiométricos típicos de interés para cultivos EBPR enriquecidos a escala de laboratorio bajo condiciones estándar (20 °C; pH 7; 7 - 8 d TRS).

	Parámetros estequiométricos	Notación común	Unidades	Valores típicos	Referencia
<b>Cultivos PAO enriquecidos con acetato a escala de laboratorio</b>					
ANAEROBIO	Ortofosfato liberado anaeróbicamente/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PO4,An}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.50	Smolders <i>et al.</i> (1994a)
	Utilización anaerobia de glucógeno/ consumo de Ac	$Y_{Gly/Ac,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.50	
	Formación anaerobia de PHA/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHA,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.22	
	Formación anaerobia de PHB/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHB,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.10	
	Formación anaerobia de PHV/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.12	
	Formación anaerobia de PH <sub>2</sub> MV/ consumo de Ac	$Y_{Ac\_PH2MV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	N/A	
AEROBIO	Formación aerobia de poli-P/consumo de PHA	$Y_{PHA\_PP,Ox}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	3.68	Smolders <i>et al.</i> (1994b)
	Formación aerobia de glucógeno/consumo de Ac	$Y_{PHA\_Gly,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.90	
	Crecimiento aerobio de PAO/consumo de PHA	$Y_{PHA\_PAO,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.74	
	Velocidad aerobia de mantenimiento de PAO	$m_{PAO,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	4x10 <sup>-3</sup>	
	Formación aerobia de poli-P/consumo de oxígeno	$Y_{PP}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	3.27	
	Formación aerobia de glucógeno/consumo de oxígeno por PAO	$Y_{Gly,PAO}$	C-mol mol-O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	3.92	
	Crecimiento aerobio de PAO/consumo de oxígeno	$Y_{PAO}$	C-mol mol-O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	2.44	
	Velocidad de respiración endógena aerobia de PAO	$m_{PAO,O2}$	mol-O <sub>2</sub> C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	4.5x10 <sup>-3</sup>	
<b>Cultivos PAO enriquecidos con propionato a escala de laboratorio</b>					
ANAEROBIO	Ortofosfato liberado anaeróbicamente/ consumo de Pr	$Y_{Pr\_PO4,An}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.42	Oehmen <i>et al.</i> (2005c)
	Utilización anaerobia de glucógeno/ consumo de Pr	$Y_{Pr\_Gly,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.32	
	Formación anaerobia de PHA/consumo de Pr	$Y_{Pr\_PHA,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.23	
	Formación anaerobia de PHB/consumo de Pr	$Y_{Pr\_PHB,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.04	
	Formación anaerobia de PHV/consumo de Pr	$Y_{Pr\_PHV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.55	
	Formación anaerobia de PH <sub>2</sub> MV/ consumo de Pr	$Y_{Pr\_PH2MV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.65	
AEROBIO	Formación aerobia de poli-P/ consumo de PHA	$Y_{PHA\_PP,Ox}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	3.34	Oehmen <i>et al.</i> (2007)
	Formación aerobia de glucógeno/consumo de PHA	$Y_{PHA\_Gly,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.06	
	Formación aerobio de PAO/consumo de PHA	$Y_{PHA\_PAO,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.80	
	Velocidad de mantenimiento aerobio de PAO	$m_{PAO,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	4x10 <sup>-3</sup>	
	Formación aerobia de poli-P/ consumo de oxígeno	$Y_{PP}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	3.34	
	Formación aerobia de glucógeno/consumo de PAO	$Y_{Gly,PAO}$	C-mol mol-O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	6.16	
	Crecimiento aerobio de biomasa/consumo de oxígeno	$Y_{PAO}$	C-mol mol-O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	2.03	
	Velocidad aerobia de respiración endógena de PAO	$m_{PAO,O2}$	mol-O <sub>2</sub> C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	4.5x10 <sup>-3</sup>	
<b>Cultivo DPAO enriquecido con Acetato</b>					
ANAEROBIO	Ortofosfato liberado anaeróbicamente/ consumo de Ac	$Y_{Ac\_PO4,An}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.50	Smolders <i>et al.</i> (1994a), Kuba <i>et al.</i> (1996)
	Utilización anaerobia de glucógeno/ consumo de Ac	$Y_{Gly/Ac,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.50	
	Formación anaerobia de PHA/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHA,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.22	
	Formación anaerobia de PHB/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHB,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.10	
	Formación anaerobia de PHV/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.12	
	Formación anaerobia de PH <sub>2</sub> MV/ consumo de Ac	$Y_{Ac\_PH2MV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	N/A	
ANOXICO	Formación anóxica de poli-P/consumo de PHA	$Y_{PHA\_PP,Ax}$	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.46	Kuba <i>et al.</i> (1996)
	Formación anóxica de glucógeno/ consumo de PHA	$Y_{PHA\_Gly,Ax}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.27	
	Crecimiento anóxico de PAO/consumo de PHA	$Y_{PHA\_PAO,Ax}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.63	
	Velocidad de mantenimiento anóxico de PAO	$m_{PAO,Ax}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	3.64x10 <sup>-3</sup>	
	Formación anóxica de poli-P/ consumo de nitrato	$Y_{NO3\_PP,Ax}$	P-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.414	
	Formación anóxica de glucógeno/consumo de nitrato	$Y_{NO3\_Gly,Ax}$	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.35	
	Formación anóxica de PAO/consumo de nitrato	$Y_{NO3\_PAO,Ax}$	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.57	
	Velocidad anóxica de respiración endógena de PAO	$m_{PAO,NO3}$	N-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	3.27x10 <sup>-3</sup>	

Cultivos GAO enriquecidos con acetato. Escala lab.					
ANAEROBIO	Consumo anaerobio de glucógeno/consumo de Ac	$Y_{Gly/Ac,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.12	Zeng <i>et al.</i> (2003a)
	Formación anaerobia de PHA/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHA,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.86	
	Formación anaerobia de PHB/ consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHB,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.36	
	Formación anaerobia de PHV/ consumo de Ac	$Y_{Ac\_PHV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.46	
	Formación anaerobia de PH <sub>2</sub> MV/consumo de Ac	$Y_{Ac\_PH2MV,An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.04	
AEROBIO	Formación aerobia de glucógeno/consumo de PHA	$Y_{PHA\_Gly,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.95	Zeng <i>et al.</i> (2003a)
	Crecimiento aerobio de PAO/ consumo de PHA	$Y_{PHA\_GAO,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.75	
	Velocidad de mantenimiento aerobio de GAO	$m_{GAO,Ox}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	3.06x10 <sup>-3</sup>	
	Formación aerobia de glucógeno/consumo de oxígeno	$Y_{Gly}$	C-mol mol-O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	4.89	
	Degradación aerobia de PHA/consumo de oxígeno	$Y_{PHA,GAO}$	C-mol mol-O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	2.18	
	Velocidad aerobia de respiración endógena de GAO	$m_{GAO,O2}$	mol-O <sub>2</sub> C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	3.51x10 <sup>-3</sup>	

## 2.5.2 Estimación de parámetros cinéticos

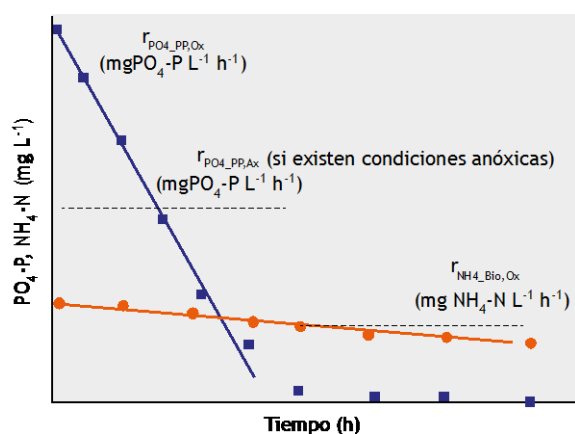
En relación con la cinética anaerobia, los parámetros más importantes son: la máxima velocidad específica de consumo de la fuente carbono AGV ( $q_{VFA,An}$ ), máxima velocidad específica de liberación de fósforo ( $q_{PP\_PO4,An}$ ), la velocidad de formación de PHA ( $q_{VFA\_PHA,An}$ ) y el coeficiente de mantenimiento endógeno ATP ( $m_{ATP,An}$ ) (Tabla 2.2.1). Estos parámetros pueden ser calculados graficando los datos experimentales en un sistema de coordenadas cartesianas entre el tiempo y los datos experimentales, y aplicando regresión lineal a los primeros datos obtenidos en el ensayo. La regresión lineal para el ajuste del primer grupo de datos experimentales obtenidos al principio del ensayo en batch se justifica por el interés que existe en determinar las velocidades máximas. Esta es la principal razón de la frecuencia de toma de muestras durante los primeros 30-40 min de ejecución del ensayo en batch. La regresión lineal se aplica preferentemente graficando las concentraciones en función del tiempo para los primeros 4-5 puntos experimentales, de manera tal que se obtenga un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) superior a 0.90-0.95. Con la ecuación (de la forma: 'y = Ax + B'), producto de la aplicación de regresión lineal, pueden obtenerse, del valor de la pendiente de las rectas (coeficiente "A") las velocidades máximas volumétricas de los parámetros de interés (reportadas como mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> or g m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>). La Figura 2.2.5 ilustra la determinación de las máximas velocidades volumétricas en un medio anaerobio (de consumo de Ac y liberación de ortofosfato) para cultivos EBPR. Para mayores detalles descriptivos de otras herramientas y métodos estadísticos, puede consultarse el Capítulo 5. Para muestras procedentes de plantas a escala real, las velocidades pueden expresarse como velocidades máximas específicas dividiendo las velocidades máximas volumétricas por la concentración de SSV del lodo activado. Sin embargo, debido a la

dinámica particular que poseen los compuestos intracelulares en cultivos EBPR, es frecuente que las velocidades específicas máximas sean expresadas en términos de la fracción activa de la biomasa (excluyendo la presencia de compuestos intracelulares). La fracción de la biomasa activa puede calcularse según:

$$\text{Fracción de biomasa activa} = \text{SSVM} - \text{PHA} - \text{glucógeno} \quad \text{Ec. 2.2.8}$$

Desde el punto de vista microbiológico, la ecuación anterior no es una expresión precisa debido a la acumulación potencial de compuestos orgánicos no biodegradables y a las particularidades metabólicas de cada organismo. Sin embargo, ese cálculo es comúnmente aceptado para propósitos experimentales en el tratamiento de aguas residuales. De manera similar que para compuestos de carbono y fósforo (particularmente para cultivos en laboratorio), la fracción activa de biomasa puede también ser expresada en unidades de C-mol en lugar de mg SSV. Para ello se necesita acudir a la composición de la biomasa (ver Apéndice I con el correspondiente factor de conversión para diferentes compuestos). Es común reportar las velocidades específicas máximas haciendo referencia al compuesto de interés (mg g VSS<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> o mg g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>). De manera similar el coeficiente de mantenimiento endógeno ATP ( $m_{ATP,An}$ ) puede determinarse a partir del perfil de la concentración de ortofosfato registrado durante la ejecución del ensayo de actividad anaerobia de los EBPR en batch, en ausencia de carbono (Sección 2.2.4.1). Esta velocidad volumétrica máxima corresponde a la velocidad endógena de liberación de fósforo ( $m_{PP\_PO4,Sec,An}$ ) observada en el ensayo en batch una vez que se ha agotado el carbono (Figura 2.2.6). Entonces  $m_{ATP,An}$  es equivalente al  $m_{PP\_PO4,Sec,An}$  (Wentzel *et al.*, 1989a; Smolders *et al.*, 1994a). Una

aproximación similar mediante regresión lineal puede aplicarse para la determinación de la velocidad específica máxima para los ensayos, aerobios y anóxicos, de actividad en batch (Tablas 2.2.2 y 2.2.3). Usualmente, el consumo de ortofosfato, crecimiento de biomasa, degradación de PHA, formación de glucógeno y los requerimientos del mantenimiento aerobio son los parámetros de interés, en dependencia del aceptor terminal de electrones disponible. La Figura 2.2.6 muestra un ejemplo que ilustra la determinación de la velocidad máxima en un ensayo de actividad (aerobio o anóxico) en batch.



**Figura 2.2.6** Ejemplo de determinación de la velocidad volumétrica máxima de consumo de ortofosfato ( $\text{PO}_4$ ) y de amonio ( $\text{NH}_4$ ) en un ensayo en batch aerobio (o anóxico).

Es importante destacar que la velocidad de crecimiento específica máxima ( $q_{\text{PHA\_Bio,Ox}}$ ) no puede ser calculada directamente midiendo la variación de la concentración de biomasa (crecimiento) durante el ciclo. En su lugar puede usarse la velocidad específica máxima de consumo de amonio ( $q_{\text{NH}_4\text{-Bio,Ox}}$ ) dividida por la composición de nitrógeno contenido en la fracción activa de la biomasa (0,20 N-mol per C-mol biomass) (Smolders *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 2003a; Lopez-Vazquez *et al.*, 2007; Welles *et al.*, 2014). Esta aproximación puede ser válida en la medida que no exista: nitrificación, precipitación química, o absorción de  $\text{NH}_4$ . A menudo las diferencias en la concentración de  $\text{NH}_4$  pueden ser despreciables o entrar en el intervalo del error estándar de la técnica analítica utilizada.

Los experimentos presentados en este capítulo se centran en las conversiones relativas de compuestos intracelulares y solubles presentes en la fase líquida, y no aborda los perfiles de consumo, ni el análisis del aceptor final de electrones (tales como velocidad de

consumo de oxígeno, o de nitrato). Esto se presenta y discute en el Capítulo 3 que trata sobre la respirometría.

La determinación del coeficiente de mantenimiento aerobio de cultivos EBPR es de la mayor importancia. Para la determinación de este parámetro deben ejecutarse ensayos de aireación extendida (generalmente de al menos 24 h) en ausencia de una fuente externa de carbono. Después de 24 h los requerimientos aerobios de ATP ( $m_{\text{ATP,Ox}}$ ) pueden determinarse a partir del consumo de oxígeno o velocidad de consumo de oxígeno (OUR) (como mol de  $\text{O}_2$  consumido por mol de biomasa activa por hora) y los requerimientos del mantenimiento aerobio pueden calcularse en función de  $\delta$  (con un valor promedio típico de 1.75-1.80 para cultivos EBPR enriquecidos) mediante la siguiente expresión:

$$m_{\text{O}_2} = \frac{1.125 m_{\text{ATP,Ox}}}{2.25\delta + 0.5} \quad \text{Ec. 2.2.9}$$

## 2.2.6 Discusión e interpretación de datos

Los resultados de los ensayos de actividad de EBPR en batch brindan información importante no solo relativa a la actividad de la biomasa bajo diferentes condiciones ambientales y de operación, sino también sobre el estado general de la biomasa y sobre la población microbológica predominantemente presente. Con relación a esto último, pueden consultarse los Capítulos 7 y 8. Además la identificación de las especies dominantes es un complemento para obtener un mejor entendimiento de la actividad de los procesos EBPR.

### 2.2.6.1 Ensayos de actividad anaerobia en batch

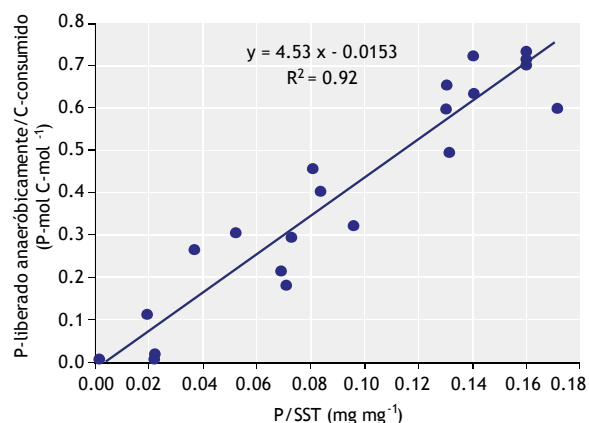
Como los PAOs son los únicos organismos conocidos que liberan fósforo durante el consumo anaerobio de AGV, las relaciones anaerobias, P-liberado/C-consumido o P-liberado/DQO y,  $Y_{\text{C,PO}_4,\text{An}}$  al igual que  $Y_{\text{VFA,PO}_4,\text{An}}$ ,  $Y_{\text{Ac,PO}_4,\text{An}}$  o  $Y_{\text{Pr,PO}_4,\text{An}}$  pueden ser considerados entre los indicadores adecuados para valorar la actividad de PAOs y GAOs en cultivos EBPR. Un alto valor de la relación P-liberado anaeróbicamente/C-consumido puede considerarse como un indicador de la presencia de PAOs, mientras que un valor bajo de esa relación es indicativo de la presencia de GAOs. La afirmación anterior está sujeta a discusión (Schuler y Jenkins, 2003; Oehmen *et al.*, 2007; Lopez-Vazquez *et al.*, 2008b; Welles *et al.*, 2015b). Esto debido al amplio intervalo de valores

reportados en la literatura para esta relación, tan bajo como 0.025 hasta incluso de 0.75 P-mol C-mol<sup>-1</sup> o mayores (Schuler and Jenkins, 2003). Numerosos estudios con cultivos PAO altamente enriquecidos revelan que además de la presencia de GAOs, hay otros factores que afectan la relación entre la liberación anaerobia del P y el consumo de carbono (liberación anaerobia de P/consumo de carbono). Por ejemplo, la fuente de carbono, el pH, el contenido de poli-P de los PAOs, y las sub-poblaciones específicas de los PAOs enriquecidos en los ensayos (Smolders *et al.*, 1994a; Filipe *et al.*, 2001a; Zhou *et al.*, 2008; Acevedo *et al.*, 2012). Consecuentemente, no es aconsejable emplear esta única relación como un indicador directo para evaluar la actividad de EBPR en lodos activados. Sin embargo esa relación brinda una estimación *a grosso modo* del metabolismo predominante en el lodo activado. Con apoyo de técnicas moleculares (capítulos 7 y 8), se puede ofrecer una adecuada y más completa visión de la actividad de la biomasa. Basado en las observaciones derivadas de investigaciones anteriores realizadas con diferentes relaciones P/C en condiciones estándar (20 °C, pH 7.0) y utilizando Ac, se puede indicar que (Schuler y Jenkins, 2003):

Relación P/C (P-mol C-mol <sup>-1</sup> )	Metabolismo dominante
< 0,25	Metabolismo GAO
0.25 – 0.50	Metabolismo PAO-GAO mixto
> 0.50	Metabolismo PAO

La Figura 2.2.7 muestra diferentes relaciones de la razón o cociente de P-liberado anaeróticamente por C-consumido reportados en la literatura en función de la actividad del fósforo acumulado en el lodo para una concentración intracelular expresada como P/SST. Resulta interesante observar que el contenido de fósforo en el lodo (en términos de mg P g SSV<sup>-1</sup>) tiene una estrecha correlación con la relación P-liberado anaeróticamente/C-consumido. Como se observa en la Figura 2.2.7 una relación P-anaeróbico/C mayor que 0.50 se observa usualmente cuando el contenido de fósforo del lodo PAO enriquecido es mayor que 0.10 g P g SST<sup>-1</sup>. Por lo tanto, es probable que el sistema de lodo activado tenga una actividad EBPR satisfactoria cuando la relación P liberado anaeróticamente/carbono consumido y lodo P/SST tenga valores cercanos o superiores a 0.50 P-mol C-mol<sup>-1</sup> y 0.10 mg P mg SST<sup>-1</sup>, respectivamente. Valores inferiores podrían sugerir que la actividad EBPR del sistema está limitada por ciertas condiciones operacionales o ambientales como pueden ser: (i) la relativa abundancia de GAOs en lugar de PAOs, (ii) la interferencia de un aceptor de electrones

en la fase anaerobia (como el oxígeno, nitrito o nitrato), (iii) la adición de sales de Fe y Al para la remoción de fósforo, u ocasionalmente (iv) la presencia de compuestos inhibitorios o tóxicos. Bajo tales circunstancias el sistema de lodos activados debe ser cuidadosamente revisado para la implementación de medidas correctivas.



**Figura 2.2.7** Relación entre P-liberado anaeróticamente y carbono consumido (P-liberado/C consumido), en función de la relación P/SST de la biomasa según reportes de la literatura (adaptado de Schuler y Jenkins, 2003; y Welles *et al.*, 2015b).

Bajo ciertas circunstancias, los ensayos de actividad de EBPR en batch pueden realizarse en condiciones no estándar (por ejemplo, con un pH diferente de 7.0) usando tanto agua residual real como utilizando otra fuente de carbono diferente al Ac. Para propósitos de comparación y referencia, la relación P/C debe ser rectificada utilizando las expresiones desarrolladas por Smolders *et al.* (1994a) o Filipe *et al.* (2001a) respectivamente, para cultivos alimentados con acetato:

$$Y_{Ac\_PO4,An} = 0,19 \cdot pH - 0,85 \quad \text{Ec. 2.2.10}$$

$$Y_{Ac\_PO4,An} = 0,16 \cdot pH - 0,55 \quad \text{Ec. 2.2.11}$$

También el uso de agua residual real u otra fuente de carbono diferente al Ac (como propionato, butirato o glucosa) resulta en una relación P/C más baja que la reportada para cultivos EBPR donde el metabolismo dominante es el metabolismo PAO. Esas bajas relaciones P/C pueden ser debidas no solamente a la baja relación P/SST ya discutida, sino además a la baja energía necesaria para el almacenamiento de PHA o a una contribución del metabolismo GAO.



Si la relación consumo de glucógeno/consumo de carbono no se incrementa y permanece dentro del intervalo reportado para sistemas en los que predominan los PAOs (0.35-0.50 C-mol C-mol<sup>-1</sup>) (Smolders *et al.*, 1994b; Schuler y Jenkins, 2003), puede asumirse que el sistema es estable, particularmente si la relación intracelular P/SST en cultivos enriquecidos no es considerablemente inferior a 0.10. Sin embargo, si bajo tales circunstancias la relación (consumo de glucógeno/consumo de carbono),  $Y_{GLY/AC,An}$ , aumenta por encima de 0.35-0.50 C-mol C-mol<sup>-1</sup>, entonces el metabolismo GAO (o la presencia de GAO) puede empezar a dominar el sistema y finalmente llegar a deteriorar el proceso en la medida en que esa relación continua incrementándose (siendo posible que alcance por último una razón de  $Y_{GLY/AC,An}$  de 1.12 C-mol C-mol<sup>-1</sup>) en combinación con el decrecimiento de la relación P/SST por debajo de 0.10 mg P mg TSS<sup>-1</sup>.

En paralelo, puede observarse un valor de la relación síntesis de PHA/carbono consumido superior a 1.33 C-mol C-mol<sup>-1</sup> como consecuencia de una mayor síntesis de PHV y PH<sub>2</sub>MV. Pueden encontrarse relaciones PHV/carbono consumido mayores que 0.10 y por encima de 0.25-0.30, junto a la formación de PH<sub>2</sub>MV. Estos valores probablemente indican el deterioro potencial de la actividad y eficiencia del proceso EBPR. Relacionado con las cinéticas anaerobias, y en particular con la velocidad inicial máxima de consumo de carbono, se han reportado diferentes valores para cultivos dominantes de PAOs y GAOs a escala de laboratorio (la mayoría de los casos en reactores biológicos secuenciales, SBR (por sus siglas en inglés)) y en sistemas como el UCT modificado (Universidad de Cape Town), Phoredox (o de 3 etapas: anaerobio-anóxico-aerobio), y PhoStrip (de libreación o expulsión de fósforo) (Wentzel *et al.*, 2008) (Tabla 2.2.4).

**Tabla 2.2.4** Velocidad inicial específica máxima de consumo anaerobio de fuentes de carbono reportados por la literatura para sistemas EBPR a escala de laboratorio y plantas reales

Sistemas EBPR a escala de lab.		
Microorganismo dominante/metabolismo y sistema	$q_{VFA,An}$ in C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Referencia
PAOs - SBR	0.27	Smolders <i>et al.</i> (1994a)
	0.20	Filipe <i>et al.</i> (2001b)
	0.20	Kuba <i>et al.</i> (1996)
	0.20	Brdjanovic <i>et al.</i> (1997)
	0.20	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2007)
GAOs - SBR	0.24	Filipe <i>et al.</i> (2001a)
	0.16-0.18	Zeng <i>et al.</i> (2003a,b)
	0.20	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2007)
	0.19	Lopez-Vazquez y <i>co.I</i> (2009a)
Sistemas EBPR en plantas completas		
Microorganismo dominante/metabolismo y sistema	$q_{VFA,An}$ in mg Ac g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Referencia
PAOs - Modified UCT	22	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	19	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	47	Kuba <i>et al.</i> (1997a,b)
	7-31	Kuba <i>et al.</i> (1997b)
PAOs - Phoredox	14	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	21	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	11	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	14	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
PAOs - PhoStrip (en línea secundaria)	9	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	23	Brdjanovic <i>et al.</i> (2000)

De manera similar que la relación P-liberado/carbono consumido, parece ser que las velocidades cinéticas dependen del contenido de poli-P en el lodo (Schuler y Jenkins 2003, Welles *et al.*, 2016), observándose valores en el intervalo

comprendido entre 0.02 a 0.20 C-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Sin embargo, en varios estudios realizados que contenían una fracción media de poli-P y una relación P/Ac cercana a 0.5 P-mol C-mol<sup>-1</sup>, la velocidad de consumo observada tiende a 0.20 C-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Similarmente, las velocidades observadas en ensayos realizados con muestras de lodos activados procedentes de sistemas EBPR de plantas reales están en el intervalo de 17 a 22 mg Ac g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Lopez-Vazquez *et al.*, 2008a).

La temperatura desempeña un papel importante en los diferentes procesos microbianos EBPR (Brdjanovic *et al.*, 1997, 1998c, Tabla 2.2.5).

**Tabla 2.2.5** Coeficientes de temperatura (Arrhenius) ( $\theta$ ) reportados en la literatura para describir la velocidad específica máxima de los diferentes procesos metabólicos EBPR que ocurren a escala de laboratorio y de planta a escala real (Meijer, 2004).

Parámetro	$\theta$	Referencia
Q <sub>VFA,An</sub>	1.094 (e <sup>0,090</sup> )	Brdjanovic <i>et al.</i> (1998c); Meijer (2004)
m <sub>ATP,An</sub>	1.071 (e <sup>0,069</sup> )	Smolders <i>et al.</i> (1995); Murnleitner <i>et al.</i> (1997)
Q <sub>PHA,Ox</sub>	1.129 (e <sup>0,121</sup> )	Brdjanovic <i>et al.</i> (1998); Meijer (2004)
Q <sub>PHA_Gly,Ox</sub>	1.125 (e <sup>0,118</sup> )	Meijer (2004)
Q <sub>PO4_PP,Ox</sub>	1.031 (e <sup>0,031</sup> )	Murnleitner <i>et al.</i> (1997); Brdjanovic <i>et al.</i> (1998c)
Q <sub>PAO,Ox</sub>	1.081 (e <sup>0,078</sup> )	Brdjanovic <i>et al.</i> (1997)
m <sub>ATP,Ax</sub>	1.071 (e <sup>0,090</sup> )	Murnleitner <i>et al.</i> (1997)
m <sub>ATP,Ox</sub>	1.071 (e <sup>0,090</sup> )	Murnleitner <i>et al.</i> (1997)

\* El número entre paréntesis muestra el valor del coeficiente de Arrhenius de temperatura ( $\theta$ ) en términos del número de Euler

### 2.2.6.2 Ensayos de actividad aerobia en batch

Para propósitos de comparación, las velocidades máximas deben estandarizarse empleando los coeficientes de Arrhenius. Basado en observaciones de Brdjanovic *et al.* (1997, 1998) y otros autores (Smolders *et al.*, 1995, y Murnleitner *et al.*, 1997), Meijer (2004), a través del desarrollo del modelo de la TUDelft y la ejecución de varios estudios de modelación, han quedado definidos coeficientes de temperatura apropiados para los mejores ajustes de las cinéticas de los cultivos EBPR para diferentes sistemas operados a escala de laboratorio o real.

Aunque las velocidades aerobias reportadas por la literatura para sistemas EBPR a escala de laboratorio son consistentes (Tabla 2.2.6), los valores observados en los sistemas reales (plantas completas) puede variar ampliamente (desde los sistemas UCT modificados hasta el BIODENIPHO) (Tabla 2.2.7)

Tales diferencias son de esperarse ya que los sistemas a escala de laboratorio están altamente enriquecidos con PAOs (en cultivos en el laboratorio los PAOs pueden constituir entre el 80 y 90% de la población) con pequeñas variaciones en el porcentaje de enriquecimiento (Lopez-Vazquez *et al.*, 2009a; Welles

*et al.*, 2014, 2015a), mientras que en sistemas reales los PAOs pueden componer entre el 3 y 20 % de la fracción activa de la biomasa (Lopez-Vazquez *et al.*, 2008a). También, en sistemas reales en los que se ejecuta la remoción biológica de nitrógeno y fósforo, los cultivos EBPR están sometidos a etapas alternadas anaerobia-anóxica-aerobia (A<sup>2</sup>O) que pueden reducir la disponibilidad de PHA intracelular después de la exposición secuencial a las condiciones anóxica-aerobia (ya que en ambas, las actividades metabólicas utilizan PHA como fuente de carbono y energía). Basado en los datos de la Tabla 2.2.7, puede apreciarse que no son comunes valores superiores a 10 mg P g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Tales velocidades pueden considerarse moderadamente altas si, como se ha discutido, los sistemas reales tienen tiempos de retención hidráulicos (TRH) de 6 y 8 horas, y aún mayores, que tienden a favorecer el consumo de fosfato. Las velocidades de consumo aerobio de P (q<sub>PO4\_PP,Ox</sub>) menores a 10 mg P g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> pueden no ser satisfactorios en dependencia de la extensión de la etapa aerobia (deben evitarse períodos de aireación extendida) (Brdjanovic *et al.*, 1998c). Otro aspecto importante a considerar es cuando la planta es propensa a la precipitación química debido a que de ocurrir precipitación, el efecto irá en detrimento del proceso EBPR.

**Tabla 2.2.6** Velocidades aerobias máximas reportadas en la literatura para cultivos EBPR enriquecidos.

Cultivo o sistema	$Q_{PO_4-PP,Ox}$ P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$Q_{PHA-Gly,Ox}$ C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$Q_{PAO,Ox}$ C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$m_{ATP,Ox}$ mol ATP C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Referencia
SBR	0.055	0.080	0.014-0.016	$1.9 \times 10^{-3}$	Smolders <i>et al.</i> (1994b)
SBR	0.046	-	0.13	$1.2 \times 10^{-3}$	Brdjanovic <i>et al.</i> (1997)
SBR	0.083	-	-	$1.7 \times 10^{-3}$	Welles <i>et al.</i> (2014)

**Tabla 2.2.7** Velocidad inicial específica máxima de consumo aerobio de P reportadas en la literatura para sistemas EBPR en plantas a escala real.

Microrganismo dominante/metabolismo	$Q_{PO_4-PP,Ox}$ mg P g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Referencia
PAOs - Modificado UCT	19.2	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	9.0	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	13	Kuba <i>et al.</i> (1997a, b)
PAOs - Phoredox	4-6	Kuba <i>et al.</i> (1997b)
	8.0	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	9.1	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	6.2	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
PAOs - PhoStrip de línea secundaria de lodos	6.3	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	9.8	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	2.2	Brdjanovic <i>et al.</i> (2000)
PAOs – Escala piloto BIODENIPHO	4	Meinhold <i>et al.</i> (1999)

### 2.2.6.3 Ensayos de actividad anóxica en batch

La remoción simultánea de ortofosfato y nitrato (o nitrito) es deseable debido al ahorro potencial de energía y costos operacionales, mientras que al mismo tiempo se mantiene la actividad de remoción de P comparable a la observada en condiciones anaerobias-aerobias (Kuba *et al.*, 1996). Sin embargo, durante hace ya algún tiempo, esto ha sido objeto de controversia debido particularmente a la variabilidad y en ocasiones poca consistencia encontrada en la actividad anóxica de remoción de fósforo en sistemas de plantas a escala real (Hu *et al.*, 2002) y la potencialmente decreciente (teóricamente) remoción de fósforo como consecuencia del bajo rendimiento de la biomasa PAO. La Tabla 2.2.8 ofrece una visión de diferentes actividades anóxicas observadas en plantas completas (anaerobia-anóxica (A<sup>2</sup>) y anaerobia-anóxica-aerobia (A<sup>2</sup>O)) que son comparadas con las actividades de remoción aerobia de P en el mismo sistema (siguiendo los protocolos presentados en este

capítulo como fue introducido por Murnleitner *et al.*, 1997).

Como se observa en la Tabla 2.2.9, la velocidad de asimilación anóxica de P es escasamente mayor a 5 mg PO<sub>4</sub>-P g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y bajo ciertas circunstancias puede ser menor o estar ausente. En todo caso las actividades anóxicas son el resultado de: (i) el grado de enriquecimiento en PAOs desnitrificadores capaces de utilizar nitrato y oxígeno (y/o en otros cultivos EBPR y otras poblaciones presentes involucradas en el proceso de desnitrificación) (Kerr-Jespersen and Henze, 1993; Meinhold *et al.*, 1999; Saad *et al.*, 2016), y/o (ii) la capacidad de desnitrificación inducida en PAOs (Kuba *et al.*, 1996, 1997; Wachtmeister *et al.*, 1997). En todo caso, el nivel de exposición del sistema de lodo activado favorecerá un mayor crecimiento de la población EBPR desnitrificadora y su inducción. De este modo, pueden esperarse altas de asimilaciones de fósforo en plantas que contemplen una etapa de pre-desnitrificación.

**Tabla 2.2.8** Máxima velocidad anóxica inicial reportada en la literatura para cultivos EBPR desnitrificantes enriquecidos en el laboratorio.

Cultivo o sistema	$Q_{PO_4\_PP,Ax}$ P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$Q_{PHA\_Gly,Ax}$ C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$Q_{PAO,Ax}$ C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$m_{Ax}$ C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Referencia
SBR, PAOs, sistema A <sup>2</sup>	0.1	0.8	0.05	$3.6 \times 10^{-3}$	Kuba <i>et al.</i> (1996)
SBR, PAOs, sistema A <sup>2</sup>	0.02-0.63 <sup>a</sup>	0.0025	-	-	Carvalho <i>et al.</i> (2007)
SBR, PAOs, sistema A <sup>2</sup>	0.58 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	-	-	Zeng <i>et al.</i> (2003b)
SBR, PAOs, sistema A <sup>2</sup> O	0.33 <sup>a</sup>	-	-	-	Saito <i>et al.</i> (2004)

<sup>a</sup>Unidades: P-mmol g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

**Tabla 2.2.9** Velocidad inicial específica máxima de consumo anóxico de P y su relación con la velocidad inicial específica máxima de consumo aerobio de P reportado para sistemas EBPR en plantas a escala real.

Dominante microorganismo/metabolismo	$Q_{PO_4\_PP,Ox}$ mg P g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$Q_{PO_4\_PP,Ax}$ mg P g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	$Q_{PO_4\_PP,Ax} / Q_{PO_4\_PP,Ox}$ %	Referencia
PAOs – UCT Modificado	19.2	5.9	31 %	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	9.0	2.1	23 %	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	13	6	46 %	Kuba <i>et al.</i> (1997a,b)
	4-6	1.2-1.6	20-40 %	Kuba <i>et al.</i> (1997b)
PAOs - Phoredox	8.0	1.9	23 %	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	9.1	4.4	48 %	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	6.2	0.6	9 %	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	6.3	0.0	0 %	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
PAOs - Sidestream PhoStrip	9.8	3.3	34 %	Lopez-Vazquez <i>et al.</i> (2008a)
	2.2	1.7	80 %	Brdjanovic <i>et al.</i> (2000)
PAOs – Escala piloto BIODENIPHO	4	2	54 %	Meinhold <i>et al.</i> (1999)

## 2.2.7 Ejemplo

### 2.2.7.1 Descripción

A modo de ejemplificar un ensayo de actividad en batch, se muestran en esta sección los datos obtenidos de un ensayo de actividad en batch anaerobio-aerobio (ensayo EBPR.AER.2) realizado a 10 °C con un cultivo EBPR enriquecido en el lab. El ensayo EBPR.AER.2 fue realizado para conocer la estequiometría anaerobia y la cinética anaerobia y aerobia de los procesos. El ensayo de actividad en batch fue realizado en un bioreactor de 2.5 L de volumen efectivo. Los equipos, aparatos y materiales fueron preparados según se describe en la Sección 2.2.3. Los sensores de pH y OD fueron calibrados dentro de las 2 h anteriores a la realización del ensayo. El ensayo duró 4.5 h y estaba configurado por una etapa anaerobia de 2.25 h (lograda por la entrada continua de N<sub>2</sub> mientras duró la etapa) seguida por 2.25 h de una etapa aerobia (creada suministrando aire comprimido en exceso hasta alcanzar una concentración de OD mayor de 4 mg L<sup>-1</sup>). El lodo EBPR para el ensayo fue recolectado al final de la etapa aerobia de un reactor a escala de laboratorio. Previo al

ensayo en batch, se transfirió 1.25 L de lodo EBPR concentrado al bioreactor y aclimatizado a 10 °C durante 30 min, con agitación lenta (100 rpm) a pH 7.0, siguiendo las recomendaciones de la Sección 2.2.3.5. La preparación del lodo activado se hizo dentro de la hora que siguió su colección. Además, 20 min antes de iniciar el ensayo, se tomaron muestras para la determinación de los parámetros de interés (según la ejecución del ensayo EBPR.AER.2).

El ensayo comenzó con la adición de 1.25 L de medio sintético con una concentración de acetato resultando en una DQO de 350 mg L<sup>-1</sup> (junto con otros macro y micronutrientes y ATU)(todo esto según la Sección 2.2.3.3). Antes de su adición al bioreactor, la temperatura del medio sintético fue ajustada a 10 °C en un baño de agua (para que estuviera a la misma temperatura del ensayo). Como el principal objetivo del ensayo fue determinar la estequiometría anaerobia y la cinética de los procesos EBPR anaerobio y aerobio, las muestras fueron tomadas cada 5 min durante los primeros 30 min de cada etapa del ensayo. Inmediatamente después de su recolección, las muestras fueron preparadas, preservadas y guardadas antes de la

determinación de los parámetros de interés ( $\text{PO}_4$ , MLSS, SSVLM, y PHAs, entre otros) como se describe en la Sección 2.2.3.4 “Preparación de materiales”. Todas las muestras fueron analizadas como se describe en la Sección 2.2.2.5. Para conocer la concentración de los PHAs almacenados intracelularmente se siguió el protocolo para la determinación de PHB y PHV y el glucógeno por hidrólisis ácida y extracción (Smolders *et al.*, 1994a). Otros PHAs como el  $\text{PH}_2\text{MV}$  no se midieron debido a que el acetato fue la fuente de carbono utilizada y por tanto era de esperar que los PHB y PHV constituyeran la mayor parte de los PHAs. La Tabla 2.2.10 muestra el diseño del plan de realización del ensayo.

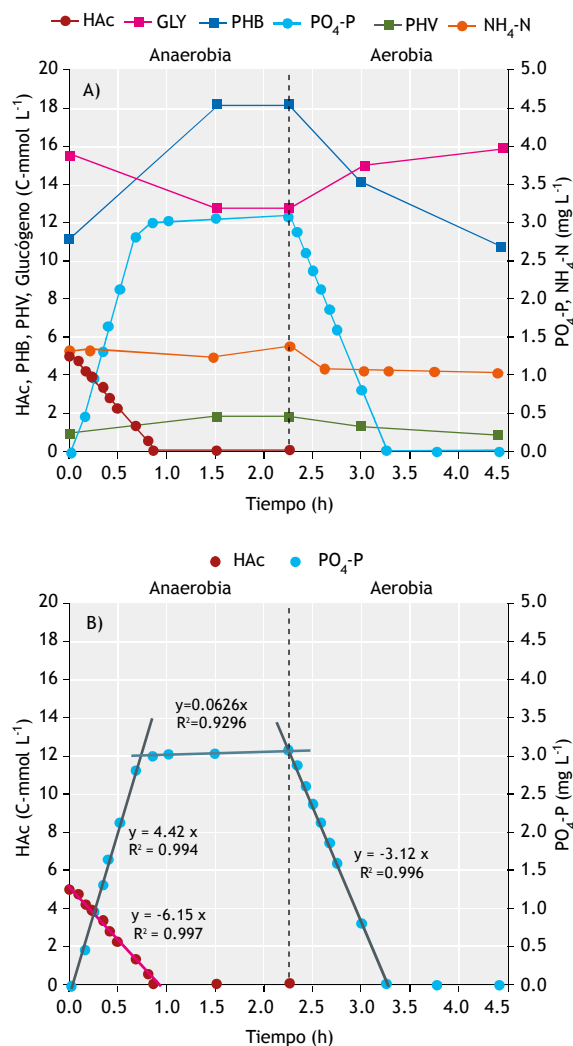
### 2.2.7.2 Análisis de datos

De acuerdo con los resultados del experimento realizado que aparecen en la Tabla 2.2.10, la Figura 2.2.8 muestra el valor de los parámetros en función del tiempo transcurrido en la experimentación y también la estimación de las máximas velocidades volumétricas aplicando regresión lineal. Las diferentes conversiones anaerobia y aerobia de los parámetros de interés se muestran en la Tabla 2.2.11, mientras que la Tabla 2.2.12 resume las estequiometrías y parámetros cinéticos de interés.

Los resultados del ensayo de actividad en batch (Figura 2.2.8) muestran el típico fenotipo del lodo en el que predominan los PAOs: consumo total de Ac en la etapa anaerobia, liberación anaerobia de P, producción de PHA y consumo de glucógeno, mientras que en la etapa aerobia se observa consumo de  $\text{PO}_4$  junto con la utilización de PHA, formación de glucógeno y ligero consumo de  $\text{NH}_4$ . Además, al inicio y final del ensayo se aprecia un valor relativamente bajo de la relación SSV/SST (alrededor de 0.72-0.73), típico para sistemas EBPR debido a la acumulación de poli-P (reflejo de alto contenido de cenizas). Cuando los sistemas están concebidos solamente para la remoción de material orgánico, la relación SSV/SST rara vez es menor de 0.80 (Wentzel *et al.*, 2008).

Tal como se observa en la Tabla 2.2.12, la estequiometría anaerobia, en particular la relación P-liberado/C consumido ( $Y_{\text{Ac,PO}_4,\text{An}}$ ,  $\text{PO}_4/\text{Ac}$  o P/C) tiene un valor de  $0.57 \text{ P-mol C-mol}^{-1}$  junto con la de consumo de glucógeno/Ac consumido ( $0.57 \text{ C-mol C-mol}^{-1}$ ) indica que la actividad de la biomasa (fisiología) corresponde con la dominada por el metabolismo PAO

(Tabla 2.2.3). Esta aseveración puede confirmarse por la relativamente baja relación producción de PHV/producción de PHB ( $Y_{\text{PHV}/\text{PHB,An}}$ ) (0.12) ya que relaciones PHV/PHB con un valor cercano o menor de 0.10 es característico de sistemas PAO enriquecidos (Smolders *et al.*, 1994a) como consecuencia del bajo consumo de glucógeno por Ac consumido cuando se compara con sistemas donde predominan los GAOs (Zeng *et al.*, 2003a).



**Figura 2.2.8** Representación gráfica de los datos obtenidos en el ejemplo del plan de implementación experimental para la ejecución del ensayo de actividad en batch (EBPR.AER.2, Tabla 2.2.10) realizado a 10 °C con un lodo EBPR enriquecido en el lab empleando influente sintético a pH 7,0: A) perfiles de los datos experimentales de interés; y, B) datos experimentales de Ac y  $\text{PO}_4$  mostrando las principales líneas de tendencia de las relaciones de conversión para la posterior estimación de las velocidades máximas.



**Tabla 2.2.10** Ejemplo de la implementación de un plan experimental para la ejecución de un ensayo de actividad en batch (Tipo No. EBPR.AER.2) realizado con un lodo EBPR enriquecido en laboratorio a 10 °C empleando un influente sintético a pH 7.0.

Ensayo batch de actividad EBPR anaerobia-aerobia combinada										Código: EBPR.AER.2			
<b>Fecha:</b>	Jueves 17.12.2015 9:00 h									<b>Procedimiento experimental (simplificado)</b>		<b>Tiempo (h:min)</b>	
<b>Descripción:</b>	Ensayo a 10 °C, pH 7, sustrato artificial con cultivo enriquecido con PAOs.									1. Confirmar la disponibilidad de equipos y materiales.		08:00	
<b>Ensayo No.:</b>	3 de 6									2. Confirmar funcionalidad y calibración de sistema, medidores y sensores.		08:10	
<b>Duración:</b>	4.5 h (270 min)									3. Transferir 1.25 L de lodo al reactor de ensayo.		08:20	
<b>Substrato:</b>	Sintético: Acetato (350 mg L <sup>-1</sup> ) + minerales									4. Mantener condiciones aeróbicas con agitación lenta y suministro de aire a T y pH seleccionados.		08:40	
<b>Punto de muestreo:</b>	Altura media en el reactor de ensayo									5. 20 min antes del inicio, tome muestra inicial (EBPR.AER.2(3.1))		08:40	
<b>Muestras No.:</b>	EBPR.AER.2(1-22)									6. Detenga la aireación e inicie el suministro de gas N <sub>2</sub> .		08:50	
<b>Volumen muestras:</b>	305 mL (10 mL para SSVLM, 12 mL para PHA, 4.5 mL para Glucógeno, 6 mL para otras muestras)									7. Inicio del ciclo, agregar 1.25 L del sustrato sintético (0 min)		09:00	
<b>Volumen del reactor:</b>	2.5 L									8. Minuto 5, continúe con el programa de muestreo.		09:05	
										9. Detener suministro de N <sub>2</sub> gas, iniciar suministro de aire (135 min)		11:15	
										10. Minuto 270, detener la aireación y la agitación.		13:30	
										11. Organizar las muestras y limpiar el sistema.		13:45	
										12. Verificar que todos los sistemas han sido apagados.		14:00	
<b>Plan de muestreo y recolección de muestras</b>													
Tiempo (min)	-20	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	90	135
Tiempo (h)	-0:33	0:00	0:08	0:17	0:25	0:33	0:42	0:50	0:67	0:83	1:00	1:50	2:25
Muestra No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Parámetro	FASE ANAERÓBICA												
HAc (C-mmol L <sup>-1</sup> )	5.83 <sup>1</sup>		4.85	4.57	3.98	3.48	2.87	2.21	1.35	0.43	0	0	0
PO <sub>4</sub> -P (P-mmol L <sup>-1</sup> )	0 <sup>1</sup>		0.24	0.45	1.01	1.35	1.69	2.14	2.85	3.01	3.04	3.07	3.11
NH <sub>4</sub> -N (N-mmol L <sup>-1</sup> )	1.32 <sup>1</sup>			1.34								1.26	1.39
PHA (C-mmol)	12.27											20.04	20.08
Glucógeno (C-mmol)	15.09											12.68	12.71
SSLM & SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )	Ver Tabla												Ver Tabla
<sup>1</sup> Valores promedio de las concentraciones iniciales al inicio del ensayo.													
<b>Plan de muestreo y recolección de muestras (continuación)</b>													
Tiempo (min)	140	145	150	155	160	165	180	195	215	270			
Tiempo (h)	2:33	2:42	2:50	2:58	2:67	2:75	3:00	3:25	3:58	4:50			
Muestra No.	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22			
Parámetro	FASE AERÓBICA												
HAc (C-mmol L <sup>-1</sup> )													
PO <sub>4</sub> -P (P-mmol L <sup>-1</sup> )	3.00	2.73	2.45	2.20	1.90	1.64	0.84	0	0	0			
NH <sub>4</sub> -N (N-mmol L <sup>-1</sup> )				1.11			1.09	1.07	1.06	1.05			
PHA (C-mmol)							15.55					11.72	
Glucógeno (C-mmol)							15.04					15.90	
SSLM & SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )													Ver Tabla
<b>Determinación de las concentraciones de SSLM &amp; SSVLM</b>													
Punto de muestreo	Muestra No.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	SSLM	SSVLM	Razón SSV/SS				
Inicio del ensayo <sup>2</sup>	1	0.08835	0.16525	0.10792	0.07690	0.05733	7,690	5,733	0.75				
	2	0.08835	0.16553	0.10997	0.07718	0.05556	7,718	5,556	0.72				
	3	0.08834	0.16435	0.10903	0.07601	0.05532	7,601	5,532	0.73				
Final anaeróbica/Inicio aeróbica	4	0.08858	0.12437	0.09606	0.03579	0.02831	3,579	2,831	0.79				
	5	0.08848	0.12564	0.09646	0.03716	0.02918	3,716	2,918	0.79				
	6	0.08914	0.12527	0.09648	0.03613	0.02879	3,613	2,879	0.80				
Final del ensayo						Average	3,636	2,876	0.79				
	7	0.08868	0.12859	0.09952	0.03991	0.02907	3,991	2,907	0.73				
	8	0.08764	0.12716	0.09881	0.03952	0.02835	3,952	2,835	0.72				
	9	0.08722	0.12622	0.09800	0.03900	0.02822	3,900	2,822	0.72				
						Average	3,948	2,855	0.72				
<sup>2</sup> Muestra recolectada antes de agregar el medio sintético.													
<b>Composición de la biomasa</b>													
Punto de muestreo	Inicio Anaerobia	Final Anaerobia/Inicio Aerobia	Final Aerobio										
SSLM (mg L <sup>-1</sup> )	3,835	3,636	3,948										
SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )	2,804	2,876	2,855										
Razón SSVLM/SSLM	0.73	0.79	0.72										
Sólidos fijos (mg L <sup>-1</sup> )	1,031	760	1,093										
PHB (mg L <sup>-1</sup> )	241.7	392.0	232.1										
PHV (mg L <sup>-1</sup> )	20.9	37.3	18.6										
PHA (mg L <sup>-1</sup> )	262.6	429.3	250.8										
Glucógeno (mg L <sup>-1</sup> )	423.7	343.3	429.2										
%(PHA+Gly) MLVSS <sup>-1</sup>	32.0	37.0	31.0										
Biomasa activa (mg L <sup>-1</sup> )	2,117	2,103	2,175										
Biomasa activa (Cmmol L <sup>-1</sup> )	81.4	80.9	83.6										
<b>Nota:</b>													
Acetato (CH <sub>3</sub> CO)							30.03	mg C-mmol <sup>-1</sup>					
Ortho-Fosfato (PO <sub>4</sub> -P)							31.00	mg P-mmol <sup>-1</sup>					
Amonio (NH <sub>4</sub> -N)							14.00	mg N-mmol <sup>-1</sup>					
PHB (CH <sub>1.5</sub> O <sub>0.5</sub> )							21.52	mg C-mmol <sup>-1</sup>					
PHV (CH <sub>1.6</sub> O <sub>0.4</sub> )							20.02	mg C-mmol <sup>-1</sup>					
Glucógeno (CH <sub>10/6</sub> O <sub>5/6</sub> )							27.00	mg C-mmol <sup>-1</sup>					
Biomasa (CH <sub>2.09</sub> O <sub>0.54</sub> N <sub>0.20</sub> )							26.00	mg C-mmol <sup>-1</sup>					

**Tabla 2.2.11** Resumen de las conversiones anaerobias y aerobias observadas en el ejemplo de ensayo de actividad en batch (Tipo EBPR.AER.2) realizada a 10 °C con un lodo EBPR enriquecido en el laboratorio empleando influente sintético a pH 7.0.

Parámetro	Unidad	Fase anaerobia			Fase aerobia		
		Inicio [Tiempo: 0]	Final [tiempo: 135 min]	Conversión anaerobia	Inicio [Tiempo: 135 min]	Final [Tiempo: 270 min]	Conversión aerobia
Ac	C-mmol L <sup>-1</sup>	5,20	0,00	-5,20	0,00	0,00	0,00
PO <sub>4</sub> -P	P-mmol L <sup>-1</sup>	0,00	3,11	3,11	3,11	0,00	-3,11
NH <sub>4</sub> -N	N-mmol L <sup>-1</sup>	1,32	1,39	0,07	1,39	1,05	-0,34
PHB	C-mmol L <sup>-1</sup>	11,23	18,21	6,99	18,21	10,79	-7,43
PHV	C-mmol L <sup>-1</sup>	1,05	1,86	0,82	1,86	0,93	-0,93
PHAs(PHB+PHV)	C-mmol L <sup>-1</sup>	12,27	20,08	7,80	20,08	11,72	-8.36
Glucógeno	C-mmol L <sup>-1</sup>	15,69	12,71	-2,98	12,71	15,90	3,18

**Tabla 2.2.12** Resumen de la estequiometría anaerobia y aerobia, y parámetros cinéticos observados en el ejemplo de actividad en batch (Tipo EBPR.AER.2) realizada a 10 °C con un lodo EBPR enriquecido en el laboratorio empleando influente sintético a pH 7.0.

Conversión	Símbolo	Unidad	Valor estimado
<b>Estequiometría anaerobia</b>			
P-neto liberado/Ac consumido <sup>a</sup>	Y <sub>Ac_PO4,An</sub>	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.57
PHA producido/ Ac consumido	Y <sub>Ac_PHA,An</sub>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.50
PHV producido/ PHB producido	Y <sub>PHV/PHB,An</sub>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.12
Glucógeno consumido/ Ac consumido	Y <sub>Gly/Ac,An</sub>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.57
<b>Cinética anaerobia<sup>b</sup></b>			
Velocidad volumétrica máxima de consumo de Ac	r <sub>Ac,An</sub>	C-mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	6.15
Velocidad específica máxima de consumo de Ac	q <sub>Ac,An</sub>	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.075
Velocidad volumétrica máxima de liberación de PO <sub>4</sub>	r <sub>PP_PO4,An</sub>	P-mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	4.42
Velocidad específica máxima de liberación de PO <sub>4</sub>	q <sub>PP_PO4,An</sub>	P-mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.054
Velocidad de liberación anaerobia secundaria de PO <sub>4</sub>	r <sub>PP_PO4,Sec,An</sub>	P-mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.063
Coefficiente de mantenimiento anaerobio	m <sub>PP_PO4,An</sub>	P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	7.69 E-04
<b>Cinética aerobia</b>			
Velocidad volumétrica máxima de consumo de PO <sub>4</sub>	r <sub>PO4_PP,Ox</sub>	P-mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	3.12
Velocidad específica máxima de consumo de PO <sub>4</sub>	q <sub>PO4_PP,Ox</sub>	P-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.038
Velocidad volumétrica aerobia de consumo de NH <sub>4</sub> <sup>c</sup>	r <sub>NH4_Bio,Ox</sub>	N-mol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.15
Velocidad específica máxima de crecimiento <sup>d</sup>	q <sub>PAO,Ox</sub>	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0.009

<sup>a</sup> Excluyendo la liberación secundaria de P al multiplicar r<sub>PP\_PO4,Sec,An</sub> por la duración de la etapa anaerobia (0.063 P-mmol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> · 2.25 h = 0.142 P-mmol).

<sup>b</sup> Estimado dividiendo la velocidad volumétrica máxima de conversión por la concentración de biomasa activa al inicio del ensayo 81.4 C-mmol.

<sup>c</sup> Estimado: consumo aerobio de NH<sub>4</sub> dividido por la duración de la etapa aerobia

<sup>d</sup> Estimado: velocidad volumétrica de consumo aerobio de NH<sub>4</sub> dividido por el contenido de N de la biomasa (0.20 N-mol) y la concentración inicial de biomasa activa (81.4 C-mmol L<sup>-1</sup>).

Cuando se comparan los valores observados de PO<sub>4</sub>/Ac con los reportados en la Tabla 2.2.3 (para cultivos EBPR enriquecidos) y la Figura 2.2.5, parece ser que los PAOs (o su actividad) predominan en el lodo. Sin embargo, esta es una consideración hecha como primera aproximación y se debe confirmar con el uso de las técnicas moleculares (capítulos 7 y 8). La relación P/SST del lodo puede también usarse para juzgar la relación PO<sub>4</sub>/Ac esperada (Figura 2.2.7). Sin

embargo, teniendo en cuenta toda la información precedente, puede decirse que el lodo presenta una actividad EBPR satisfactoria.

Una herramienta importante para evaluar la validez y consistencia de los datos es el balance de DQO. En este ejemplo el balance de DQO realizado para evaluar la conversión anaerobia muestra que cerca de 5.20 C-mmol Ac y 2.98 C-mmol de

glucógeno fueron consumidos, mientras que se produjeron 7.80 C-mmol PHAs. Usando el factor de conversión de 32 mg DQO C-mmol<sup>-1</sup> para ambos, Ac y glucógeno, y de 36 mg DQO mg C-mmol<sup>-1</sup> para PHAs, el error  $\Delta$ COD (%) estimado del balance de DQO usando la Ec. 2.2.2 es cercano a 0.2 %. Si se realizaran pruebas de respirometría como se indican en el Capítulo 3, podría realizarse un balance de DQO similar al anterior para las conversiones aerobias.

Relativo a las cinéticas anaerobias, los valores de 0.75 C-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y  $7.69 \times 10^{-4}$  P-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para  $q_{Ac,An}$  y  $m_{PP\_PO4,An}$  respectivamente, parecen ser menores que los valores típicos reportados en la literatura para sistemas enriquecidos de PAOs, que suelen ser alrededor de 0.20 C-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y  $2.1 \times 10^{-3}$  P-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Tabla 2.2.12). Sin embargo, se puede apreciar que el ensayo de actividad en batch fue realizado a 10 °C, mientras que los valores anteriores reportados en la literatura fueron obtenidos de ensayos llevados a cabo a 20 °C. Entonces, con el propósito de comparar los resultados con los ensayos conducidos a 20 °C (y también a otras temperaturas) puede aplicarse el coeficiente de Arrhenius ( $\theta$ ) propuesto por Meijer (2004) (1.094 para consumo de carbono y 1.071 para mantenimiento anaerobio). Por tanto, las velocidades obtenidas a 10 °C, una vez corregidas a 20 °C, devienen: 0.18 C-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para la velocidad máxima de consumo de Ac (estimado como  $q_{Ac,20,An} = q_{Ac,10,An} / \theta^{(10-20)}$ ) y  $1.53 \times 10^{-3}$  P-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para el coeficiente de mantenimiento ( $m_{PP\_PO4,20,An} = m_{PP\_PO4,10,An} / \theta^{(10-20)}$ ).

De manera similar, para la máxima velocidad específica de consumo aerobio de P ( $q_{PO4\_PP,Ox}$  de 0.038 P-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) observada a 10 °C, el valor equivalente corregido a 20 °C es 0.050 P-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, mismo que se encuentra dentro del intervalo de valores reportados en la literatura (Tabla 2.2.6). Tal como ha sido mencionado, la tasa de crecimiento de biomasa no puede ser determinada directamente a través del incremento de la concentración de SSVLM en el tiempo, ya que el pequeño incremento de la biomasa que se obtiene cae en el intervalo del error de la técnica analítica. En su lugar, es determinada por el consumo de NH<sub>4</sub> observado durante la fase aerobia (asegurando que el NH<sub>4</sub> no fue consumido por ningún otro proceso biológico o químico). Así, se determinó que la velocidad específica máxima de crecimiento de la biomasa ( $q_{Bio,Ox}$ ) fue de 0.009 C-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (C-mol de nueva biomasa producida por C-mol de biomasa inicial). Después de corregir el valor medido a 10 °C (mediante el coeficiente de temperatura de

Arrhenius de 1.081), la velocidad de crecimiento de la biomasa re-calculada a 20°C es estimada a 0.020 C-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, que está dentro del intervalo reportado para lodo EBPR en la literatura (0.016 C-mol C-mol<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; Smolders, 1995). En conclusión, el hecho de que los parámetros estequiométricos y cinéticos obtenidos son comparables con los valores reportados en la literatura para cultivos EBPR (Tabla 2.2.3) es un indicador de que la actividad EBPR observada en el ensayo es típica de cultivos EBPR enriquecidos.

## 2.2.8 Consideraciones adicionales

### 2.2.8.1 Presencia de GAO en sistemas EBPR

La presencia de GAOs ha sido objeto de diversas investigaciones en los últimos años. De lo que se sabe hasta ahora, (i) una sola fuente de C disponible en el influente (acetato o propionato), (ii) temperaturas mayores a 20 °C, y (iii) valores de pH inferiores a 7.0, parecen favorecer la presencia de GAOs en sistemas EBPR (a escala de laboratorio) (Filipe *et al.*, 2001b; Oehmen *et al.*, 2004; Lopez-Vazquez *et al.*, 2009b). Los indicios típicos que mejor sugieren su presencia son: un valor bajo de la relación anaerobia P liberado/C consumido (muy inferior a 0.50 P-mol C-mol<sup>-1</sup>) y una captación aerobia incompleta de PO<sub>4</sub>. A pesar de la presencia de GAOs en sistemas EBPR a escala de laboratorio (posiblemente como consecuencia de operar estos sistemas en las fronteras de los factores antes mencionados: con una sola fuente de C, usualmente Ac, a pH 7.0 y 20°C), es raro encontrar una población abundante de GAOs en sistemas municipales a escala real (Thomas *et al.*, 2003; Saunders *et al.*, 2003; Lopez-Vazquez *et al.*, 2008a; Lopez-Vazquez, 2009; Kong *et al.*, 2006), a menos que tengan lugar condiciones muy particulares (como la descarga de algún efluente industrial)(Burow *et al.*, 2007). Inclusive, aunque exista un valor bajo de la relación anaerobia P-liberado/C-consumido, se ha observado que, bajo ciertas condiciones limitantes de poli-P intracelular, los PAOs son capaces de desarrollar un metabolismo similar al de los GAOs en condiciones anaerobias, y lograr aún así, una remoción aerobia completa del fósforo (Schuler and Jenkins, 2003; Zhou *et al.*, 2008; Acevedo *et al.*, 2012; Welles *et al.*, 2015b). De esta manera, un valor de la relación anaerobia P-liberado/C-consumido considerablemente inferior a 0.50 P-mol C-mol<sup>-1</sup> (por ejemplo, alrededor de 0.35 P-mol C-mol<sup>-1</sup>) observado en ensayos batch de actividad de procesos EBPR, no significa

estrictamente que la población de GAOs sea más abundante que la de PAOs. Muy probablemente, el mecanismo que hace que los GAOs lleguen a usar un metabolismo tipo-GAO seguirá siendo objeto de investigaciones futuras; mientras tanto, se recomienda el uso de la microscopía y de las técnicas moleculares (Capítulos 7 y 8) para identificar las poblaciones microbianas dominantes en sistemas EBPR.

### 2.2.8.2 Efecto de la fuente de carbono

Es bien conocido que la alimentación de DQO fácilmente biodegradable (DQORB) en la etapa anaerobia (cuando es principalmente formado de ácidos grasos volátiles como el acético y el propiónico) favorece el crecimiento de la biomasa EBPR (Comeau *et al.*, 1986; Mino *et al.*, 1998; Oehmen *et al.*, 2004). Otras fuentes de DQORB, tales como la glucosa, no son apropiadas porque al parecer favorecen el crecimiento de los GAOs o bacterias-G (Cech y Hartman, 1993). También, se asume que sustratos más complejos necesitan ser hidrolizados y transformados en AGV para que puedan ser consumidos por la biomasa EBPR (Wentzel *et al.*, 2008). En ese sentido, lo más probable es que las fuentes complejas de DQO no serían consumidas en su totalidad en la etapa anaerobia y “escaparían” hacia las etapas anóxicas o aerobias, incidiendo en los resultados del EBPR en estas fases (como cuando se realiza un ensayo combinado anaerobio-anóxico-aerobio tipo EBPR.ANOX.2 ó EBPR.AER.2). Idealmente, para una ejecución satisfactoria, no debe existir ninguna fuente de carbono en las etapas anóxica y aerobia durante un ensayo EBPR de actividad en batch (a menos que sea de un interés particular). Además, recientemente se ha elaborado la hipótesis de que, además de los aparentemente conocidos PAOs (*Candidatus Accumulibacter phosphatis*), otros organismos como las *Actinobacterias* o S-PAOs (Kong *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2014) son capaces de llevar a cabo un alto consumo de fósforo como el *Accumulibacter*, usando un donante de electrones alternativo (aminoácidos o H<sub>2</sub>S). Para el día a día o en ensayos regulares de sistemas EBPR conocidos, el uso de un medio sintético que contenga AGV puede ser adecuado para brindar una valoración satisfactoria de la actividad EBPR. Sin embargo, el uso de fuentes de DQO más complejas, que indudablemente están presentes tanto en aguas residuales municipales crudas como sedimentadas, pueden resultar en una actividad EBPR sub-óptima, o en metabolismos EBPR diferentes (no

bien conocidos todavía). Este último ha sido y continuará siendo objeto de extensos trabajos de investigación. Sin embargo, es importante saber que esas condiciones pueden arrojar resultados que difieran de los que son presentados en este capítulo.

### 2.2.8.3 Efecto de la temperatura

Se han desarrollado extensas investigaciones para evaluar el efecto de la temperatura en los cultivos EBPR, sugiriendo que temperaturas por debajo de 20 °C favorecen el crecimiento de PAOs, mientras que temperaturas mayores favorecen el desarrollo de GAOs (Brdjanovic *et al.*, 1997, 1998b; Lopez-Vazquez *et al.*, 2009a). No obstante, algunas observaciones han indicado que es posible la operación estable de sistemas EBPR a temperaturas superiores a 25 °C (Cao *et al.*, 2009). Aunque situaciones específicas de combinaciones entre la composición del agua residual, las condiciones ambientales y de operación desempeñan un papel importante, el funcionamiento a largo plazo y la adaptación del cultivo a esas condiciones particulares pueden causar el desarrollo y enriquecimiento de cultivos PAO (o de organismos similares que compartan el fenotipo PAO) capaces de sostener un proceso EBPR estable a altas temperaturas. En ese sentido es muy importante la identificación de estos organismos y es donde las técnicas presentadas en el Capítulo 7, y particularmente en el Capítulo 8, serán de mucha utilidad para dilucidar la identidad de los mismos.

### 2.2.8.4 Efecto del pH

El pH tiene una influencia directa sobre los cultivos EBPR (Smolders *et al.*, 1994a, Filipe *et al.*, 2001a). Durante el ensayo de actividad en batch de un EBPR, el pH debe ser controlado cuidadosamente para poder obtener resultados confiables (evitando fluctuaciones de pH mayores a  $\pm 0.1-0.2$ ). Sin embargo, valores altos de pH (particularmente arriba de pH 8.0) combinados con la presencia de DQORB pueden dar lugar a una (supuestamente) alta liberación anaerobia de P y favorecer la precipitación, químicamente inducida, de fosfato de calcio o aún la formación de estruvita (NH<sub>4</sub>MgPO<sub>4</sub> KMgPO<sub>4</sub>), dependiendo de la composición del agua residual (Lin *et al.*, 2012; Mañas *et al.*, 2011). También, la presencia de sales de aluminio (consecuencia de la eventual descarga de lodos de plantas potabilizadoras), puede propiciar la precipitación de fósforo, sobre todo si hay un tiempo

de retención largo en la red de alcantarillado. Estos procesos reducen la disponibilidad biológica del fósforo para los PAOs, resultando en un deterioro potencial de los procesos EBPR en la medida en que los PAOs se vean imposibilitados de reponer sus reservas de poli-P intracelular. Tales condiciones llevaría a la obtención de valores diferentes a los resultados presentados en este capítulo. Por otro lado, aunque los procesos antes mencionados no son deseados y por tanto deben ser evitados en los sistemas EBPR convencionales continuos (anaerobio-anóxico-aerobio), pueden ofrecer una interesante opción alternativa para la recuperación de fósforo. Puede ser meritorio explorar estas opciones, en vista al papel esencial del fósforo en la cadena alimentaria, y el agotamiento potencial de las fuentes convencionales de P a escala planetaria.

### 2.2.8.5 Desnitrificación por cultivos EBPR

Los lodos EBPR desnitrificantes han estado sujetos a extensos debates desde la década de los 90s. Ciertos autores han reportado remociones satisfactorias de  $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$  simultáneamente durante la etapa anóxica de algunos sistemas EBPR (Vlekke *et al.*, 1988; Kuba *et al.*, 1993, 1996, 1997a, 1997b; Wachtmeister *et al.*, 1997; Brdjanovic *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2003b), pero en otros estudios los resultados de desnitrificación y captación de  $\text{PO}_4$  de manera simultánea han sido limitados o inconsistentes (Kern-Jespersen and Henze, 1993; Hu *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2007; Lopez-Vazquez *et al.*, 2008a). En la actualidad, el descubrimiento de la existencia de dos diferentes sub-poblaciones de *Accumulibacter* (reconocidos como PAOs) fue inicialmente alentado por la evaluación de las capacidades desnitrificantes de biomasas EBPR (Flowers *et al.*, 2008). Flowers *et al.*, (2008) proponiendo que los sub-grupos *Accumulibacter* Tipo I poseen una capacidad de desnitrificación total (capaz de desnitrificar desde nitrato a gas di-nitrógeno), mientras que el sub-grupo *Accumulibacter* Tipo II parece ser que solamente tiene capacidad para desnitrificar a partir del nitrito (similar a las primeras observaciones de Kern-Jespersen y Henze, 1993). Tal como ha sido sugerido por Kuba *et al.* (1996) y Lopez-Vazquez *et al.* (2008a), la remoción de  $\text{NO}_3$  de manera simultánea con la capacidad de consumo anóxico de  $\text{PO}_4$  de un lodo EBPR puede ser resultado de: (a) la estimulación de las enzimas desnitrificantes (nitrato- y nitrito-reductasas), y (b) del desarrollo de poblaciones EBPR “marginales” capaces de desnitrificar. Por tanto,

cuando se realizan ensayos EBPR de actividad anóxica, la actividad relativa anóxica observada puede ser nula o considerablemente alta (Tablas 2.2.8 y 2.2.9) en función de la exposición a condiciones anóxicas y el desarrollo de poblaciones desnitrificantes.

### 2.2.8.6 Exceso y déficit de compuestos intracelulares

Aunque inicialmente fue asumido que el agotamiento del reservorio intracelular de poli-P es un factor limitante para el consumo anaerobio de AGV por PAOs (Brdjanovic *et al.*, 1997), desarrollos posteriores demostraron que los PAOs pueden utilizar como fuente de energía grandes cantidades de glucógeno almacenado intracelularmente para el consumo anaerobio de AGV y así compensar la disponibilidad limitante de poli-P, y aún llevar a cabo de modo satisfactorio el total consumo aerobio del P (Schuler and Jenkins, 2003; Zhou *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014, 2015b). Esto es reflejado en valores de la relación P-anaerobio-liberado/C-consumido inferiores a  $0.50 \text{ P-mol C-mol}^{-1}$  (Figura 2.2.7) y mayores relaciones glucógeno anaerobio/carbono consumido (Tabla 2.2.3). Basado en las observaciones de Schuler y Jenkins (2003) y Welles *et al.* (2015b), el desplazamiento de la utilización metabólica de poli-P a la de glucógeno parece ser que tiene lugar tan pronto como la relación P/SST de la biomasa cae por debajo de  $0.08 \text{ mg P g SST}^{-1}$  (Acevedo *et al.*, 2014). Además, Welles *et al.* (2015b) han observado que las tasas cinéticas máximas de los dos sub-grupos conocidos de *Accumulibacter* (Flowers *et al.*, 2008) al parecer son afectados de diferente manera, dependiendo de la disponibilidad de poli-P intracelular, siendo el *Accumulibacter* Tipo I más afectado que el *Accumulibacter* Tipo II. Esto puede explicar las potenciales desviaciones que existen, comparadas a las velocidades presentadas en este capítulo, y que podrían sostenerse mediante la determinación del contenido intracelular de poli-P y glucógeno o al menos por la estimación de la relación P/ SST en la biomasa.

### 2.2.8.7 Aireación excesiva

La exposición de la biomasa EBPR a períodos prolongados de aireación (mayores de 12-24 h) pueden conducir a la utilización secuencial de los PHAs, glucógeno y poli-P intracelulares bajo



condiciones aerobias (Brdjanovic *et al.*, 1998c; Lopez *et al.*, 2006), como resultado de la necesidad de la biomasa de satisfacer sus requerimientos de mantenimiento aerobio. Consecuentemente dará lugar a la eventual liberación aerobia del P tan pronto como comience la hidrólisis del poli-P almacenado intracelularmente. Así, si las muestras de lodo EBPR son aireadas por períodos extensos (toda la noche o durante su transportación) antes de la ejecución de un ensayo de actividad en batch, será de esperar la disminución de la actividad EBPR debido al potencialmente bajo contenido de poli-P y glucógeno del lodo. Por tanto, debe evitarse una sobreexposición a condiciones aerobias. Además, debe prestarse atención a lo anterior para la operación satisfactoria de los sistemas EBPR de plantas reales de lodos activados, porque períodos excesivos de aireación durante los momentos de baja carga (fines de semana o períodos festivos) pueden dar como resultado una indeseable liberación aerobia del P, afectando la calidad del efluente tratado.

### 2.2.8.8 Déficit de iones esenciales

Aunque pudiera parecer trivial, la presencia de macro y micro nutrientes en la concentración adecuada y su biodisponibilidad son esenciales para los sistemas EBPR de lodo activado. Por ejemplo, potasio, magnesio, hierro y calcio, entre otros, son importantes en la regulación del metabolismo microbiano EBPR y sostienen el almacenamiento de compuestos intracelulares (Brdjanovic *et al.*, 1997; Burow *et al.*, 2007; Barat *et al.*, 2008). Su ausencia (por ejemplo, de potasio, puede producir el deterioro del proceso EBPR (Brdjanovic *et al.*, 1997), pero su exceso puede influir en el metabolismo de PAOs, induciendo el metabolismo de GAOs (Jobaggy *et al.*, 2006; Barat *et al.*, 2008), posiblemente debido a la precipitación química del P con los elementos anteriormente mencionados. Esto reducirá su biodisponibilidad y la reposición del reservorio intracelular del P. La ausencia o presencia excesiva de macro y micro nutrientes debe verificarse si hay sospecha de que sus concentraciones difieren de las regularmente observadas en sistemas de tratamiento de aguas residuales municipales.

### 2.2.8.9 Toxicidad/inhibición

Hay un número limitado de compuestos que han sido identificados como tóxicos o inhibidores para

procesos EBPR. La presencia de nitrato o nitrito en la etapa anaerobia es considerada perjudicial para los procesos EBPR debido a la estimulación de la actividad de los organismos desnitrificantes ordinarios que pueden consumir el DQORB en detrimento de los PAOs (Wentzel *et al.*, 2008). También, ha sido probado que la presencia de nitrito en la etapa aerobia en concentraciones tan bajas como  $6-8 \text{ mg L}^{-1}$  produce una inhibición de los PAOs (Saito *et al.*, 2004), lo que puede acentuar el efecto negativo al disminuir el pH debido al incremento en ácido nitroso libre (ANL) (Zhou *et al.*, 2008; Pijuan *et al.*, 2010). Este último fenómeno favorece la presencia de GAOs sobre la de los PAOs, ya que los GAOs parecen ser más tolerantes a la presencia de ANL (Pijuan *et al.*, 2011), resultando en el deterioro del proceso EBPR. La salinidad es otro factor que puede inhibir la actividad de los PAOs a corto plazo (horas) (Welles *et al.*, 2014, 2015a). Welles *et al.*, (2014) han observado que después de una corta exposición, concentraciones de cloruro tan bajas como de  $10\ 000 \text{ mg NaCl L}^{-1}$  (1 % salinidad) puede ocasionar más del 50 % de inhibición sobre el metabolismo anaerobio de PAOs y prácticamente inhibir totalmente el metabolismo aerobio. Una circunstancia similar puede tener lugar debido a la repentina intrusión salina en el alcantarillado (particularmente en regiones costeras), o causado por la descarga de efluentes industriales. Sin embargo, la exposición a largo plazo de un lodo EBPR a altas concentraciones salinas ( $> 35\ 000 \text{ mg NaCl L}^{-1}$ , 3.5 % salinidad) puede favorecer la adaptación de la biomasa EBPR que puede hacerse tolerante a las sales y hacer posible realizar el proceso EBPR a concentraciones salinas equivalentes a las observadas en el agua de mar (Welles, 2015). Otro compuesto potencialmente inhibitorio o tóxico para los lodos EBPR es el  $\text{H}_2\text{S}$ , que puede formarse en el sistema de alcantarillado (debido a intrusiones salinas o descargas industriales) o en la etapa anaerobia del sistema EBPR de lodo activado. Su presencia puede ser realmente inhibitoria al metabolismo anaerobio de PAOs a concentraciones tan bajas como  $20-25 \text{ mg H}_2\text{S L}^{-1}$ , originando 50 % de inhibición (Saad *et al.*, 2013; Rubio-Rincon *et al.*, 2017). Los efectos inhibitorios se reflejan en la limitación de la actividad EBPR. Si fuera posible puede lavarse el lodo en una solución mineral (como se explicó en la Sección 2.2.3.5) para eliminar los compuestos potencialmente inhibitorios o tóxicos.

## 2.3 REDUCCIÓN BIOLÓGICA DE SULFATOS

### 2.3.1 Descripción del proceso

El anión sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) está presente de manera natural en las aguas superficiales y subterráneas, y dependiendo de la localización geográfica, sus concentraciones en las redes de suministro de agua potable pueden variar. Consecuentemente, la presencia de otros compuestos de azufre conocidos como sulfuros orgánicos, incluyendo mercaptanos, dimetil-sulfuros y dimetil-disulfuros, son comunes en las aguas residuales. La concentración de sulfatos en las aguas residuales domésticas se encuentra usualmente en el intervalo de 20 a 60  $\text{mg L}^{-1}$  (Moussa *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a la descarga de efluentes industriales ricos en sulfatos, puede alcanzar valores tan elevados como 500  $\text{mg L}^{-1}$  en sistemas sanitarios que utilizan agua de mar o debido a la intrusión de aguas salobres en el alcantarillado (Lens *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2010; Ekama *et al.*, 2010).

El metabolismo de las bacterias sulfato reductoras (SRB), además de su aplicación en el tratamiento de las aguas residuales domésticas, puede explotarse en forma beneficiosa en el caso específico de procesos de tratamiento de efluentes industriales ricos en sulfatos (Lens *et al.*, 1998; Muyzer y Stams, 2008). Tales industrias son, entre otras, la industria de producción de almidón de papas, molinos de pulpa y papel, industria alimentaria y de fermentación, e instalaciones de procesamiento de productos marinos. En las aplicaciones de sistemas de tratamiento de aguas residuales, el sulfato es casi siempre completamente reducido a sulfuro, puesto que esta conversión es la que manifiesta el cambio más elevado en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ , Tabla 2.3.1).

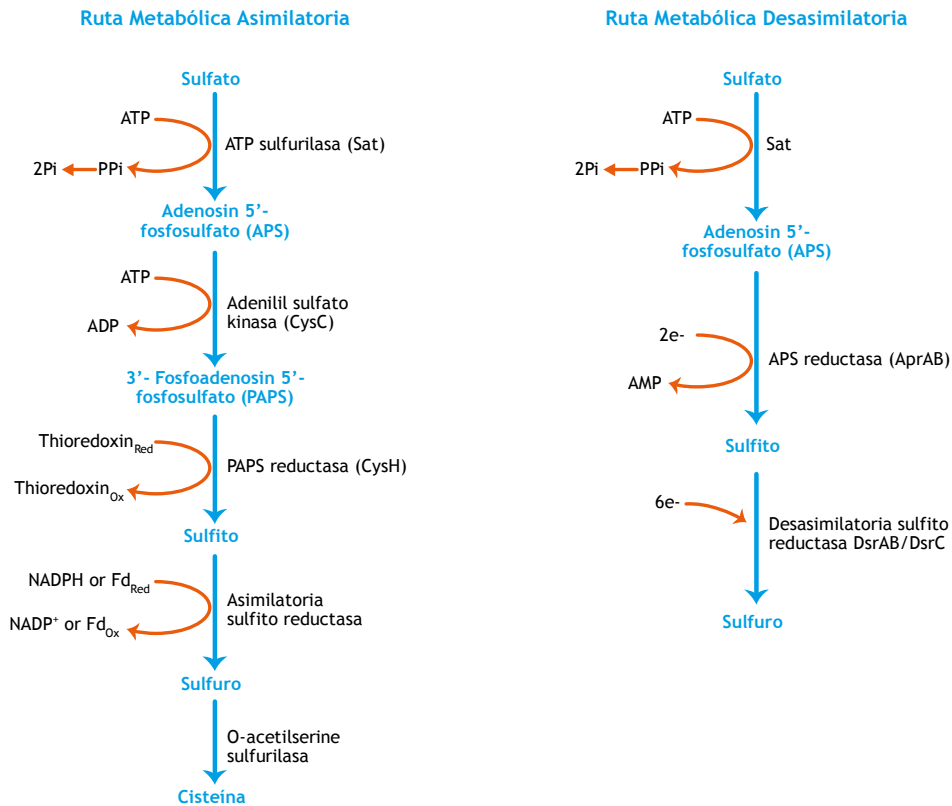
La sulfato-reducción desasimilativa es uno de los procesos anaerobios más importantes en múltiples entornos (Balk *et al.*, 2008). El paso inicial de la reducción biológica del sulfato involucra la transferencia del sulfato exógeno a través de la membrana celular de las bacterias hacia el interior de la célula. El proceso de desasimilación del sulfato transcurre por la vía de la acción de la sulfurilasa del adenosin trifosfato (ATP) (Figura 2.3.1). El ATP produce la molécula altamente activada de adenosin fosfosulfato (APS), y pirofosfato (PPi) en presencia de iones sulfato que promueve la formación de fosfato inorgánico. Adicionalmente, el APS es rápidamente

convertido a ion bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) por la enzima citoplasmática APS reductasa. El pirofosfato se hidroliza y la parte sulfatada del APS es reducida a bisulfito, junto con adenosin monofosfato (AMP). El bisulfito en cambio puede ser reducido vía varios intermediarios para formar ion sulfuro. El bisulfito es reducido a bisulfuro ( $\text{HS}^-$ ) vía bisulfito reductasa. A través de otro mecanismo, la reducción por las enzimas bisulfito-reductasa, tritionato-reductasa y tiosulfato-reductasa origina tritionato ( $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ ) y tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) como intermediarios libres. La fisiología y el crecimiento de estas bacterias han sido estudiados a profundidad y se encuentran bien documentados en diversas publicaciones (Cypionka, 1987; Gibson, 1990; Hansen, 1994; Rabuset *et al.*, 2006).

**Tabla 2.3.1** Reacciones de transformación del sulfato por las bacterias SRB (Jørgensen, 2006; Liamleam y Annachhatre, 2007).

Reacciones	$\Delta G^\circ$ (KJmol <sup>-1</sup> )
$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-152.2
$\text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{HSO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$	+19.7
$\text{HSO}_3^- + 3\text{H}_2 \rightarrow \text{HS}^- + 3\text{H}_2\text{O}$	-171.7
$3\text{HSO}_3^- + \text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{S}_3\text{O}_6^{2-} + 3\text{H}_2\text{O}$	-46.3
$\text{S}_3\text{O}_6^{2-} + \text{H}_2 \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{HSO}_3^- + \text{H}^+$	-123.0
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{H}_2 \rightarrow \text{HS}^- + \text{HSO}_3^-$	-2.1
$\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{APS} + \text{PPi}$	+46.0
$\text{PPi} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{Pi}$	-21.9
$\text{APS} + \text{H}_2 \rightarrow \text{HSO}_3^- + \text{AMP} + \text{H}^+$	-68.0

Los organismos responsables de la reducción de los compuestos de azufre pertenecen a los géneros bacteria y procariota (Postgate, 1965; Muyzer and Stams, 2008). Sin embargo, en la literatura, el término que se aplica es el de bacterias sulfato reductoras (SRB). En este capítulo, la denominación SRB incluye a ambos géneros antes mencionados. Los sulfato-reductores bacterianos están categorizados en diferentes ramas, las *Deltaproteobacterias* con más de 25 géneros, las bacterias Gram-positivas que incluyen *Desulfotomaculum* y *Thermodesulfobium* y los reductores de sulfato Gram-negativos que incluyen *Thermodesulfobacterias* y *Thermodesulfatator* (Mori *et al.*, 2003; Moussardet *et al.*, 2004; Balk *et al.*, 2008). En general, las SRB se encuentran presentes y activas en sistemas de alcantarillado y en plantas de tratamiento de aguas residuales. Varios autores han reportado SRB activas en agua potable, marina, hipersalina y sitios contaminados con petróleo/hidrocarburos (Cravo-Laureau *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006; Kjeldsen *et al.*, 2007).



**Figura 2.3.1** Rutas metabólicas asimilatoria y desasimilatoria de células procariotas sulfato-reductoras (Grein *et al.*, 2013).

Las SRB son organismos anaerobios facultativos que viven en ambientes libres de oxígeno o en ambientes donde el oxígeno es escaso y utilizan el sulfato como aceptor terminal de electrones para producir sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) como uno de sus productos metabólicos finales. Las SRB pueden sobrevivir bajo condiciones ambientales extremas y condiciones de operación en amplios intervalos de pH (4.0 a 9.5), temperatura (25-75 °C) y presiones de hasta 500 atm (Madigan *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2009). El sulfato es sensible al redox (óxido-reducción) del ambiente y la producción de sulfuro es un indicador de la actividad de las SRB, lo que depende de varios factores que incluyen la concentración de sulfato, la concentración de nutrientes/materia orgánica, pH y temperatura, entre otros. En el alcantarillado y las plantas de tratamiento de aguas residuales, la presencia de las SRB es considerada indeseable, debido a los problemas de corrosión y la inestabilidad en la actividad metanogénica, provocando un proceso insuficiente de digestión (Oude Elfreink *et al.*, 1994). Las SRB han sido reconocidas como las bacterias que mayor

influencia tiene en la corrosión microbológica observada en sistemas de drenaje, así como en gasoductos y oleoductos (Al Abbas *et al.*, 2013). La corrosión microbológicamente-inducida se agrava debido a la interacción sinérgica de diferentes microorganismos tales como las bacterias reductoras de hierro, manganeso y de dióxido de carbono que coexisten, a través de un metabolismo cooperativo, con las SRB (Little and Lee, 2007). Según Kjeldsen *et al.* (2004), la presencia de SRB en lodos activados es de interés porque la reducción de sulfatos puede tener efectos negativos colaterales en la operación de las plantas de tratamiento de agua residual. Otros efectos colaterales negativos de la actividad de las SRB es que el ion sulfuro producido inhibirá la acción de otros microorganismos fundamentales en los procesos de tratamiento, tales como las bacterias metanogénicas (MET), microorganismos acumuladores de fósforo (PAO), nitrificadores y otros. Niveles de sulfuro excesivos pueden ser tóxicos para los microorganismos que desarrollan la metanogénesis y la reducción de sulfatos. Altas concentraciones de sulfuro también

pueden tener un efecto nocivo en la estructura de los flóculos del lodo activado. Por ejemplo, vía el rompimiento de los flóculos por la reducción del Fe(III) a Fe(II) como FeS (Caccavo *et al.*, 1996; Nielsen and Keiding, 1998). Estos autores atribuyen este fenómeno a que el Fe(III) tiene mejores propiedades floculantes que el Fe(II), principalmente por su valencia y menor solubilidad.

Por otro lado, la producción de sulfuro puede conducir al crecimiento de bacterias filamentosas produciendo el abultamiento de los lodos (Yamamoto *et al.*, 1991; Zeitz *et al.*, 1995; Kjeldsen *et al.*, 2004).

Con la intención de mitigar el problema de escasez del agua potable mediante el uso del agua de mar para la descarga de inodoros sanitarios, el Grupo de Investigación de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong (HKUST por sus siglas en inglés *Hong Kong University of Science and Technology*) reconoció los beneficios de la presencia de iones sulfatos en las aguas residuales salinas y desarrollaron exitosamente un proceso que aprovecha la gran ventaja del sulfato y de las SRB: el proceso SANI<sup>®</sup> (reducción de sulfato, desnitrificación autotrófica y nitrificación integrada); la única tecnología que emplea las SRB para propósitos de tratamiento de agua residual municipal. Su aplicación ha conducido a producciones menores de lodo, mayor remoción de coliformes (patógenos) y metales pesados, al mismo tiempo que disminuye el espacio necesario y el consumo energético (Wang *et al.*, 2009; Abdeen *et al.*, 2010). Además, procesos basados en SRB han sido aplicados como un paso de pretratamiento para mejorar los procesos de digestión. Recientemente Daigger *et al.* (2015) probaron un bioreactor de membrana a escala piloto (MBR) para la remoción de azufre elemental de un efluente industrial de pulpa y papel pretratado anaeróbicamente, el cual tenía altas concentraciones de sulfuro disuelto. A pesar de que las SRB juegan un papel importante en las plantas de tratamiento, no han sido lo suficientemente estudiadas en sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticos. Para comprender los efectos negativos y positivos de la actividad de las SRB en las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas, deben realizarse pruebas de actividad. Pruebas discontinuas (en batch) pueden ser útiles para estimar en qué medida están presentes y activas las SRB en los albañales y en las plantas de tratamiento, posibilitando una mirada a profundidad para desarrollar medidas que puedan inhibir o estimular la actividad de las SRB, dependiendo del diseño del proceso

seleccionado y las condiciones de operación. Por lo tanto, desde una perspectiva del desempeño del proceso, la estabilidad y continuidad del proceso de tratamiento depende (entre otros) de la concentración de sulfuro (y el pH) presente en la fase líquida.

### 2.3.2 Especiación del sulfuro

El sulfuro se presenta en las aguas residuales en varios estados químicos ( $H_2S$ ,  $HS^-$  y  $S^{2-}$ ). El  $H_2S$  no ionizado es la especie que tiene el mayor efecto inhibitorio, debido a su capacidad de permear la membrana celular. El pH es el factor principal que determina la proporción de  $S^{2-}$  presente en el agua residual. La Figura 2.3.2A muestra la relación entre el pH y la especiación del sulfuro. Como el pH de las aguas residuales se encuentra usualmente alrededor de 7.6, el sulfuro se encontrará mayormente presente como  $HS^-$ . El diagrama Eh-pH mostrado en la Figura 2.3.2B ilustra la ubicación de las especies acuosas dominantes y las fases sólidas estables, en función del potencial redox Eh y del pH. Es importante tener en consideración que en condiciones anaerobias, el sulfuro con valencia cero puede existir en forma disuelta o suspendida en soluciones acuosas, como azufre coloidal, metal ligado o como polisulfuros libres e hidropolisulfuros (Kamyshnyet *et al.*, 2008).

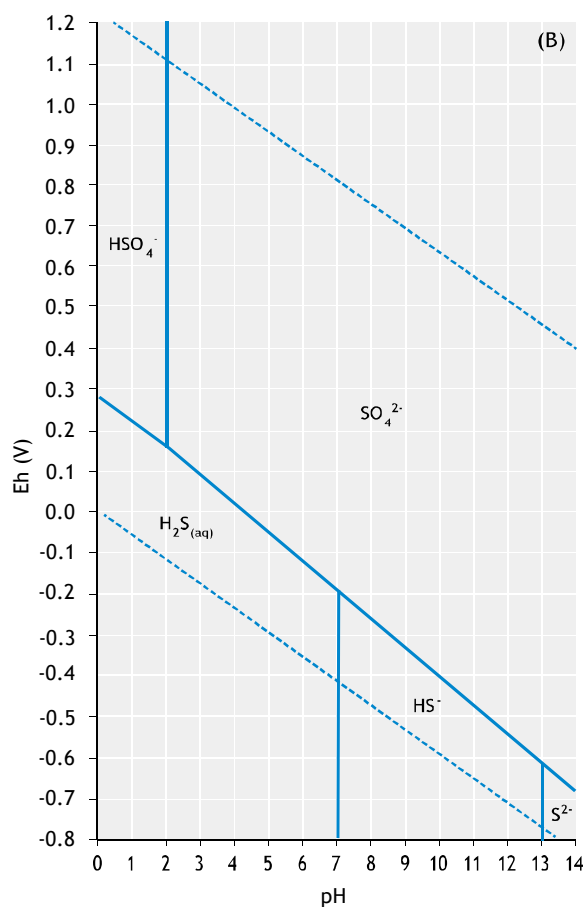
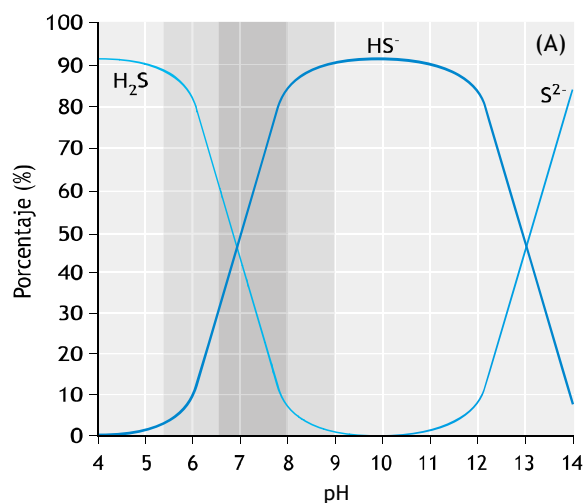
La especiación del sulfuro puede ser afectada por el valor del coeficiente de partición, o sea, la relación de las concentraciones en la fase gaseosa y la fase líquida, sumamente dependiente de la temperatura y pH. Otros parámetros que pueden influir en la especiación del sulfuro son la temperatura y la concentración de sales.

La distribución del sulfuro entre la fase gaseosa (g) y la fase líquida (l) puede representarse por la siguiente ecuación (Hulshoff Pol *et al.*, 1998):

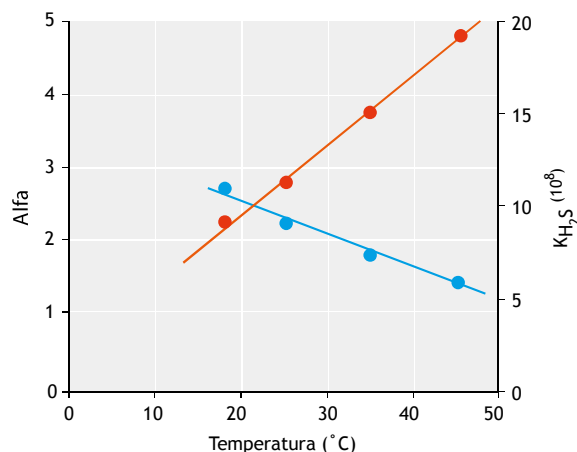
$$S_{H_2S} = \alpha \cdot C_{H_2S} \quad \text{Ec. 2.3.1}$$

Donde  $\alpha$  (alfa) es el coeficiente de distribución adimensional para el equilibrio líquido-gas del  $H_2S$ . En la fase líquida,  $S_{H_2S}$ , el  $H_2S$  existe en forma no ionizada  $H_2S$  o en sus especies ionizadas (como bisulfuro,  $HS^-$  o sulfuro,  $S^{2-}$ ). Incluso, pequeñas variaciones en el pH afectarán significativamente las concentraciones de  $H_2S$  libre. También debe tenerse presente que la constante de la Ley de Henry para el  $H_2S$  a 25°C es aproximadamente  $3.4 \text{ mg L}^{-1}\text{atm}^{-1}$ , indicando una alta volatilidad de esta especie. La dependencia de  $\alpha$  con la temperatura y los

valores de pKa ( $pK_a = -\log K_a = -\log K_{H_2S}$ ) se muestran en la Figura 2.3.3.



**Figura 2.3.2** Especiación del sulfuro en aguas residuales: (A) Influencia del pH a 25°C, adaptado de Rintala y Puhakka (1994); y (B) Diagrama Eh-pH de varias especies de S en solución acuosa (base de datos FACT, adaptada de Bale et al., 2002).



**Figura 2.3.3** Dependencia del coeficiente de distribución alfa (●) y de la constante de disociación pKa (●) del H<sub>2</sub>S en función de la temperatura (adaptado de Hulshoff Pol et al., 1998).

## 2.3.3 Efectos de las condiciones de operación y ambientales sobre las SRB

### 2.3.3.1 Fuente de carbono

Para obtener la energía necesaria para el crecimiento y mantenimiento, las SRB pueden oxidar un amplio rango de sustratos actuando como donante de electrones, incluyendo, entre otros, hidrógeno, alcoholes, ácidos grasos, compuestos aromáticos y alifáticos (Liamleam y Annachatre, 2007), mientras que el sulfato es utilizado como aceptor externo de electrones. En ciertas plantas (industriales), cuando las aguas residuales no contienen suficientes cantidades de donantes de electrones/fuentes de carbono y hay interés en promover la remoción de sulfatos con SRB, usualmente se añade una fuente de carbono externa. Liu y Peck (1981) determinaron los donantes de electrones más apropiados para las SRB en cultivos puros. Varios donantes de electrones han sido estudiados como fuentes energéticas y de carbono para las SRB (Tabla 2.3.2).

La mayoría de los donantes de electrones son productos de fermentación, monómeros o componentes celulares provenientes de otras fuentes. Los tres criterios más importantes para la selección de un donante de electrones adecuado para los procesos de reducción de sulfato son: (i) eficiencia de remoción de sulfatos en efluentes complementados con una baja DQO, (ii) disponibilidad del donante de electrones, y (iii) costo unitario del sulfato convertido a sulfuro (van Houten et al., 1996). Con un mayor interés en el desarrollo de



tecnologías sustentables de SRB, el hidrógeno ha sido identificado como uno de sus más importantes sustratos. Las especies *Desulfovibrio* tienen una alta afinidad por el hidrógeno, y esta se considera la razón por la cual son capaces de superar a los metanógenos hidrógeno-tróficos en ambientes ricos en sulfatos (Widdel, 2006).

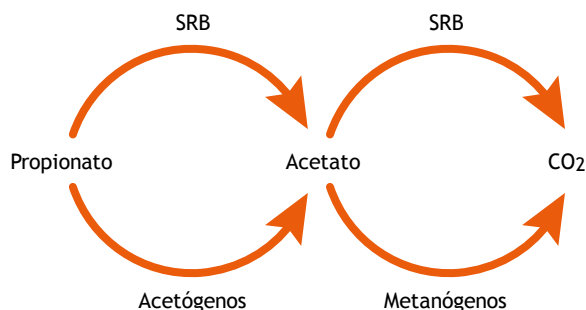
**Tabla 2.3.2** Compuestos usados como sustratos energéticos por las SRB (adaptado de Hansen, 1993).

Compuestos	Sustratos
Inorgánicos	Hidrógeno, Monóxido de carbono, etc.
Ácidos monocarboxílicos	Lactato, acetato, butirato, formiato, propionato, isobutirato, 2- y 3- metilbutirato, ácidos grasos pesados de hasta C18, piruvato. Succinato, fumarato, malato, oxalato, maleinato, glutarato, pimelato.
Ácidos dicarboxílicos	Metanol, etanol, propanol, butanol, etilénol, 1,2- y 1,3-propanodiol, glicerol.
Alcoholes	Glicina, serina, cisteína, treonina, valina, leucina, isoleucina, aspartato, glutamato, fenilalanina.
Aminoácidos	Colina, furfural, oxamato, fructosa, benzoato, 2-, 3- y 4-OH-benzoato, carboxilato ciclohexano, hipurato, ácido nicotínico, indol, antranilato, quinolina, fenol, p-cresol, catecol, resorcinol, hidroquinona,
Diversos	protocatecuato, floroglucinol, pirogalol, 4-OH-phenyl-acetato, 3-phenylpropionato, 2-aminobenzoato, dihidroxiacetona

Las fuentes de energía recientemente usadas para la reducción biológica de sulfato en aplicaciones industriales, incluyen a compuestos orgánicos complejos. Van Houten y col. (1996) usaron gases sintéticos (mezclas de H<sub>2</sub>, CO, y CO<sub>2</sub>) como fuentes energéticas en reactores de flujo ascendente de gas ("gas-lift") a escala de laboratorio y lograron la reducción biológica del sulfato mediante las SRB. Numerosos tipos de desechos orgánicos han sido también utilizadas como fuentes de carbono y donantes de electrones. Estas incluyen hojas de vegetales, virutas de madera, lodos de plantas de tratamiento, aserrín, compost, estiércol animal, suero lácteo y otros desechos agrícolas (Liamleam y Annachatre, 2007). Los lactatos y melazas, a pesar de ser más económicos, no son completamente oxidados por las SRB, originando altas concentraciones de DQO en el efluente. El hidrógeno y el etanol, a pesar de ser más caros, son utilizados para tratar cargas de sulfatos superiores a 200 kg SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>·h<sup>-1</sup>. Sin embargo, por razones de seguridad, el etanol es

preferible ante el hidrógeno. Es interesante hacer notar que una de las primeras fuentes de carbono consideradas fue lodo residual municipal (Butlin *et al.*, 1956) y que además la DQO está usualmente presente en altas concentraciones en las aguas residuales domésticas, sugiriendo que en las aplicaciones de SRB en el tratamiento de aguas residuales, pueden no ser necesarios donantes de electrones externos. Durante la fermentación de la DQO en sistemas de alcantarillado o en las zonas anaerobias de las plantas de tratamiento de agua residual, los ácidos grasos volátiles (AGV), tales como el acetato y el propionato, pueden representar la mayoría de la DQO fácilmente o rápidamente biodegradable (DQORB)). Otros microorganismos como los metanógenos y acetógenos también utilizan los AGV como fuente de carbono bajo condiciones anaerobias, compitiendo contra las SRB por los AGV. Las interacciones entre SRB, metanógenos y acetógenos dependen del tipo de AGV y otros sustratos presentes en las aguas residuales (Figura 2.3.4).

Según las ecuaciones y valores de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) mostrados en la Tabla 2.3.3, puede apreciarse que las SRB pueden utilizar un amplio espectro de fuentes de carbono (lactato, hidrógeno, acetato, propionato y butirato), en tanto los metanógenos dependen fundamentalmente del hidrógeno y acetato, mientras que los acetógenos pueden utilizar lactato, propionato y butirato. Por ello, las SRB compiten con los acetógenos por lactato, propionato y butirato, y contra los metanógenos por hidrógeno y acetato. Globalmente, las SRB pueden tener ventajas mayores sobre otros organismos anaerobios, siempre y cuando exista suficiente sulfato disponible.



**Figura 2.3.4** Competencia entre las bacterias reductoras de sulfato (SRB), metanógenos y acetógenos por ácidos grasos volátiles (AGV).

### 2.3.3.2 Relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

Como se muestra en la Tabla 2.3.3, la oxidación de la DQO ocurre simultáneamente con la reducción del sulfato, en una relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 0.67 g de DQO/gSO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Khanal, 2008). Por ello, una oxidación completa de DQO por las SRB puede lograrse solamente cuando la concentración del sulfato no es limitante (o sea, si la razón DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> es de 0.67 o menor). Para aguas residuales domésticas medianamente concentradas (es decir con una DQO soluble de aproximadamente 300 mg L<sup>-1</sup>), la cantidad mínima de sulfato requerida en el afluente es fácilmente alcanzable cuando se presentan los siguientes casos: intrusión de agua salobre en el alcantarillado, descargas de inodoros con agua salobre y/o descargas de aguas residuales (industriales) ricas en sulfato. Por otro lado, relaciones mayores de DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> favorecerán el crecimiento de bacterias metanogénicas que consumirán parte de la DQO fácilmente biodegradable.

**Tabla 2.3.3** Reacciones típicas para bacterias sulforeductoras, metanógenos y acetógenos: valores de ΔG<sup>o'</sup> (kJ mol<sup>-1</sup>), adaptados de Thauer *et al.* (2007).

Reacción	ΔG <sup>o'</sup> (kJ mol <sup>-1</sup> )
<b>Bacterias reductoras de sulfato</b>	
Lactato <sup>-</sup> + 0.5SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → Acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 0.5HS <sup>-</sup>	-80.2
4H <sub>2</sub> + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + H <sup>+</sup> → HS <sup>-</sup> + 4H <sub>2</sub> O	-36.4
Acetato <sup>-</sup> + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → 2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + HS <sup>-</sup>	-47.6
1.33Propionato <sup>-</sup> + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → 1.33Acetato <sup>-</sup> + 1.33HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 0.75HS <sup>-</sup> + 1.33H <sup>+</sup>	-50.3
2Butirato <sup>-</sup> + SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> → 4Acetato <sup>-</sup> + HS <sup>-</sup> + H <sup>+</sup>	55.6
<b>Metanógenos</b>	
4H <sub>2</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> → CH <sub>4</sub> + 3H <sub>2</sub> O	-33.9
Acetato <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O → CH <sub>4</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-31.0
<b>Acetógenos</b>	
Lactato <sup>-</sup> + 2H <sub>2</sub> O → Acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	-4.2
Propionato <sup>-</sup> + 3H <sub>2</sub> O → Acetato <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 3H <sub>2</sub>	+71.6
Butirato <sup>-</sup> + 3H <sub>2</sub> O → 2Acetato <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> + 2H <sub>2</sub>	+9.6

### 2.3.3.3 Temperatura

La velocidad de reducción de las SRB y su tiempo de duplicación son altamente dependientes de la temperatura (Hulshoff Pol *et al.*, 1998; Pikuta *et al.*, 2000). Se ha observado que el tiempo de duplicación de los microorganismos capaces de llevar a cabo una intensa sulfurogénesis varía drásticamente entre 10 y 118 h dentro de un intervalo de temperaturas de 30 a

60°C (Pikuta *et al.*, 2000). La Tabla 2.3.4 muestra la temperatura óptima de crecimiento de algunas SRB.

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de reducción del sulfato puede evaluarse utilizando el modelo de Arrhenius (Isaksen and Jørgensen, 1996). La energía de activación para la reducción del sulfato puede determinarse graficando el logaritmo de la velocidad de reducción del sulfato contra el inverso de la temperatura según las siguientes expresiones:

$$\ln(r_{\text{SO}_4, \text{An}}) = \ln(A) + \left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad \text{Ec. 2.3.2}$$

Donde E<sub>a</sub> es la energía de activación (J mol<sup>-1</sup>), r<sub>SO<sub>4</sub>,An</sub> es la velocidad de reducción del sulfato (nmol cm<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>), A es una constante, R es la constante de los gases (8.314 JK<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>), y T es la temperatura absoluta (K).

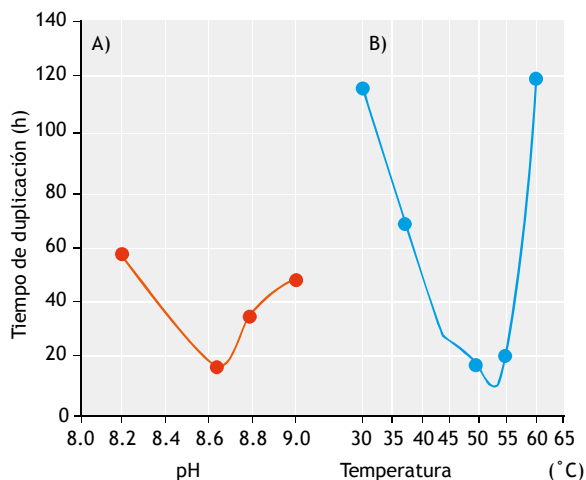
**Tabla 2.3.4** Rango de temperaturas para algunas SRB (Tang *et al.*, 2009).

SRB	Temperatura (°C)	
	Rango	Ópt.
<i>Desulfobacter</i>	28–32	–
<i>Desulfobulbus</i>	28–39	–
<i>Desulfomonas</i>	–	30
<i>Desulfosarcina</i>	33–38	–
<i>Desulfovibrio</i>	25–35	–
<i>Thermodesulforhabdusnorvegicus</i>	44–74	60
<i>Desulfotomaculum luciae</i>	50–70	–
<i>Desulfotomaculum sulfataricum</i>	48–65	60
<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i>	45–62	55
<i>Desulfotomaculum thermocisternum</i>	41–75	62
<i>Desulfotomaculum thermosapovorans</i>	35–60	50
<i>Desulfacinum infernum</i>	64	–

### 2.3.3.4 pH

Otro parámetro que puede influenciar la competencia entre las SRB y los metanógenos es el pH. El pH afecta los diferentes procesos metabólicos de las SRB, metanógenos y acetógenos. Además, el pH afecta la extensión de los rangos inhibitorios o de toxicidad de los AGV y el sulfuro. Un ligero aumento del pH (por ejemplo de 7.6 a 7.8) ayuda a que las SRB se vuelvan dominantes. Ambos, los AGV y los sulfuros, tienden a ser más inhibitorios o tóxicos a pH bajos porque las especies protonadas de los AGV y sólidos totales (ST) son más abundantes a estos pH y pueden difundirse libremente a través de la membrana de los organismos. Con lo anterior, afectan sus constituyentes intracelulares

tales como los mecanismos enzimáticos. De cualquier manera, los metanógenos son más inhibidos por la presencia de los sulfuros que las SRB. Por tanto, los experimentos de actividad en sistema batch con relación al contenido de AGV, relación DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, y efecto del pH sobre la actividad de las SRB son de interés práctico. Un ejemplo típico que muestra el efecto de la temperatura y del pH sobre el tiempo de duplicación de las SRB se ilustra en la Figura 2.3.5.



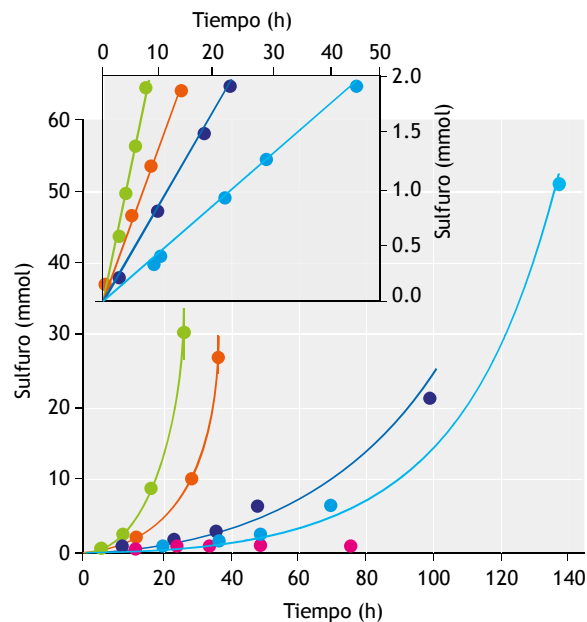
**Figura 2.3.5** Influencia de (A) pH y (B) temperatura sobre el tiempo de duplicación de cepas bacterianas capaces de sulfurogénesis con alta velocidad (adaptado de Pikuta *et al.*, 2000).

Pikuta *et al.* (2000) mostraron la influencia del pH sobre el tiempo de duplicación de una cepa de organismos (referida como S1<sup>T</sup>) capaz de exhibir una alta tasa de sulfurogénesis. Como se ilustra en la Figura 2.3.5, el pH óptimo de crecimiento estuvo entre 8.0 y 9.15, mientras que los tiempos de duplicación variaban entre 20 y 58 h, en dependencia de los valores iniciales de pH. El tiempo de duplicación de otra especie bacteriana sulfato-reductora, HHQ 20, aislada por enriquecimiento al utilizar hidroxihidroquinona y sedimento de Venecia, fue el menor (40 h) en el intervalo de pH de 6.9-7.2, mientras que a pH 5.0 y 8.0 los tiempos de duplicación fueron tres veces mayor (Reichenbecher y Schink, 1997).

### 2.3.3.5 Oxígeno

Las SRB son conocidas como organismos anaerobios. Sin embargo, se ha observado actividad sulfato reductora en regiones oxigenadas de lechos microbianos y sedimentos marinos, pero hasta hoy, no se conoce ningún cultivo puro capaz de desempeñar la reducción

desasimilatoria de sulfato en presencia de concentraciones de oxígeno superiores a 1 μM (Cypionka, 2000; Kjeldsen *et al.*, 2004). Kjeldsen *et al.* (2004) desarrollaron experimentos de exposición al oxígeno a corto y largo plazo y monitorearon las velocidades de reducción de sulfato bajo condiciones anóxicas de incubación (Figura 2.3.6)



**Figura 2.3.6** Perfiles de producción de sulfuro en incubación batch de muestras de lodo expuestas a 0 h (●), 33 h (●), 73 h (●), y 121 h (●) de aireación constante. El símbolo (●) representa una muestra que fue esterilizada y expuesta a 121 h de aireación. El recuadro insertado representa las fases lineales iniciales de las curvas respectivas del mismo experimento (adaptado de Kjeldsen *et al.*, 2004).

Las velocidades de reducción de sulfato, calculadas a partir del aumento lineal inicial en las concentraciones de sulfuro, disminuyeron de 0.24 a 0.04 μM h<sup>-1</sup> cuando el tiempo de aireación se extendió de 3 a 121 h. Esto fue atribuido a la inactivación temporal de una creciente fracción de la población de SRB. Según se muestra en la Figura 2.3.6, las curvas de producción de sulfuro siguen un perfil bifásico, o sea, un incremento lineal resultante de la actividad de un número constante de SRB, seguido de un incremento exponencial representativo de la reactivación de las SRB. Habiendo registrado la concentración de oxígeno en el seno de la fase líquida y no en el interior de los flóculos de lodo, los autores enunciaron una importante interrogante sobre si las SRB estaban protegidas ante la exposición de oxígeno en nichos microanóxicos creados por la alta actividad respiratoria y la resistencia a la difusión dentro

de los flóculos durante los experimentos de aireación. Los resultados de sus experimentos sugieren que las SRB son capaces de adaptarse a estas situaciones y que cortos tiempos de exposición al oxígeno no afectan necesariamente su actividad sulfato-reductora.

### 2.3.4 Montaje experimental

Para estimar la velocidad de reducción de sulfato o la tasa de producción de sulfuro en un reactor de lodo activado específico, debe desarrollarse un ensayo de actividad cuando el reactor es operado bajo condiciones de estado estacionario por al menos tres tiempos de residencia de sólidos (TRS). Sin embargo, si se desea prever la evolución de la velocidad con el tiempo, la misma debe chequearse más frecuentemente después de cambiar las condiciones del proceso del bioreactor. Por ejemplo, dependiendo de (i) las preguntas de investigación a responder, (ii) las condiciones de operación, (iii) el sustrato y (iv) compuestos tóxicos presentes (si los hubiera), los ensayos de actividad deben llevarse a cabo por triplicado, al menos una vez cada dos semanas.

#### 2.3.4.1 Estimación de tasas volumétricas y específicas

La Tabla 2.3.5 brinda una visión general de los parámetros de interés. Las velocidades o tasas volumétricas de reducción de sulfato o producción de sulfuro pueden calcularse para cada ensayo, a partir de la mayor pendiente de la fase exponencial. Las ecuaciones para las relaciones de actividad volumétrica específica son:

$$r_{SO_4, An} = \ln \left( \frac{S_{SO_4, final}}{S_{SO_4, inicial}} \right) / \text{Tiempo} \quad \text{Ec. 2.3.3}$$

$q_{SO_4, An}$  = Actividad volumétrica/Concentración inicial de biomasa

o bien,

$$q_{SRB, SO_4, An} = \frac{r_{SO_4, An}}{X_{SRB}} \quad \text{Ec. 2.3.4}$$

Donde  $S_{SO_4, final}$  es la concentración final de sulfato ( $\text{mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ ) y  $S_{SO_4, inicial}$  es la concentración inicial de sulfato ( $\text{mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ ) en la prueba de actividad en batch.

**Tabla 2.3.5** Parámetros estequiométricos y cinéticos de interés para las SRB en lodo activado (BA: Biomasa Activa).

Parámetros	Símbolo	Unidades típicas
<b>Estequiométricos</b>		
Razón entre $\text{SO}_4^{2-}$ reducido y AGV consumido	$Y_{SO_4/AGV, An}$	S-mol C-mol <sup>-1</sup> mg $\text{SO}_4^{2-}$ mg AGV <sup>-1</sup>
<b>Cinéticos</b>		
Velocidad específica de consumo de AGV	$q_{SRB, AGV, An}$	C-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> mg AGV mg BA <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Velocidad específica de consumo de $\text{SO}_4^{2-}$	$q_{SRB, SO_4, An}$	S-mol C-mol <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> mg $\text{SO}_4^{2-}$ mg BA <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>

#### 2.3.4.2 El reactor

Para evaluar la presencia y actividad de las SRB, los experimentos a realizar en batch deben conducirse bajo condiciones anaerobias, ya sea usando reactores herméticos (ver Secciones 2.2.2.1 y 2.2.4.1) o bien botellas de suero (Figura 2.3.7). Los reactores o botellas de suero utilizados para llevar a cabo las experiencias deben tener los medios requeridos para: (i) evitar la intrusión de oxígeno bajo condiciones anaeróbicas, (ii) suministrar condiciones satisfactorias de mezclado, (iii) mantener una temperatura adecuada y deseable, (iv) controlar el pH, y (v) tener boquetes adicionales para tomar muestras o para la adición de afluente, soluciones, gases y cualquier otro medio líquido o sustrato usado en el ensayo.

Además, varias botellas de suero pueden ser montadas en paralelo como alternativa para determinar las velocidades cinéticas en las pruebas realizadas en batch. Esta práctica es conocida como uso de botellas de sacrificio. Son de particular interés cuando se utilizan cultivos puros de SRB para evitar la contaminación, pero también para hallar las conversiones a diferentes tiempos (cinética), bajo estrictas condiciones anaeróbicas y sin poner en riesgo el equilibrio de las fases (gas, líquido y sólidos), el cual puede ser fácilmente alterado cuando se muestrea. En este caso, cuando se emplean botellas de sacrificio, todos los ensayos en batch deben iniciarse con idénticas concentraciones de biomasa inicial que permitirán la estimación de las velocidades de reducción del sulfato y de producción de sulfuro. Con la intención de llevar a cabo estas pruebas y mantener la pureza del cultivo original de SRB (cuando se requiera), diferentes botellas o viales de vidrio deben usarse, manteniendo condiciones experimentales similares y sacrificando un

vial para cada muestra. Manteniendo estos múltiples viales (o botellas) en las mismas condiciones experimentales, la posibilidad de contaminación durante el muestreo puede ser completamente nula y los volúmenes de las fases líquida y gas permanecerán constantes. Como se explicó con anterioridad, hay que tomar las debidas precauciones para garantizar los ambientes estrictamente anaerobios requeridos para el crecimiento de las SRB. Independientemente de la medición de concentración de sulfuros en la fase líquida, los perfiles de concentración de sulfuro de hidrógeno en la fase gaseosa deben ser registrados para determinar el balance de sulfuros en las botellas de experimentación.



**Figura 2.3.7** Botellas de suero con lodo de SRB colocadas en un agitador orbital (Foto: Van den Brand, 2015).

### 2.3.4.3 Mezclado

Cuando se utilizan reactores de cierre hermético, las condiciones de mezclado pueden suministrarse según descrito en la Sección 2.2.2.1 (sobre EBPR). Cuando se usan botellas de suero (o viales), las condiciones de mezclado son suministradas por medio de una base o plataforma orbital de agitación en la cual se colocan y operan varias botellas al mismo tiempo. Debe garantizarse el mezclado apropiado y evitar la estratificación que podría ser causada por las variaciones en la capacidad de sedimentación del lodo. La velocidad de agitación de la base o plataforma debe

ajustarse de manera tal que no afecte la estructura de los flóculos del lodo.

### 2.3.4.4 Control del pH

El pH afecta los diferentes procesos metabólicos de las SRB, metanógenos y acetógenos (MET, AC) y por tanto necesita ser cuidadosamente controlado y registrado. En los reactores, el pH puede controlarse según se describe en la Sección 2.2.2.1. En viales y botellas de suero, el pH puede controlarse utilizando un agente amortiguador en el medio. Esto puede lograrse por la adición de soluciones buffer tales como  $\text{CaCO}_3$  o buffer de fosfato durante el comienzo de la incubación. Para controlar el pH afectado por la actividad microbiológica, algunos autores han recomendado la adición de buffer de bicarbonato de sodio, o bien de Tris (tris-hidroximetil-amino-metano) preparado a partir de una amina  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ . En bioreactores, las soluciones preparadas a partir de KOH, NaOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , o HCl pueden ser añadidas automáticamente para mantener el valor de pH (Mohan *et al.*, 2005).

### 2.3.4.5 Control de temperatura

Las velocidades de reducción de sulfato de las SRB y su tiempo de duplicación son dependientes de la temperatura (Hulshoff Pol *et al.*, 1998; Pikuta *et al.*, 2000). Por lo tanto, es recomendable operar los reactores con control automático de temperatura, siguiendo los procedimientos y con el equipamiento descrito en la Sección 2.2.2.1. Para experimentos en botellas de suero o viales, a menudo se utiliza un baño de agua, una incubadora o un pequeño cuarto con control de temperatura. Esto hace posible controlar la temperatura de varias botellas de manera simultánea.

### 2.3.4.6 Puertos de muestreo y de dosificación

Cuando los experimentos son llevados a cabo en reactores, los requerimientos para los puertos de muestreo y de dosificación serán los mismos que los descritos en la Sección 2.2.2.1. Cuando se emplean botellas de suero o viales, las muestras de líquido o gas se toman con jeringas acopladas a agujas hipodérmicas a través de los tapones de goma. Si hay suficiente presión en el espacio libre superior del frasco, no habrá intrusión de oxígeno hacia el interior del sistema. De manera alternativa, para evitar la formación de micro agujeros en el tapón debido a la perforación repetida durante el muestreo, una válvula plástica de tres vías con una aguja acoplada puede fijarse al septo de manera permanente.



### 2.3.4.7 Toma de muestras

Si en casos específicos, hay interés en medir la actividad de las SRB en un agua residual municipal, deben tomarse muestras del afluente crudo. En este caso, la mayoría de la actividad de las SRB en las aguas residuales estará ligada a las SRB existentes en las biopelículas adheridas a los conductos del desagüe por lo que la actividad de las SRB medida en el afluente crudo en el laboratorio puede no ser representativa de la actividad real que tiene lugar en el alcantarillado. Se recomienda seguir protocolos específicos mientras se toman muestras de la biopelícula de los desagües.

En las plantas de tratamiento a escala piloto o a escala real, las muestras de lodo pueden tomarse en los diferentes lugares donde se precisa establecer la actividad de las SRB: tanques de sedimentación primaria, selectores anaerobios, tanques anóxicos o aerobios, espesadores o digestores anaerobios. En aquellos casos en que los ensayos son desarrollados con cultivos enriquecidos de SRB en el laboratorio, es también posible convertir los bioreactores continuos o los reactores secuenciales batch en un modo de operación batch, para medir las actividades. Esto se considera a menudo beneficioso pues usualmente, el montaje experimental está adecuadamente equipado, y a menudo presenta más opciones para controlar y medir, en comparación con los frascos batch comunes. La desventaja de llevar a efecto los experimentos batch en el reactor “madre” (como es generalmente aplicable para todos los cultivos microbianos de interés) es la posible perturbación del sistema a causa de (una combinación) varios factores tales como la extracción de licor mezclado debido al muestreo adicional, la aplicación de diferentes condiciones de operación requeridas por las pruebas en batch, cambios en la composición del sustrato y su concentración o cambios en la duración de las fases.

### 2.3.4.8 Medios

Cuando se emplea el lodo activado como fuente de SRB, puede usarse agua residual real como sustrato, siguiendo los procedimientos descritos en las Secciones 2.2.2.4 y 2.2.3.3. La composición del medio depende del objetivo de la prueba. Para la determinación de las tasas de conversión de las SRB bajo las condiciones establecidas en el reactor “madre”, la composición del medio debe ser idéntica a la alimentación aplicada al mencionado reactor. Para comparar la velocidad a otras condiciones, pudiera considerarse aplicar un medio

estándar similar para cada condición. Sin embargo, cuando la interrogante de investigación incluye la búsqueda del efecto de ciertos componentes sobre la actividad de las SRB, los compuestos de interés deben ser o bien añadidos o bien extraídos del medio. Si van a ejecutarse varios ensayos de naturaleza similar, es recomendable preparar un volumen de medio suficiente para ahorrar tiempo en la preparación. Como se describe en la Sección 2.3.4.4, la solución amortiguadora de pH adecuada puede añadirse inicialmente a los viales de incubación batch para mantener el pH.

Dependiendo de los objetivos del ensayo de actividad, la composición de DQO y su concentración, así como las concentraciones de sulfato presentes en el agua residual sintética pueden variar, puesto que usualmente ellas son objeto de investigación. Además, las composiciones pueden ajustarse proporcionalmente, en función de la duración del experimento y de la concentración de lodo utilizada. De forma usual, concentraciones de hasta 50 y 100 mg DQORB L<sup>-1</sup> se emplean para experimentos con muestras de lodo activado de plantas a escala real, y de hasta 400 mg DQORB L<sup>-1</sup> con cultivos enriquecidos en el laboratorio. Independientemente de la naturaleza del ensayo de actividad, el agua residual sintética debe contener los macro y micro elementos requeridos (tales como potasio, magnesio, calcio, hierro, cinc y cobalto entre otros) en cantidades suficientes para las SRB, con la intención de evitar cualquier limitación metabólica que pudiera poner en peligro los resultados de la prueba de actividad en batch.

El medio de Postgate es el más comúnmente empleado para el cultivo de las SRB y para llevar a cabo ensayos de actividad de las SRB (Postgate, 1984). Este medio está compuesto por (en g L<sup>-1</sup>) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5), NH<sub>4</sub>Cl (1.0), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.2), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5), DQO (3.0), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (2.0), extracto de levadura (1.0), ácido ascórbico (0.1), ácido tioglicólico (0.1), y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.0). El acetato de sodio (NaAcetato·3H<sub>2</sub>O) puede usarse como fuente de carbono. Sin embargo, varias formulaciones de aguas residuales sintéticas para llevar adelante experimentos de actividad han sido descritas en la literatura, dependiendo de la fuente de carbono utilizada (Villa-Gomez *et al.*, 2011). van den Brand *et al.* (2014a) recomendaron la siguiente composición del medio: NaAcetato·3H<sub>2</sub>O (486.2 mg L<sup>-1</sup>), NaPropionato (147.1 mg L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (37.8 mg L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (14.2 mg L<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>Cl (382 mg L<sup>-1</sup>), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (93.4 mg L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (58.4 mg L<sup>-1</sup>), elementos traza (1 mL L<sup>-1</sup>), y una fuente adecuada de sulfato (por ejemplo: MgSO<sub>4</sub>), originando una concentración de sulfato de 500 mg L<sup>-1</sup>.

Para experimentos de actividad de las SRB en procesos fermentativos, Villa-Gomez *et al.* (2011) emplearon la siguiente composición del medio en bioreactores continuos y en batch:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (500 mg  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (200 mg  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2.500 mg  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (50 mg  $\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2.500 mg  $\text{L}^{-1}$ ) y lactato como donante de electrones. Sin embargo, es de notar que se recuerde que una combinación de fuentes de carbono complejas (lactato y AGV) y sulfato puede utilizarse, siempre cuando la relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  sea menor que 0.67. Sin embargo, mientras se llevan a efecto estos ensayos, puede notarse sin dificultad un oscurecimiento del medio debido a la reducción del sulfato y la producción del sulfuro. Otros ejemplos de compuestos que pueden aplicarse para introducir sulfatos en las aguas residuales sintéticas son el agua de mar o el sulfato de sodio teniendo en cuenta que la relación  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  sea de 0.67. Los elementos traza pueden prepararse de acuerdo a Lau *et al.* (2006). Si el experimento requiere un valor particular de  $\text{DQO}/\text{SO}_4^{2-}$  con la intención de investigar el efecto de los niveles de sulfato en exceso o limitantes, los medios pueden ser ajustados simplemente mediante la adición de pequeñas cantidades de sulfato o más DQO. Cuando el medio va a prepararse con antelación, tenga en consideración que se deben separar los medios que contienen fuentes de DQO y fuentes de N para evitar que biomazas crezcan en los contenedores de los medios preparados. El color final de estos medios debe ser transparente. Si varios experimentos serán desarrollados en un período definido de tiempo, las aguas residuales sintéticas pueden ser preparadas en forma concentrada, esterilizadas en autoclave (por 1 h a  $110^\circ\text{C}$ ) y empleadas como solución “madre” almacenada (a diluir antes de su utilización). De cualquier manera, la solución debe desecharse si se observa cualquier precipitación o pérdida de transparencia.

Para los experimentos desarrollados con cultivos enriquecidos de laboratorio, es recomendable realizar los ensayos de actividad con el mismo medio (sintético) que se emplea en el cultivo. De manera alternativa y similarmente a lo que ocurre cuando se emplea lodo de plantas de escala real, el efluente del reactor puede recolectarse, filtrarse a través de filtros de poros gruesos para retirar las partículas mayores, y emplearse para preparar los medios requeridos, añadiendo las concentraciones deseadas de sulfato y carbono para ejecutar los ensayos de actividad.

## 2.3.5 Procedimientos analíticos

Los análisis de laboratorio requeridos en los ensayos de actividad de las SRB pueden desarrollarse siguiendo protocolos estandarizados y comúnmente empleados (como se describe en la Sección 2.2.2.5).

Sin embargo, para estimar la actividad de las SRB, teniendo solo unos pocos parámetros de interés, se requiere una modificación de las técnicas/protocolos estándares. Por tanto, se brinda a continuación una detallada descripción de los métodos para determinar DQO y sulfuros. El análisis para determinar sulfatos también se incluye puesto que este es un parámetro de interés en los exámenes de actividad de las SRB. Sin embargo, para cada análisis, es importante darse cuenta que algunos componentes interfieren con los resultados analíticos. Por ejemplo, la determinación de DQO es muy sensible cuando en las muestras hay presencia de cloruros. El efecto de tales compuestos sobre los resultados analíticos debe verificarse mediante la realización del análisis sin este compuesto.

En lo relativo a las mediciones de concentración de sulfuro, esto podría evaluarse preparando una solución estándar de sulfuro a una concentración conocida y de otra solución que además contiene el compuesto que supuestamente afecta el resultado. Entonces el análisis de ambas soluciones debe desarrollarse en paralelo. El primer análisis debe efectuarse usando la solución estándar; y, el segundo usando la solución estándar más el compuesto sospechoso a los niveles de concentración que usualmente se espera tenga en el licor. Si la concentración de sulfuro medida es la misma en ambos análisis, entonces el efecto del potencial compuesto perturbador no es significativo (dentro del rango de concentraciones aplicadas) y, por consiguiente, los procedimientos analíticos pueden considerarse apropiados.

### 2.3.5.1 DQO<sub>orgánica</sub> y DQO<sub>total</sub>

El método para medir la DQO ha sido extensamente descrito en la literatura (APHA *et al.*, 2012), a pesar de que se requieren adecuaciones importantes. Es usualmente sencillo determinar la DQO total de una muestra o sólo la fracción de DQO soluble. Para medir la fracción de DQO soluble, la muestra debe filtrarse a través de un filtro de  $0.45 \mu\text{m}$ . El sulfuro también influye sobre los valores de DQO y a menudo esta interferencia no es deseada. Por lo tanto, deben llevarse a efecto dos análisis, nombrados de ahora en adelante

$DQO_{orgánica}$  y  $DQO_{total}$ . La  $DQO_{total}$  en este caso particular (pudiendo tratarse también de la concentración total de DQO en forma soluble) también incluye la contribución del sulfuro, mientras que en el análisis de  $DQO_{orgánica}$ , la contribución debida a las interferencias del sulfuro puede eliminarse mediante la aplicación de una corrección matemática y, por ello, la concentración de DQO está solamente asociada al contenido de materia orgánica presente en la muestra. Como recomienda Boyles (1997), prepare un estándar separado para el sulfuro y lleve adelante el ensayo de DQO sobre el estándar, y aplique una corrección matemática al resultado de  $DQO_{total}$  de la muestra.

Otro método utilizado para extraer completamente el sulfuro de la muestra se basa en el procedimiento de precipitación de Poinapen *et al.* (2009). Unas pocas gotas de solución de NaOH 10 M se añaden a la muestra, lo que aumentará el pH e inducirá la precipitación del sulfuro. El sistema  $H_2S/HS^-$  tiene una  $pK_{s1}$  de 7.05 a 25°C (Bjerrum *et al.*, 1985) y a un valor de pH de 10.0 la mayoría del sulfuro presente en la muestra estará en forma de  $HS^-$  con una muy pequeña proporción en forma de  $S^{2-}$  ( $pK_{s2}=12.92$  a 25°C). Ni las especies de  $HS^-$ , ni las especies de  $S^{2-}$  pueden escapar de la muestra puesto que ambos componentes están disociados. Consecuentemente, el sulfato de cinc ( $ZnSO_4$ ) se añade y precipita con el sulfuro como sulfuro de cinc ( $ZnS$ ), el que debe separarse de la muestra por filtración. Finalmente, las concentraciones medidas deben ser corregidas por la dilución con solución de  $ZnSO_4$ .

### 2.3.5.2 Sulfato

El sulfato puede medirse por varias técnicas, como gravimétrica, cromatografía de iones, método de azul de metiltimol y turbidez. Estos métodos están descritos en la literatura (APHA *et al.*, 2012). El método más comúnmente usado es vía un kit de Hach, con un procedimiento basado en turbidez, o usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipada con una columna AS9-SC y un detector electroquímico ED 40 (Dionex).

### 2.3.5.3 Sulfuro

Dependiendo del pH, el sulfuro puede estar presente en varios estados. Por esa razón es importante desarrollar el ensayo de determinación de sulfuro tanto en la fase líquida como en la gaseosa.

### Muestras líquidas

Cuando se toman muestras para hacer mediciones de concentración de sulfuro, los procedimientos que se aplican son cruciales porque el sulfuro se pierde fácilmente durante el muestreo, por volatilización o por reacciones químicas. Es por ello que es importante solubilizar la fracción volátil en la fase líquida, por ejemplo, empleando una solución de NaOH. Para el análisis de sulfuro se puede elegir entre dos principales procedimientos. El primero es referido como método indirecto de DQO, mientras que el segundo es el método directo con azul de metileno. Ambos procedimientos se describirán en esta sección.

Sabiendo que 1 g de sulfuro corresponde a ~2 g de DQO, el contenido de sulfuro puede por tanto expresarse según su contenido de DQO. Esto puede lograrse mediante la medición de la concentración de DQO en la muestra en términos de  $DQO_{total}$  y  $DQO_{orgánica}$ . La concentración de DQO debe analizarse empleando el método estándar, según los pasos de tratamiento previamente descritos (Sección 2.3.5.1). La concentración de sulfuro podría entonces calcularse al restar el valor de la  $DQO_{orgánica}$  del valor de la  $DQO_{total}$ , y estimando la concentración de sulfuro base en su demanda teórica de oxígeno. La expresión para calcular el contenido de sulfuro ( $S_{H_2S}$  en  $g L^{-1}$ ) es:

$$S_{H_2S} = (DQO_{total} - DQO_{orgánica}) / 2 \quad \text{Ec. 2.3.5}$$

Donde el valor de 2 es la relación másica Sulfuro/DQO (m/m).

En el método directo del azul de metileno, específico para la determinación de sulfuros, se utiliza acetato de cinc para asegurar un alto grado de fijación del sulfuro. Consecuentemente, los reactivos que contiene dimetil-parafenil-diamina y hierro se emplean para formar azul de metileno, resultando en la generación de una solución azul. La intensidad de color puede analizarse fotométricamente para cuantificar la concentración de sulfuro en la muestra.

### Muestras en fase gaseosa

Las muestras en fase gaseosa deben recolectarse de las botellas de incubación (batch) usando jeringas herméticas (por ejemplo: fabricadas por Hamilton, USA). El método más comúnmente empleado para estimar las concentraciones de  $H_2S$  en la fase gaseosa es por cromatografía de gases (CG). Li *et al.* (2013) usaron un cromatógrafo gaseoso (Agilent 6890 N, USA) acoplado a un detector fotométrico de llama (FPD) y

una columna capilar DB-1701 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm, Hewlett Packard, USA) para estimar las concentraciones de H<sub>2</sub>S. Las temperaturas de la estufa, del puerto de inyección y del detector se fijaron a 100, 50, y 200 °C, respectivamente, mientras que como gas portador se empleó nitrógeno gas. Las concentraciones de H<sub>2</sub>S pueden determinarse también por titulación usando una solución estándar de yoduro-iodato de potasio como solución para titulación y almidón como indicador (APHA *et al.*, 2012). Otro método rápido y de fácil aplicación para monitorear las concentraciones de H<sub>2</sub>S en plantas de tratamiento de aguas residuales es con el empleo de tubos detectores de gas (Kitagawa, Japan). Las concentraciones de H<sub>2</sub>S pueden también medirse empleando analizadores de sulfuro de hidrógeno (Jerome 631-X, Arizona Instruments, USA). Sin embargo, en casos en los que se dificulta realizar el análisis de forma inmediata, deben usarse bolsas Tedlar (bolsas de muestreo Tedlar, Sigma-Aldrich) para recolectar las muestras de gas en reactores operados de manera continua.

La temperatura y la presión son dos factores importantes que necesitan considerarse durante la calibración del cromatógrafo para mediciones de H<sub>2</sub>S en fase gaseosa. Si S<sup>2-</sup> en fase líquida se añade a un sistema cerrado, la concentración de H<sub>2</sub>S en la fase gaseosa resultante en el sistema puede calcularse según:

$$C_{H_2S} = 22.4 + 10^6 \cdot \frac{\rho \cdot V_L}{MM \cdot V} + \frac{T}{273} + \frac{760}{P} \quad \text{Ec. 2.3.6}$$

Donde  $\rho$  es la densidad del líquido (g mL<sup>-1</sup>),  $V_L$  es el volumen de líquido (mL),  $T$  es la temperatura (K),  $P$  es la presión (mm Hg),  $MM$  es la masa molar (g mol<sup>-1</sup>) y  $V$  es el volumen del sistema cerrado (L).

## 2.3.6 Ensayos de actividad de SRB en batch: preparación

Esta sección describe no solo los diferentes pasos sino también las características de los equipos y materiales necesarios para la ejecución de los ensayos de actividad de las SRB.

### 2.3.6.1 Equipos

Si los experimentos se llevan a cabo en un reactor, se puede aplicar la descripción provista en la sección 2.2.3 sobre los EBPR. Si los ensayos se ejecutan en viales o botellas de suero, se requieren los siguientes aparatos:

1. Botellas de suero, incluyendo tapones de goma y grapas de aluminio para asegurar un ambiente anaerobio.
2. Suministro de gas nitrógeno.
3. Un electrodo de pH.
4. Un controlador de pH de dos vías para añadir HCl y/o NaOH (como alternativa se puede utilizar un control de una vía para adición de HCl, o bien un control de pH manual con la adición manual de HCl y/o NaOH).
5. Un termómetro (se recomienda un intervalo de temperatura de trabajo entre 0°C y 40°C). Confirmar que los electrodos o medidores (pH y termómetros) han sido calibrados no más de 24h antes de la ejecución del ensayo en batch, y de acuerdo con las guías y recomendaciones de los proveedores o fabricantes.
6. Un cuarto o una incubadora para controlar la temperatura al valor deseado.
7. Base o plataforma orbital para agitación en la que pueda establecerse una velocidad de agitación de 300 rpm.
8. Una pipeta con sus correspondientes puntas de plástico medir el volumen exacto de las muestras tomadas.
9. Jeringas y agujas para tomar muestras de los viales de suero haciendo vacío.
10. Filtros con tamaño de poro de 0.45 μm para filtrar las muestras y para propósitos de preservación.
11. Adicionalmente, todos los materiales requeridos para los análisis. Éstos se mencionan en la Sección 2.3.5.

### 2.3.6.2 Materiales

1. Dos cilindros graduados de 1 o 2 L de volumen (dependiendo del volumen de lodo utilizado) para contener la muestra y lavarla, si se requiere.
2. Al menos dos jeringas plásticas (preferiblemente de 20 mL o al menos de 10 mL de volumen) para la recolección y determinación de los compuestos solubles (después de la filtración).
3. Al menos 3 jeringas plásticas (preferentemente de 20 mL de volumen) para la recolección de muestras con sólidos particulados o compuestos intracelulares (sin filtración).
4. Al menos 3 jeringas de vidrio (de preferencia de 5 mL de volumen) para la recolección de muestras en fase gaseosa.
5. Filtros con tamaño de poro de 0.45 μm, convenientemente que no sean de acetato de celulosa porque estos pueden liberar trazas de

celulosa o acetato hacia el seno de la fase líquida recolectada. Considere al menos tener un número de filtros dos veces mayor que la cantidad de muestras que deben ser filtradas para la determinación de compuestos solubles.

6. Recipientes de plástico transparente con volumen de 10 o 20 mL para recolectar las muestras para la determinación de compuestos solubles (por ejemplo: DQO soluble, acetato, propionato, sulfato y sulfuro)
7. Recipientes de plástico transparente con volumen de 10 o 20 mL para recolectar las muestras de SSLM y SSVLM. Considere tomar estas muestras por triplicado en atención a la variabilidad asociada a la técnica analítica.
8. Una caja plástica o nevera para hielo seco, llena de esta sustancia, con volumen suficiente para el almacenamiento temporal (de hasta 1 o 2 h después de la conclusión de la medición de actividad) de los recipientes plásticos y tubos de centrifugación después de la toma de muestras.
9. Guantes plásticos y lentes de seguridad.
10. Pipetas Pasteur o de plástico para añadir HCl y/o NaOH (si el pH se controla de manera manual).
11. Grapas metálicas de laboratorio para cerrar las mangueras usadas en los puntos de muestreo, cuando las muestras no se están tomando en el reactor o fermentador.

### 2.3.6.3 Medios y soluciones de trabajo

- **Agua residual real**

Ver Sección 2.2.3.3 sobre EBPR.

- **Medios o sustratos sintéticos**

Si el ensayo requiere agua residual sintética, según el tipo de prueba, el medio sintético afluente pudiera contener una mezcla de fuentes de carbono y sulfato así como nutrientes relevantes (macro y micro). Generalmente ellos pueden mezclarse todos juntos en el mismo medio o repartirse en dos soluciones (i) fuente de DQO y (ii) fuentes de  $\text{SO}_4^{2-}$  y N más los demás nutrientes.

- a. Solución de DQO: debe estar compuesta por DQORB, preferiblemente ácidos grasos volátiles (AGV) tales como acetato y propionato, dependiendo de la naturaleza o interés del ensayo, así como los correspondientes objetivos (preguntas de investigación). Para ensayos de actividad anaerobia en batch, se necesita ajustar la concentración para asegurar que la DQO

añadida se consuma totalmente en el lapso de tiempo que dura el ensayo. Para los ensayos de actividad en batch llevados a cabo con lodos activados de plantas de tratamiento a escala real, usualmente las concentraciones de DQO recomendadas no son mayores a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Para muestras de licor mezclado de lodos cultivados a escala de laboratorio, las concentraciones de DQO pueden ser tan altas como las del afluente del sistema (y aún algunas veces de dos a tres veces mayor). Un ejemplo de solución de DQO es una preparada con NaAcetato·3H<sub>2</sub>O ( $486.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) or Na-Propionato ( $147.1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

- b. Solución de sulfato: El sulfato puede añadirse como sulfato de sodio. Sin embargo, en algunos casos, y de manera particular cuando se tratan aguas residuales salobres, el sulfato es acompañado por salinidad. Para reproducir estas condiciones, es también posible añadir sales marinas (conteniendo sulfatos). Las concentraciones de sulfato pueden ajustarse, si se desea, dependiendo de los propósitos del experimento. La solución de nutrientes debe contener todos los macronutrientes (amonio, magnesio, calcio y potasio) y micronutrientes esenciales (hierro, boro, cobre manganeso, molibdato, cinc, ioduro y cobalto) para asegurar que no se limite el metabolismo de las SRB. Las deficiencias en nutrientes pueden conducir a interpretaciones erróneas de los resultados, y en casos extremos, al fracaso del experimento. Por ello, hay que asegurarse que los compuestos requeridos por la solución se agreguen en las cantidades adecuadas. La composición del medio que se recomienda es descrita en la Sección 2.3.4.8
- c. Lavado: Si la muestra de lodo debe lavarse para remover alguna sustancia indeseable (que puede ser inhibitoria o tóxica) prepare una solución fresca de nutrientes para lavar los lodos, misma que puede tener una composición similar a la del medio descrito anteriormente, pero sin AGV. El proceso de lavado debe repetirse de 2 a 3 veces siguiendo un procedimiento similar al reportado en la Sección 2.2.3.5. Después de ello, los pasos de preparación necesarios de los ensayos de actividad en batch pueden ejecutarse.
- d. Preparación de soluciones de ácido y base: ver la Sección 2.2.3.3 (sobre EBPR).



Si los análisis no son llevados a cabo en laboratorios especializados subcontratados, se requiere preparar una reserva de soluciones de trabajo para la determinación de los parámetros de interés, de acuerdo con los métodos y protocolos estándar correspondientes (APHA et al., 2012).

### 2.3.6.4 Preparación de material

- Para información sobre el número de muestras, vea la Sección 2.2.3.4 (ensayos de actividad en batch de procesos EBPR).
- Frecuencia de recolección de muestras
  - a. Si deben determinarse las tasas cinéticas máximas (por ejemplo, velocidad específica máxima de consumo de acetato o propionato o velocidad máxima de reducción de sulfato), entonces incremente la frecuencia de muestreo durante las primeras horas o días de incubación. En general, las muestras deben tomarse una vez cada 5 min durante los primeros 30-40 min de duración del ensayo para determinar la actividad, de forma similar al método descrito para ensayos de EBPR.
  - b. Si el interés es sobre las razones estequiométricas y no las tasas cinéticas (por ejemplo, la relación  $\text{SO}_4^{2-}$  reducido anaeróbicamente/HAc consumido), entonces las muestras pueden recolectarse solo para el comienzo y final de cada fase, para determinar las conversiones de interés dentro del período seleccionado (fase).

- Para aumentar la confiabilidad de los datos obtenidos y determinar las condiciones iniciales del lodo, es fuertemente recomendable tomar una serie de muestras antes de añadir los medios o soluciones de trabajo. Defina cuidadosamente los volúmenes máximo y mínimo de trabajo del reactor, como se describe en la Sección 2.2.2 de los EBPR.
- La preparación de los recipientes de muestreo puede realizarse según se describe en la Sección 2.2.3.2 de los EBPR. Un simple plan de trabajo presentado en una hoja de cálculo (Sección 2.3.9) puede ser bastante útil para ejecutar y seguir la frecuencia de recolección de muestras. Más aún, esta hoja de cálculo puede utilizarse para mantener una base de datos de los diferentes ensayos de actividad en batch efectuados. Organice todo el material requerido dentro de un radio de acción relativamente pequeño, en el entorno de la realización del experimento. Ello para evitar la demora en la manipulación y la preparación de las muestras. No más de 24 h antes de la ejecución de los ensayos, calibre todos los medidores (pH y termómetros) y resguarde temporalmente las sondas en soluciones adecuadas, siguiendo las recomendaciones particulares de los fabricantes correspondientes. Confirme que sus lecturas son confiables antes de comenzar los ensayos de actividad. Las muestras deben almacenarse y preservarse apropiadamente hasta que sean analizadas (Tabla 2.3.6).

**Tabla 2.3.6** Procedimiento recomendado para el almacenamiento y preservación de muestras para los ensayos de determinación de actividad de las SRB.

Parámetro	Material del contenedor de muestra	Método de preservación	Tiempo máximo recomendado entre el muestreo y el análisis
Sulfato	Plástico o vidrio	Filtrar inmediatamente después de tomar la muestra a través de un filtro con 0.45 $\mu\text{m}$ de tamaño de poro y guardar a 1-5 °C, o congelar a -20 °C.	24 h para muestras almacenadas entre 1-5 °C; hasta un mes para muestras congeladas.
Sulfuro	Plástico o vidrio	Solubilizar inmediatamente añadiendo una gota de solución 1M de NaOH.	Se recomienda hacer esta medición tan rápido como sea posible.

### 2.3.6.5 Preparación del licor mezclado

Estos procedimientos consideran que los ensayos de actividad en batch pueden efectuarse tan rápido como sea posible después de la toma de muestras de los sistemas a pequeña escala (laboratorio) o planta completa o, en el peor de los escenarios, dentro de las 24 horas siguientes a la recolección.

No se recomienda realizar las pruebas batch pasadas las 24 horas de la toma de muestra de licor mezclado, porque potencialmente el cultivo de SRB puede presentar algunos cambios bioquímicos durante la manipulación (a menos que el tiempo de exposición después de la recolección sea de interés particular en la investigación). Teniendo en cuenta los comentarios anteriores, se recomiendan los siguientes 3 protocolos para preparar las muestras de licor mezclado para desarrollar los ensayos de actividad en batch:

1. Si el ensayo de actividad en batch puede iniciarse dentro de la hora siguiente o posterior a la toma de muestra de lodo y si la muestra de lodo no necesita lavarse:
  - a. Ajuste la temperatura del reactor batch, en el que van a efectuarse los ensayos, al valor fijado para el estudio.
  - b. Tome la muestra en el sistema de tratamiento (planta de tratamiento de aguas residuales PTAR o reactor a escala de laboratorio) de alguno de los siguientes lugares:
    - Del afluente crudo.
    - A la salida del tanque o etapa aerobia.
    - A la salida de los sedimentadores de lodo primario o secundario, o de los digestores anaerobios.
    - Del reactor madre de laboratorio.
  - c. Transfiera la muestra de biomasa de SRB tomada hacia el reactor batch o hacia la botella de suero donde tendrá lugar el ensayo de determinación de actividad.
  - d. Inicie con una agitación suave (de 50-100 rpm en el caso del reactor) y haga seguimiento de la temperatura de la muestra de lodo, colocando un termómetro dentro del reactor o del vial de suero (si no tiene un termómetro incorporado).
  - e. Mantenga las condiciones de mezclado hasta que el lodo haya alcanzado la temperatura fijada en el estudio.
  - f. Mantenga las condiciones anaerobias utilizando un reactor cerrado herméticamente y/o inyectando gas  $N_2$  para evitar/reducir la intrusión de oxígeno en el sistema.
  - g. Si se detecta nitrato en las muestras aerobias tomadas, siga las instrucciones presentadas en la Sección 2.2.2.3 sobre los EBPR. Alternativamente, para concentraciones de nitrato mayores que  $10 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$ , se puede añadir 9 mg de DQO por cada mg de nitrato detectado ( $9 \text{ mg DQO mg NO}_3\text{-N}^{-1}$ ). Tan pronto como deje de observarse la presencia de nitrato, el lodo puede ser inmediatamente utilizado para conducir el ensayo de actividad anaeróbica en batch. Las tiras de detección de nitrato y nitrito (Sigma-Aldrich) pueden utilizarse para una estimación rápida de la presencia de estos compuestos.
2. Si los ensayos de actividad en batch pueden iniciarse en menos de una hora después de la toma de la muestra de lodo, pero la muestra de lodo de licor mezclado necesita lavarse, siga los procedimientos de lavado descritos en la Sección 2.2.3.5.
  - a) Transfiera la muestra lavada de lodo al reactor o al fermentador en el que los ensayos de actividad serán desarrollados.
  - b) Comience a agitar suavemente (entre 50-100 rpm en el caso del reactor) y siga la temperatura de la muestra de lodos mediante el uso de un termómetro de inmersión (si el sistema no tiene termómetro incorporado).
  - c) Mantenga las condiciones de agitación hasta que el lodo haya permanecido por al menos 30 minutos a la temperatura de trabajo fijada para el estudio.
3. En algunos casos, a consecuencia de la localización o de la distancia, los ensayos no pueden iniciarse en menos de 1 h o 2 h después de la toma de muestra (pero se puede dentro de las 24 h siguientes). Entonces:
  - a) Ajuste la temperatura del reactor batch al valor fijado para el ensayo.
  - b) Mantenga fría la muestra de lodo hasta el comienzo del ensayo (por ejemplo, poniendo el recipiente en un refrigerador a  $4^\circ\text{C}$ ).
  - c) Antes del análisis, saque la muestra del refrigerador, nevera o cuarto refrigerado.
  - d) Agite el contenido para lograr una muestra homogénea y representativa con una concentración de SSLM similar a la del sistema de laboratorio o de escala completa del que fue originalmente tomada.
  - e) Si la muestra debe lavarse, lave el lodo en una solución mineral (ver Sección 2.3.6.3 sobre soluciones de trabajo).
  - f) Transfiera el lodo ya lavado al reactor o al fermentador donde se llevará a cabo el ensayo de actividad en batch.
  - g) Comience a suministrar o dosificar nitrógeno gaseoso por el lodo al mismo tiempo que mezcla cuidadosamente para extraer cualquier oxígeno disuelto remanente.
  - h) Siga el valor de la temperatura de la muestra de lodo colocando un termómetro en el interior del reactor (si este no tiene un termómetro incorporado).
    - i) Mantenga la alimentación de nitrógeno y mezcle los contenidos por al menos 1 h (máximo 2 h), pero asegúrese que el lodo se encuentra expuesto a la temperatura de trabajo fijada en el estudio por al menos 30 min.
    - j) Si se detecta nitrato después del procedimiento de ajuste de temperatura (ver Sección 2.3.6.3), añada una solución de DQO degradable a razón de 9 mg de DQO por mg de  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Tan pronto

como deje de observarse la presencia de nitrato, el lodo puede ser utilizado de inmediato para comenzar y llevar a cabo el ensayo de actividad anaeróbica en batch.

### 2.3.6.6 Recolección de muestras y tratamiento

Además de las muestras gaseosas que pudieran ser recolectadas, durante la ejecución de este ensayo de actividad se requieren tres tipos de muestra del reactor batch: (i) muestra filtrada, (ii) muestra filtrada y con NaOH y (iii) muestra de biomasa. La Tabla 2.3.7 provee una lista de los análisis correspondientes a las diferentes muestras y pasos de tratamiento.

**Tabla 2.3.7** Lista de análisis desarrollados en cada muestra.

Muestra	Parámetro
Muestra filtrada	DQO <sub>total</sub> , DQO <sub>orgánica</sub> , Sulfato
Muestra filtrada con NaOH	Sulfuro
Muestra de Biomasa	SSVLM; SSLM

#### • Muestra filtrada

La muestra filtrada se emplea para los análisis de DQO<sub>total</sub>, DQO<sub>orgánica</sub> y sulfato. Una muestra homogénea de lodo es tomada de la botella de suero con una aguja hipodérmica y una jeringa. La aguja se inyecta en el tapón de goma y entonces el vial se vira bocabajo de modo que la aguja quede inmersa en la fase líquida. Así, con la jeringuilla se recoge la muestra líquida. A continuación, la muestra es filtrada directamente mediante un filtro de 0.45µm. Después de esto, las concentraciones de DQO<sub>total</sub>, DQO<sub>orgánica</sub> y sulfato se miden siguiendo los protocolos descritos en la Sección 2.3.5.

#### • Muestra filtrada con NaOH

Para los análisis de concentración de sulfuro se emplea la muestra filtrada a la que se han añadido unas pocas gotas de NaOH. La muestra debe transferirse en un tubo conteniendo tres gotas de NaOH 1M inmediatamente después de ser tomada. Esto se ejecuta usando una aguja y una jeringa. La aguja se inserta en el tapón de goma; se vira entonces el vial bocabajo para que la aguja quede inmersa en el líquido. Se recoge la muestra con la jeringuilla. Mientras más rápido se mezcle la muestra con la solución de NaOH, menos será el sulfuro que se pierda durante el muestreo. A continuación, la muestra es filtrada usando un filtro de tamaño de poro de 0.45 µm y se analiza según lo descrito en la sección 2.3.5. Este análisis debe efectuarse inmediatamente después de recoger la muestra, para evitar pérdidas de sulfuro.

#### • Muestra gaseosa

Muestras de fase gaseosa deben extraerse de los viales de incubación utilizando jeringas de vidrio herméticamente selladas. Debe prepararse una curva de calibración en el cromatógrafo de gases usando cilindros de gas H<sub>2</sub>S como estándar (ejemplo: de 25 a 1000 ppm). El análisis en fase gaseosa debe efectuarse inmediatamente después de haber recogida la muestra de los reactores para evitar pérdidas.

#### • Muestra de biomasa

Con la intención de estimar las concentraciones de SSVLM y SSLM, debe extraerse del reactor una muestra bien mezclada. El método más simple es utilizando una jeringa con aguja. Asegúrese de conocer exactamente el volumen tomado del reactor. Los SSVLM y SSLM deben analizarse por triplicado como se indica en la literatura (APHA *et al.*, 2012) La frecuencia de análisis de DQO, sulfato y sulfuro dependerá de la actividad de la biomasa. Después de procesar los datos para estos parámetros, se requiere tener una línea recta (como se presenta en la figura 2.3.8) para su adecuada interpretación. A mayor cantidad de puntos presentes en esta línea, mejor, pero el balance de la inversión (en términos de tiempo y costo) sugiere que 4 puntos pueden ser los mínimos suficientes. La opción más segura es tomar varias muestras durante la primera hora, en intervalos de cada 5, 10 o 15 minutos. La mejor manera es desarrollar un muestreo intensivo durante los primeros ensayos (como prueba) y sobre la base de estos resultados hacer un diseño más exacto para definir cuántos datos puntuales son realmente requeridos para la ejecución de los ensayos subsiguientes.

### 2.3.7 Ensayo de actividad en batch: ejecución

Esta sección describe cómo debe ejecutarse el ensayo de actividad en batch para medir la actividad de las SRB. La descripción consiste en una lista de materiales y reactivos químicos, protocolos para preparar los medios de cultivo, plan de muestreo (patrón de tiempo), recolección de muestras y análisis. Esta sección concluye con una propuesta paso a paso para llevar a cabo los ensayos de actividad de las SRB. La lista de materiales y reactivos específicos para los análisis, así como la forma en que estos deben ser ejecutados, son descritas en la sección 2.3.6.

Las recomendaciones generales que se brindan en la Sección 2.2.2 sobre los EBPR deben ser seguidas igualmente para los ensayos de actividad para las SRB. La Tabla 2.3.8 ofrece ejemplos de ensayos típicos desarrollados para evaluar las actividades de las SRB.

**Tabla 2.3.8** Ensayos típicos para el análisis de actividad de las SRB

Código del ensayo	Redox	Descripción corta y objetivo del ensayo
<b>SRB.ANA.1</b>	Anaerobio	Llevado a cabo con agua residual real, por ejemplo, afluyente crudo, para determinar la tasa de conversión exacta de las SRB en esta condición particular.
<b>SRB.ANA.2</b>	Anaerobio	Desarrollado usando un medio estándar definido (ver Sección 2.3.4.8) para comparar las velocidades de reducción de sulfato de las SRB en diferentes condiciones.

#### Ensayo de actividad anaerobia de las SRB, SRB.ANA.1

El primer paso en la ejecución del ensayo de actividad de las SRB es asegurar la correcta composición del medio y seguir un plan experimental correctamente diseñado (Sección 2.3.8.2). Ambos pasos dependen de manera importante del objetivo y alcance de la investigación, pero también del origen del lodo de las SRB (cultivo enriquecido, cultivo mixto o cultivo recolectado de reactores de escala real o de laboratorio). El volumen requerido de la muestra de lodo depende del objetivo del estudio a realizar y de las preguntas de investigación. Debe asegurarse que la biomasa y las concentraciones de la fase líquida/gas sean lo más similares posible a la situación original, a menos que se requiera de otra manera. Después del diseño experimental, deben seguirse los pasos que se muestran a continuación. La descripción refiere al uso de viales de suero, pero el enfoque sirve igualmente cuando se trata de ensayos de actividad llevados a cabo en reactores.

1. Prepare los elementos a utilizar a partir de la lista de materiales y reactivos.
2. Prepare las soluciones necesarias para llevar a cabo las determinaciones analíticas.
3. Prepare las soluciones madres del medio de cultivo.
4. Llene los viales con medio adecuado y corrija el pH si es necesario, con HCl y/o NaOH.
5. Transfiera el lodo de SRB en las botellas de suero (preservando lo más posible las condiciones anaeróbicas, por ejemplo, evitando turbulencias).
6. Cierre las botellas de suero con tapones de goma y precintos de aluminio.
7. Suministre gas N<sub>2</sub> en los viales y en la fase líquida. Para ello, conecte un extremo de la manguera a la línea de suministro de gas N<sub>2</sub> y al otro extremo conecte una aguja. Inyecte la aguja al septum de la botella. Use otra manguera similar que cuente con una aguja en un extremo y también inyéctela en el septum pero coloque esta segunda aguja ligeramente por encima de la fase líquida para que pueda liberar la sobrepresión. Esta última aguja no debe tocar la fase líquida, si así no fuera, el líquido podría escapar debido a la posible sobrepresión. El otro extremo de la segunda manguera debe ser sumergido en un líquido. Para frascos de 80-110 mL, suministre gas N<sub>2</sub> por 1 min para obtener las condiciones anaeróbicas requeridas, pero esto puede comprobarse mediante la adición de resazurina (tinte azul). El medio se volverá incoloro cuando se torne anaerobio. Extraiga ambas agujas del tapón al mismo tiempo. Los viales deben estar ahora bajo condiciones anaerobias.
8. Tome ahora una muestra a el tiempo  $t = 0$  y manipule inmediatamente ésta y cualquier otra muestra. La muestra se toma utilizando una jeringa. Entonces vire la botella de manera tal que la aguja toque el líquido (evitando la extracción de biomasa). Desplace el émbolo hacia detrás para recoger la muestra.
9. Transfiera parte de la muestra (para determinar la concentración de sulfuro) y viértala lentamente y sin causar ninguna turbulencia sobre una gota de una solución de NaOH 1M. El resto de la muestra puede usarse para determinar la DQO y realizar el análisis de sulfatos. Las muestras para sulfuro deben ser solubilizadas en NaOH e inmediatamente analizadas.
10. Siga el plan de muestreo en el tiempo.
11. Una vez cumplido el último muestreo, abra las botellas de suero, tome las muestras de biomasa y realice los análisis de SSVLM y SSLM.
12. Si por las características del ensayo, se debe recuperar la biomasa SRB y por lo tanto se desea devolver el lodo restante del frasco al reactor original, lave el lodo tres veces con el medio empleado en el reactor “madre” (original). Si la composición del medio no es conocida, utilice entonces agua desmineralizada para el lavado.
13. Para analizar los datos, siga el procedimiento descrito en la Sección 2.3.8.
14. Nota: Si en lugar de frascos, se utiliza un reactor para el ensayo de actividad en batch, se recomienda

seguir un procedimiento similar al descrito para ensayos anaerobios EBPR (ver Sección 2.2.4).

### Ensayo de Actividad Anaerobia SRB.ANA.2

Debe seguirse un enfoque similar para el ensayo SRB.ANA.2 usando medios sintéticos (Sección 2.3.6.3) para estimar la actividad de las SRB.

## 2.3.8 Análisis de datos

### 2.3.8.1 Balances de masa y cálculos

Los datos experimentales pueden utilizarse para calcular la actividad sulfato reductora de las SRB (Sección 2.3.8.2). La formación de sulfuro es resultado de la actividad de las SRB y la variabilidad de los coeficientes cinéticos depende de la fuente de carbono, las concentraciones iniciales de sulfato y la presencia de determinados géneros de SRB. Las mediciones adicionales de DQO, sulfato y sulfuro, tomadas al tiempo  $t = 0$  (“in”) y al final de la corrida (“out” o efluente) deben usarse para chequear los balances de masa. Las determinaciones de velocidad pueden ser confiables solo con los balances de masa efectuados correctamente. Las ecuaciones de balance de masa para la DQO y los compuestos sulfurados pueden representarse según se describe a continuación.

Balance de DQO:

$$DQO_{\text{orgánica,in}} + DQO_{\text{H}_2\text{S,in}} = DQO_{\text{orgánica,out}} + DQO_{\text{H}_2\text{S,out}}$$

Ec. 2.3.7

Balance para el azufre:

$$S_{\text{SO}_4,\text{in}} + S_{\text{H}_2\text{S,in}} = S_{\text{SO}_4,\text{out}} + S_{\text{H}_2\text{S,out}}$$

Ec. 2.3.8

También es posible calcular un balance de electrones.

Para calcular la velocidad de reducción biológica del sulfato (únicamente cuando los balances de masa son correctos) deben ejecutarse los siguientes cálculos:

- a. Usar una curva de calibración estándar para convertir los valores de densidad óptica medidos ( $OD_{675}$ ) en el espectrofotómetro, a unidades de concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ).
- b. Convertir las concentraciones de sulfuro de  $\text{mg L}^{-1}$  a  $\text{mM}$  (si se desea). La masa molar del sulfuro completamente soluble ( $\text{S}^{2-}$ ) es  $34 \text{ g mol}^{-1}$ .
- c. Tome el valor promedio del triplicado.
- d. Para obtener un perfil que indique la cantidad de sulfuro producido en el tiempo, corrija para las concentraciones de sulfuro presentes a  $t = 0 \text{ min}$  (mediante la sustracción de este valor de todos los valores).
- e. Determine la pendiente basándose en los datos de las primeras muestras, para las cuales debe esperarse una línea recta.
- f. Divida el valor de la pendiente por la cantidad de biomasa presente ( $\text{g de SSV}$ ) para hallar la velocidad específica (en  $\text{mmol SO}_4^{2-} \text{ g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). La formación de un mol de sulfuro se relaciona con la remoción de un mol de sulfato. Se requiere también de una corrección de molaridad a mol.

### 2.3.8.2 Discusión e interpretación de datos

Los resultados de los análisis de DQO, sulfato y sulfuro, de las muestras tomadas durante el inicio y la terminación de los ensayos, pueden usarse para chequear los balances de masa. Como el sulfuro se pierde fácilmente durante el muestreo, un balance de masa del 100% es difícil de obtener. Por tanto, un balance de masa que satisfaga el 95 % de cierre se considera satisfactorio para continuar el análisis de los datos. Si en un ensayo en batch, solo la formación de sulfuro se analiza para medir la velocidad de reducción biológica de las SRB, es importante llevar a cabo el análisis por triplicado. Es también muy importante verificar los balances de masa, lo que es posible mediante la ejecución de los análisis de DQO y sulfatos a  $t = 0$  y al final del ensayo. El método del azul de metileno es una técnica muy sencilla y muy confiable. Así, cuando el balance de masa se ajusta a alrededor de un 95 % o más, el perfil de acumulación de sulfuro puede ser la base para calcular la velocidad de reducción. Es también posible en este tipo de análisis determinar los parámetros de conversión característicos tal como la máxima velocidad de reducción. Para medir la velocidad máxima de reducción es crucial que todos los compuestos estén presentes en exceso. Entonces, la máxima velocidad de conversión puede determinarse como se describe en las Secciones 2.3.9 y 2.2.5.2. El método gráfico de Lineweaver-Burk puede usarse para determinar los parámetros característicos. Este método ha sido descrito a detalle por Nelson y Cox (2005).

Existen escasos datos sobre ensayos de actividad de SRB que hayan sido específicamente desarrollados para el tratamiento de aguas residuales domésticas. Algunos resultados disponibles en la literatura se muestran en la



Tabla 2.3.9 y es evidente que existe un amplio intervalo de velocidades de reducción de sulfato reportado dependiendo de las condiciones de operación. A pesar que las SRB son microorganismos estrictamente anaerobios, en algunos estudios (por ejemplo, Lens *et al.*, 1995) se llevaron a cabo con cultivos provenientes de plantas de tratamiento reales de aguas residuales que contenían bajas concentraciones de sulfato en el afluente. Lo anterior dió como consecuencia que las tasas de reducción fueran significativamente más bajas que aquellas observadas en cultivos de laboratorio altamente enriquecidos con SRB (van den Brand *et al.*, 2014a; 2014b; 2015).

**Tabla 2.3.9** Velocidades de reducción de sulfatos ( $q_{SRB,SO_4,An}$ ) reportadas en la literatura con lodos provenientes de diferentes sistemas.

Sistema	Escala	$q_{SRB,SO_4,An}$ ( $mg\ SO_4^{2-}\ g\ VSS^{-1}\ h^{-1}$ )	Referencias
CBR	Real	1-11	Lens <i>et al.</i> (1995)
LAC	Real	0-3.1	Lens <i>et al.</i> (1995)
LAC	Laboratorio	1.9	Lens <i>et al.</i> (1995)
LAN	Real	6-7.3	Lens <i>et al.</i> (1995)
LAN	Laboratorio	11.6	Lens <i>et al.</i> (1995)
LAN	Laboratorio	100-220	van den Brand <i>et al.</i> (2014a; 2014b; 2015)

CBR: Reactor de contacto biológico rotatorio

LAC: Lodo activado convencional

LAN: Lodo Anaerobio

### 2.3.9 Ejemplo

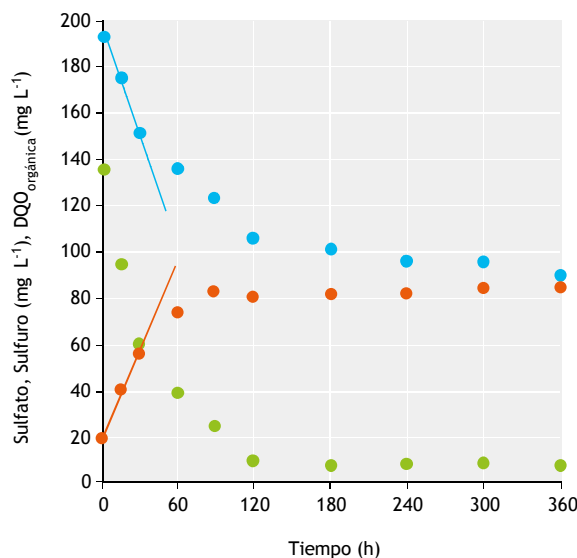
La Tabla 2.3.10 muestra un ejemplo de una hoja de cálculo que puede usarse para ejecutar diferentes ensayos de actividad de SRB. El ejemplo se refiere a un ensayo basado en mediciones de sulfuro producido, DQO, sulfatos a diferentes tiempos y Sólidos Suspendedos Volátiles (SSV). La Figura 2.3.8 es un ejemplo de un ensayo desarrollado con agua residual sintética que además incluyó el análisis de AGV (acetato y propionato).

Para este ensayo se sugiere llevar a efecto varias (al menos 10) mediciones de sulfato y DQO, y mediciones de SSV/SST del lodo al concluir el ensayo, como se describe en la Sección 2.3.7.

Aplicando el protocolo descrito en la Sección 2.3.5 se obtiene una gráfica en la que puede determinarse la pendiente. El perfil típico obtenido de un ensayo de actividad de SRB se presenta en la Figura 2.3.8. La

pendiente calculada en este ejemplo es  $225\ mg\ SO_4^{2-}\ h^{-1}$  lo que corresponde a  $2.34\ mmol\ SO_4^{2-}\ h^{-1}$ . La cantidad de biomasa en el recipiente era de  $4.5\ g\ SSVLM$ . El volumen de trabajo del reactor fue de  $2.5\ L$ . La velocidad específica real de reducción biológica de sulfato fue calculada según:

$$q_{SRB,SO_4,An} = \frac{2.34}{4.5} = 0.53\ mol\ SO_4\ g\ SSV^{-1}\ h^{-1} \quad Ec. 2.3.9$$

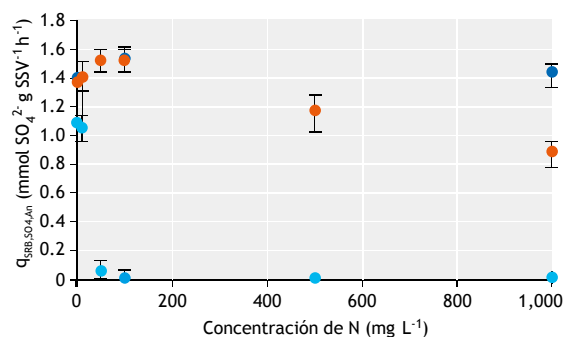


**Figura 2.3.8** Ejemplo de gráfica mostrando las concentraciones de sulfuro (●), sulfato (●) y DQO orgánica (●) durante un ensayo de actividad, de tipo SRB.ANA.2, a partir de la cual la velocidad de reducción de sulfatos puede ser calculada.

El ensayo de actividad de las SRB podría también aplicarse para investigar el efecto de algún componente en la velocidad de reducción de sulfato. La Figura 2.3.9 presenta un ejemplo de un estudio comparando el efecto de diferentes compuestos de nitrógeno (amonio, nitrato y nitrito), a diferentes concentraciones de N (den Brand *et al.*, 2015). Mediante el cálculo de la velocidad de reducción de sulfato bajo condiciones específicas, como se ilustra en la Fig. 2.3.9, y presentando todos los resultados en una misma gráfica, puede analizarse el efecto de los compuestos nitrogenados sobre la velocidad de reducción de sulfato. En este caso se incluyen las barras de error para mostrar la exactitud de las mediciones. La velocidad de reducción de sulfato disminuyó con el aumento de la concentración de nitrógeno (Figura 2.3.9).

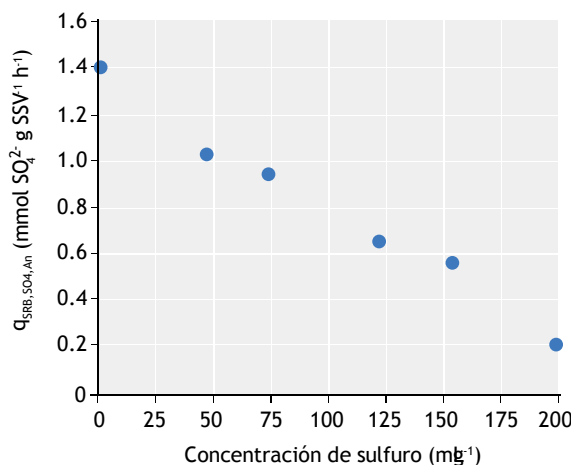
**Tabla 2.3.10** Ejemplo típico de hoja de cálculo para un ensayo de actividad de SRB (tipo SRB.ANA.2). Nótese que cuando se desea más información acerca de la cinética, el análisis de sulfato y  $DQO_{orgánica}$  debe desarrollarse durante todos los tiempos seleccionados. Sin embargo, en lugar de la  $DQO_{orgánica}$ , deben medirse las concentraciones reales de acetato y propionato.

Ensayo batch de actividad anaerobia de reducción de sulfatos										Código: SRB.ANA.2	
<b>Fecha:</b>	Miércoles, 11 Nov 2015, 9:00 h					<b>Procedimiento experimental (simplificado)</b>					
<b>Descripción:</b>	Ensayo a 10 °C, pH 7, sustrato sintético, cultivo enriquecido.					1. Confirmar disponibilidad de equipos y materiales.					
<b>Ensayo No.:</b>	1 de 3					2. Confirmar funcionalidad y calibración de sistema, medidores y sensores.					
<b>Duración:</b>	6,0 h (360 min)					3. Llene las botellas serum con los medios de cultivo y corrija el pH.					
<b>Substrato:</b>	Sintético: acetato y propionato (total 400 mg L <sup>-1</sup> )					4. Tome primera muestra para determinación de DQO (acetato y propionato: $DQO_{orgánica}$ ).					
<b>Punto de muestreo:</b>	Botellas serum					5. Transfiera 100 mL de lodo a las botellas serum.					
<b>Muestras No.:</b>	SRB.ANA.2(1.1-1.11)					6. Cierre las botellas serum con los tapones y con las tapas de aluminio.					
<b>Volumen muestras:</b>	80 mL					7. Suministre gas N <sub>2</sub> a la parte superior interna de las botellas.					
	(6 mL para muestra normal, 20 mL para SSVLM)					8. Coloque viales en base orbital, agregue solución de DQO, tome muestra al tiempo t = 0.					
<b>Volumen del reactor:</b>	2.5 L de lodo del reactor, viales serum de 80 mL					9. Tome las siguientes muestras siguiendo el plan de muestreo.					
						10. Después de la última muestra, mida las concentraciones de biomasa de los viales.					
						11. Verifique que el sistema ha sido apagado.					
<b>Plan de muestreo y recolección de muestras</b>											
Tiempo (min)	-20	0	15	30	60	90	120	180	240	300	360
Tiempo (h)	-0.33	0.00	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00	3.00	4.00	5.00	6.00
Muestra No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FASE ANAERÓBICA											
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	396 <sup>1</sup>	136	95	59	39	25	9	8	8	8	8
Sulfuro (mg L <sup>-1</sup> )		18	40	58	74	83	81	83	83	84	85
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )		195	176	153	137	124	107	102	96	96	91
SSLM & SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )											Ver Tabla
<sup>1</sup> Valores promedio de las concentraciones iniciales al inicio del ensayo.											
<b>Determinación de las concentraciones de SSLM &amp; SSVLM</b>											
Punto de muestreo	Muestra No.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	SSLM	SSVLM	Razón SSV/SS		
Fin del ensayo anaeróbico	1	0.08835	0.10741	0.08849	0.01906	0.01892	1,906	1,892	0.99		
	2	0.08835	0.10759	0.09018	0.01924	0.01742	1,924	1,742	0.91		
	3	0.08834	0.10683	0.08940	0.01849	0.01742	1,849	1,742	0.94		
						Promedio	1,893	1,792	0.95		
<b>Composición de la biomasa</b>											
Punto de muestreo	Final										
SSLM (mg L <sup>-1</sup> )	1,890										
SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )	1,747										
Razón SSVLM/SSLM	0.93										
Sólidos fijos (mg L <sup>-1</sup> )	142										
Nota:											
	Acetato (CH <sub>3</sub> COO)					30.03 mg C-mmol <sup>-1</sup>					
	Propionato (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COO)					24.69 mg C-mmol <sup>-1</sup>					
	Sulfuro (H <sub>2</sub> S)					34.08 mg S-mmol <sup>-1</sup>					
	Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )					96.06 mg S-mmol <sup>-1</sup>					



**Figura 2.3.9** Ejemplo de una gráfica que muestra la velocidad de reducción biológica del sulfato ( $q_{SRB,SO_4,An}$ ) en presencia de amonio (●), nitrato (●) o nitrito (●) como la fuente de nitrógeno en la alimentación, respectivamente.

Es también posible investigar la relación que existe entre la concentración de sulfuro y la velocidad real de reducción del sulfato. Por lo tanto, se calcula la media móvil a lo largo del perfil, para poder conocer la tasa de reducción de sulfato correspondiente a los diferentes niveles de sulfuro que se presentan en el reactor a diferentes tiempos. La media móvil de la tasa, a un determinado punto del perfil, es el promedio de tres velocidades calculadas alrededor del punto de interés. Estas velocidades se obtienen, una a la concentración de sulfuro a la que se quiere calcular la media móvil, y las dos otras se obtienen a una concentración menor y otra mayor alrededor del punto de interés. La Figura 2.3.10 ilustra la relación típica entre la velocidad de reducción de sulfato y la concentración de sulfuro, basada en el método cálculo de media móvil. Este tipo de gráfico puede prepararse también con respecto a las concentraciones de sulfato o DQO.



**Figura 2.3.10** Relación entre la velocidad de reducción de sulfato ( $q_{SRB,SO_4,An}$ ) y la concentración de sulfuro, calculada por el método de la media móvil.

### 2.3.10 Recomendaciones prácticas

Las tasas volumétricas de reducción de sulfato y las actividades de las SRB pueden estimarse mediante el desarrollo de ensayos bajo condiciones controladas en el laboratorio. La Figura 2.3.11 es un ejemplo de bioreactor de biomasa suspendida, equipado con accesorios adecuados para el seguimiento del pH y control de temperatura. Tales configuraciones en el reactor proveen una forma simple para recolectar las muestras en ambas fases, la líquida y la gaseosa. Si se lleva a efecto un ensayo aeróbico para comprobar la influencia del oxígeno sobre la actividad de las SRB, entonces deben llevarse a cabo las mismas pruebas con excepción del suministro de gas nitrógeno en la parte superior del reactor.

Si se desea un ensayo de toxicidad, entonces deben desarrollarse ensayos con agua residual sintética y añadir los parámetros de toxicidad al diseño experimental. El ensayo debe repetirse usando el mismo lodo expuesto al compuesto tóxico inoculado, para investigar la capacidad del lodo para recuperarse después un stress tóxico. Desde una perspectiva microbiana, si se desea determinar el desarrollo en el tiempo de la estructura de la comunidad de SRB dentro del lodo, pueden usarse herramientas de biología molecular como la Hibridación fluorescente *in situ* (FISH), y la Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) del ADN ribosómico 16S (rADN) amplificado por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (ver Capítulo 8).



**Figura 2.3.11** Toma de una muestra líquida para determinar la actividad de las bacterias sulfato reductoras (SRB). Nótese el color oscuro característico de la biomasa de SRB en el reactor. (Foto: KWR Watercycle Research Institute, 2014).

## 2.4 REMOCIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

### 2.4.1 Descripción del proceso

La necesidad de remover nitrógeno de las aguas residuales surge por el efecto tóxico potencial del amoníaco libre ( $\text{NH}_3$ ) sobre la vida acuática de los cuerpos receptores, su efecto sobre la demanda nitrogenada de oxígeno, y el papel que ejerce como nutriente, en la estimulación de la eutrofización, especialmente en ambientes marinos (Metcalf y Eddy, 2003). El nitrógeno está presente en las aguas residuales principalmente como nitrógeno orgánico y nitrógeno amoniacal. En este último caso aparece como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), y puede ser removido mediante diferentes procesos físico-químicos y biológicos. La mejor alternativa de remoción está basada en un análisis integral de costo-beneficio. En general, los métodos físico-químicos tales como la volatilización de amoníaco, la cloración hasta el punto de quiebre, y el intercambio iónico selectivo, se caracterizan por tener costos de operación más altos, considerados aceptables solamente cuando las concentraciones de amonio son mayores a  $5 \text{ g N L}^{-1}$  (Mulder, 2003). En aguas residuales que contienen menos de  $5 \text{ g N L}^{-1}$ , como ocurre en muchos efluentes industriales y en la mayoría de las aguas residuales municipales (donde las concentraciones típicas usualmente son menores a  $100 \text{ mg N L}^{-1}$ ), se prefieren los procesos biológicos de remoción de nitrógeno, debido a su menor costo de operación. Se pueden emplear diferentes procesos biológicos, y combinaciones de ellos, involucrando diferentes vías metabólicas de remoción de N. Las características de las aguas residuales, en términos de la relación DQO/N del afluente, proveen una guía para determinar el proceso biológico más apropiado para la remoción de nitrógeno.

Discutiblemente, pueden destacarse tres intervalos de relación DQO/N para el afluente:

- (i) Para altas relaciones de DQO/N en el afluente ( $> 20 \text{ g DQO g N}^{-1}$ ), la asimilación de nitrógeno por las bacterias heterótrofas (organismos heterótrofos ordinarios:  $X_{\text{OHO}}$ ) para la síntesis de biomasa durante la remoción de DQO (materia orgánica), usualmente es suficiente para disminuir y obtener la concentración de nitrógeno requerida en el efluente.
- (ii) Para relaciones DQO/N en el afluente comprendidas entre 5 y  $20 \text{ g DQO g N}^{-1}$ , puede

darse la combinación de asimilación de nitrógeno para el crecimiento de biomasa y la aplicación de procesos convencionales de nitrificación y desnitrificación heterótrofa.

- (iii) Para relaciones DQO/N con valores inferiores a  $5 \text{ g DQO g N}^{-1}$ , la nitrificación y desnitrificación heterótrofa convencional difícilmente pueden alcanzar niveles satisfactorios de remoción de nitrógeno. Particularmente el proceso de desnitrificación heterótrofa puede estar limitado por la carencia de materia orgánica, necesiándose ante esa situación, una fuente adicional de carbono externa. Entonces, procesos no-convencionales de remoción de nitrógeno, que tienen lugar por la vía llamada "ruta del nitrito", podrían ser más apropiados, debido al bajo (o nulo) requerimiento de DQO de estos procesos. Por esta razón para la remoción biológica de nitrógeno en aguas residuales, además de otras consideraciones técnicas y económicas, cuando la relación DQO/N es muy baja, es preferible emplear procesos tales como de nitrificación parcial-desnitrificación (también llamado del atajo o puente de nitrito) o nitrificación parcial-anammox. Debido a la relativamente baja velocidad de crecimiento de las bacterias anaerobias oxidantes, los procesos anammox (del inglés *anaerobic ammonium oxidation*) son aplicados principalmente en el tratamiento de aguas residuales cálidas ( $> 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), tales como el sobrenadante de los sistemas de digestión anaerobia de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales (PTARs).

En general, dependiendo de las características de las aguas residuales y de las condiciones locales, la remoción de nitrógeno de las aguas residuales puede realizarse con diferentes tecnologías o combinaciones de ellas. A pesar de la existencia de diferentes tecnologías y procesos de remoción de N, en prácticamente todos ellos, primero el amonio es oxidado (total o parcialmente) a nitrito (nitrificación) o a nitrato (nitrificación) y posteriormente la forma oxidada se reduce a gas ( $\text{N}_2$ ), que es liberado a la atmósfera vía desnitrificación (de nitrato a  $\text{N}_2$ ), desnitrificación (del nitrito al  $\text{N}_2$ ), o anammox (de nitrito y amonio a  $\text{N}_2$ ).

La eficiencia de remoción de nitrógeno en los procesos biológicos depende del adecuado balance entre las actividades de los diferentes grupos de microorganismos. En este sentido, el uso de pruebas batch de actividad para la evaluación y determinación

de las estequiometrias y tasas cinéticas de los procesos biológicos de conversión, constituye una herramienta muy útil para el seguimiento y control de los procesos de remoción de nitrógeno. Antes de describir detalladamente las metodologías y procedimientos de los ensayos en batch, se ha estimado oportuno exponer brevemente los principios de los procesos biológicos de nitrificación, desnitrificación, y de la oxidación anaerobia del amonio (anammox).

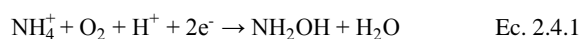
Para una comprensión más profunda de las diferentes configuraciones de los procesos, sus condiciones operacionales, los factores que afectan a cada uno de ellos y el metabolismo involucrado en el ciclo de remoción del nitrógeno, el lector puede referirse a otros libros de texto (Henze *et al.*, 2008; Grady *et al.*, 2011).

### 2.4.1.1 Nitrificación

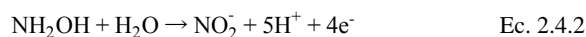
Nitrificación es la denominación dada a la producción de nitrato por Schløesing y Müntz (1877), quienes fueron los primeros en reconocer el carácter biológico del proceso. Una década posterior, Winogradsky (1890) aisló por primera vez una bacteria capaz de oxidar el amonio, demostrando que este grupo específico de bacterias era responsable de la nitrificación. El inmenso trabajo realizado por Winogradsky (1892) condujo al aislamiento de las *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter*, mostrando, en aquel entonces, que la producción de nitrato a partir de la oxidación del amonio era dividida en dos procesos microbiológicos diferentes, realizados por dos grupos filogenéticamente independientes de bacterias aerobias quimiolitautótrofas: organismos oxidantes del amonio ( $X_{AOO}$ ) produciendo nitrato, y organismos oxidantes del nitrato ( $X_{NOO}$ ) generando nitrato. La oxidación de amonio es mayormente realizada por bacterias quimiolitautótrofas amonio-oxidantes que emplean el amonio como fuente de energía y de nitrógeno, y al carbono inorgánico como fuente de carbono. Ha sido reportado que la oxidación del amonio también es realizada por ciertas arqueas ( $X_{AOA}$ , Könneke *et al.*, 2005) y por bacterias heterótrofas (van Niel *et al.*, 1993), demostrando que la diversidad de los organismos amonio-oxidantes es mucho mayor que la considerada inicialmente. Sin embargo, cabe resaltar que recientes desarrollos en técnicas de identificación y clasificación molecular han mostrado que bacterias del género *Nitrospirae* son capaces de desempeñar tanto la oxidación de amonio a nitrato como de nitrato a nitrato, proceso conocido como oxidación completa de amonio

(COMAMOX, por sus siglas en inglés *Complete Ammonium Oxidation*) (van Kessel *et al.*, 2015; Daims *et al.*, 2015). Sin embargo, debido al dominio de la ruta quimiolitautótrofa llevada a cabo por las  $X_{AOO}$  en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, este es el proceso de oxidación de amonio que se considera en este capítulo.

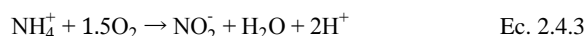
A escala de proceso microbiano, la oxidación del amonio a nitrato ocurre a través de la formación de hidroxilamina ( $NH_2OH$ ) como intermediario, vía la enzima amonio mono-oxigenasa (AMO):



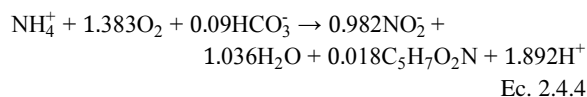
La hidroxilamina es posteriormente oxidada a nitrato por la enzima hidroxilamina-oxidoreductasa (HAO):



La combinación de los dos procesos redox es conocido como nitrificación:



Esta ecuación representa la reacción macro-química catabólica del proceso de nitrificación. Cuando también se considera el anabolismo, entonces la ecuación de la reacción macro-química metabólica general (considerando el catabolismo y anabolismo) es la siguiente:



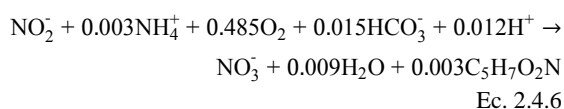
Como puede verse en la ecuación 2.4.4, se producen casi 2 moles de protones por cada mol de amonio oxidado. El sistema y relación entre los carbonatos y bicarbonatos, a través de la formación y volatilización de  $CO_2$ , es usualmente el buffer o amortiguador de pH disponible capaz de neutralizar la producción de protones. Cuando el carbonato no está disponible, o su contenido en el agua residual es insuficiente (por ejemplo, con una alcalinidad menor a  $100 \text{ mg L}^{-1} CaCO_3$  o  $2 \text{ meq L}^{-1}$  en agua residual municipal), entonces el pH puede caer a valores inferiores a 7.0 (Ekama and Wenzel, 2008). La capacidad buffer o tampón se mide generalmente como alcalinidad, en términos de miliequivalentes de carbonato de calcio por litro ( $\text{meq } CaCO_3 \text{ L}^{-1}$ ).



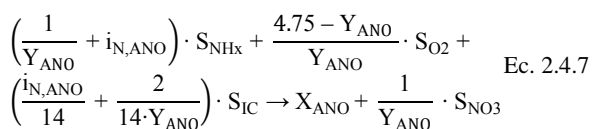
En la segunda etapa del proceso de nitrificación, también conocida como proceso de nitratación, el nitrito es oxidado por las bacterias  $X_{\text{NOO}}$  a nitrato, a través de la enzima nitrito oxido-reductasa (Nir):



Las bacterias  $X_{\text{NOO}}$  son quimiolito-autótrofas aerobias y usan para la síntesis carbono inorgánico ( $\text{HCO}_3^-$ ) y amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno, respectivamente. Cuando en la ecuación anterior se considera el crecimiento de biomasa, se obtiene la ecuación que expresa la reacción macro química metabólica representada por:



La combinación del proceso de nitrificación realizado por  $X_{\text{AOO}}$  y el de nitratación conducido por  $X_{\text{NOO}}$  conforman el proceso de nitrificación. La estequiometría de la nitrificación puede expresarse también de acuerdo a los modelos de lodo activado ASM (*Activated Sludge Model* por sus siglas en inglés) como:

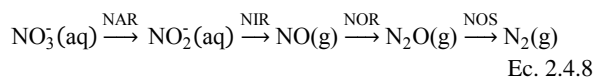


Donde,  $S_{\text{NO}_3}$  representa la concentración de nitrato ( $\text{mg N L}^{-1}$ ),  $S_{\text{IC}}$  representa la alcalinidad ( $\text{mmol L}^{-1}$ ),  $S_{\text{O}_2}$  es la concentración de OD ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ),  $S_{\text{NHx}}$  concentración de amonio ( $\text{mg N L}^{-1}$ ),  $X_{\text{ANO}}$  concentración de organismos nitrificantes ( $\text{mg DQO L}^{-1}$ ),  $Y_{\text{ANO}}$  es el rendimiento de crecimiento de los organismos nitrificantes ( $\text{g DQO g N}^{-1}$ ), y  $i_{\text{N,ANO}}$  es el contenido de nitrógeno en las células de los organismos nitrificantes ( $\text{g N g DQO}^{-1}$ ).

### 2.4.1.2 Desnitrificación

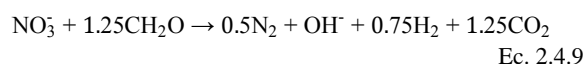
En los años 50s del siglo XIX, primero Reiset (1856) y luego Pasteur (1859) reportaron que la reducción del nitrato era de origen biológico; con lo anterior marcaron el inicio de las investigaciones relacionadas con el ciclo biológico del nitrógeno. Aunque Pasteur atribuyó erróneamente la reducción del nitrato a lo que llamó 'levadura láctica', él comprendió el papel de los

organismos. Reiset (1856) observó que durante la descomposición de los restos de animales y plantas se liberaba nitrógeno a la atmósfera. Poco tiempo después Gayon y Dupetit (1883) nombraron desnitrificación a ese proceso, en el que experimentalmente se probó que se necesitaba la presencia y consumo de materia orgánica para que ocurriera (Munro, 1886), y que el nitrito y los óxidos nítrico (NO) y nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) eran intermediarios (Payne, 1986). Se ha observado que no solo las bacterias, sino que también las eucariotas y arqueas, pueden crecer a partir de la energía de la oxidación de compuestos orgánicos o inorgánicos, acoplada con la reducción del nitrato a nitrito, a NO y a  $\text{N}_2\text{O}$ , con una generación final de gas  $\text{N}_2$  (Risgaard-Petersen *et al.*, 2006; Pina-Choa *et al.*, 2010). Se ha demostrado que ciertos microorganismos capaces de realizar nitrificación heterótrofa también pueden desnitrificar bajo condiciones anóxicas y aerobias. Estos últimos son conocidos como aeróbico-desnitrificantes (Robertson *et al.*, 1995). Como fue recientemente descubierto, la desnitrificación también puede ocurrir sin el intermediario  $\text{N}_2\text{O}$ , empleando metano como donante de electrones (Ettwig *et al.*, 2010). También se ha reportado la desnitrificación realizada por bacterias nitrificantes donde  $X_{\text{AOO}}$  reduce el nitrito a  $\text{N}_2\text{O}$  (Bock *et al.*, 1995). En contraste con otros microorganismos en el ciclo del nitrógeno (por ejemplo, los  $X_{\text{AOO}}$ ,  $X_{\text{NOO}}$ , anammox), diversos organismos heterótrofos ordinarios ( $X_{\text{OHO}}$ ) son desnitrificantes facultativos que preferiblemente emplean el oxígeno como aceptor de electrones debido a su elevado rendimiento energético, y que conmutan hacia la desnitrificación solo cuando prevalece una baja concentración de OD en presencia de nitrato o nitrito (Zumft, 1997). Independientemente del donante de electrones usado, la ruta bioquímica de la desnitrificación involucra las mismas enzimas en cada una de las etapas de reducción desde el nitrato hasta el gas di-nitrógeno ( $\text{N}_2$ ): nitrato reductasa (NAR), nitrito reductasa (NIR) óxido nítrico-reductasa (NOR) y óxido nitroso-reductasa (NOS):



Si los microorganismos desnitrificantes no disponen de todas las enzimas para completar la cadena de desnitrificación, o alternativamente no completan la cadena como consecuencia de ciertas condiciones ambientales, los intermediarios NO y  $\text{N}_2\text{O}$  pueden emitirse a la atmósfera, ambos teniendo un impacto negativo sobre el ambiente, como consecuencia de su

toxicidad y contribución, directa o indirecta, al efecto invernadero. En sistemas de tratamiento de aguas residuales, la remoción biológica de nitrógeno es realizada principalmente por  $X_{OHO}$  utilizando materia orgánica como donante de electrones. Cuando los compuestos orgánicos presentes de manera natural en las aguas residuales no son suficientes para la desnitrificación completa, suele utilizarse un donante externo (como el ácido acético o metanol, entre otros). Debido a su prevalencia en aplicaciones de aguas residuales, en este capítulo solamente se considera la desnitrificación catalizada por  $X_{OHO}$  (desnitrificación heterótrofa), que ocurre a través de la siguiente ruta catabólica (Mateju *et al.*, 1992):



Esta ecuación ilustra que la desnitrificación heterótrofa propicia el aumento de la alcalinidad debido a la producción de iones OH.

Los organismos heterótrofos ordinarios ( $X_{OHO}$ ) pueden utilizar tanto el nitrato como el nitrito como aceptor de electrones. El proceso de reducción del nitrato a gas nitrógeno es llamado desnitrificación, mientras que la reducción del nitrito se conoce como desnitrificación. De acuerdo a la notación en los modelos estándar de lodo activado (ASM), cuando se utiliza un sustrato soluble biodegradable ( $S_B$ ) como fuente de carbono, la estequiometría de la desnitrificación y desnitrificación puede describirse respectivamente:

$$\frac{1}{Y_{OHO, Ax}} \cdot S_B + \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{2.86 \cdot Y_{OHO, Ax}} \cdot S_{NO_3} + i_{N, OHO} \cdot S_{NH_x} \rightarrow X_{OHO} + \left( \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{2.86 \cdot 14 \cdot Y_{OHO, Ax}} - \frac{i_{N, OHO}}{14} \right) \cdot S_{IC} + \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{2.86 \cdot Y_{OHO, Ax}} \cdot S_{N_2} \quad \text{Ec. 2.4.10}$$

$$\frac{1}{Y_{OHO, Ax}} \cdot S_B + \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{1.71 \cdot Y_{OHO, Ax}} \cdot S_{NO_2} + i_{N, OHO} \cdot S_{NH_x} \rightarrow X_{OHO} + \left( \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{1.71 \cdot 14 \cdot Y_{OHO, Ax}} - \frac{i_{N, OHO}}{14} \right) \cdot S_{IC} + \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{1.71 \cdot Y_{OHO, Ax}} \cdot S_{N_2} \quad \text{Ec. 2.4.11}$$

Donde,  $Y_{OHO, Ax}$  es el rendimiento de crecimiento heterótrofo bajo condiciones anóxicas (g DQO g DQO<sup>-1</sup>),  $X_{OHO}$  es la concentración de microorganismos heterótrofos (mg DQO L<sup>-1</sup>),  $S_{NH_x}$  es la concentración de amonio (mg N L<sup>-1</sup>),  $S_{NO_2}$  la concentración de nitrito (mg N L<sup>-1</sup>),  $S_{NO_3}$  la

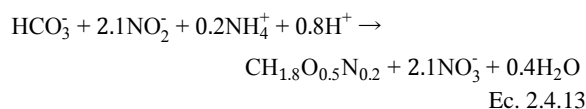
concentración de nitrato (mg N L<sup>-1</sup>),  $S_{N_2}$  la concentración de gas di-nitrógeno disuelto (mg N L<sup>-1</sup>), y  $S_{IC}$  es la alcalinidad (mmol L<sup>-1</sup>).

### 2.4.1.3 Oxidación anaerobia del amonio (anammox)

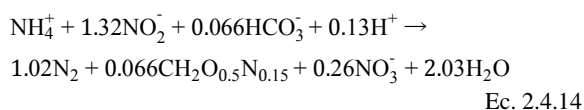
El proceso anammox puede ser considerado como un tipo peculiar de desnitrificación en el que la oxidación del amonio ocurre simultáneamente con la reducción de nitrito. Su descubrimiento en los 1990s produjo un cambio radical en la comprensión del ciclo biológico del nitrógeno (Kuypers *et al.*, 2005), refutando la suposición aceptada hasta ese momento de que el amonio era químicamente inerte en condiciones anaerobias y que su oxidación requería de oxígeno y una mezcla funcional de enzima oxigenasa (van de Graaf *et al.*, 1996). Las bacterias anammox pertenecen al género *Planctomycetes* y han sido encontradas en muchas plantas de tratamiento de aguas residuales y en el medio natural en todo el planeta, mostrando su omnipresente distribución. El amonio, nitrito y el bicarbonato son los principales sustratos en el proceso anammox (van de Graaf *et al.*, 1996). La reacción catalizada por las bacterias anammox conjunta los átomos de N del nitrito y del amonio para formar di-nitrógeno gas (N<sub>2</sub>):



En ambientes libres de oxígeno, las bacterias anammox activan la molécula estable del amonio a través del poder oxidante del óxido nítrico (NO). En una breve descripción, la oxidación del amonio es un proceso en tres pasos con NO e hidrazina como intermediarios: primero, el nitrito se reduce a NO por la enzima nitrito oxido-reductasa (Nir), entonces el NO producido reacciona con el amonio para producir hidracina (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), siendo catalizada por la única enzima hidracina-sintasa (HZS), y finalmente la hidracina es oxidada a N<sub>2</sub> por la enzima hidracina dehidrogenasa (HDH) (Kartal *et al.*, 2011). La bacteria anammox es autótrofa y por lo tanto utiliza carbono inorgánico como fuente de carbono para la producción de biomasa. En las reacciones anabólicas los equivalentes reductores para la reducción del carbono inorgánico se originan de la oxidación del nitrito a nitrato como se muestra en la siguiente ecuación (el amonio es considerado como la fuente de nitrógeno para la síntesis celular):



Las ecuaciones de las macro reacciones metabólicas del proceso anammox todavía están sujetas a debate. Debido a las dificultades para alcanzar un cultivo puro de bacterias anammox, las ecuaciones estequiométricas derivadas de la relación sustrato/producto vía balance de masas no son intrínsecamente del todo precisas (Lotti *et al.*, 2014). Sin embargo, la primera reacción estequiométrica reportada por Strous y co-autores (1998) es utilizada extensamente para los propósitos de diseño y operación:



Como el amonio es una de las principales formas en que se encuentra el nitrógeno en las aguas residuales, y que el metabolismo anammox demanda tanto amonio como nitrito como sustratos, este proceso debe combinarse con otro para generar la fuente requerida de nitrito. Con este propósito, el proceso de nitrificación parcial (NP) se aplica usualmente. Las tecnologías de remoción de nitrógeno basadas en combinaciones de la NP y del proceso anammox son actualmente parte del estado del arte, con alrededor de 100 aplicaciones a escala real en el mundo, que tratan mayoritariamente efluentes de digestores anaerobios, así como una variedad de aguas residuales municipales e industriales ricas en amonio que incluyen (entre otras): curtidurías de pieles, procesamiento de alimentos, semiconductores, fermentación, producción de levadura, destilería y la industria del vino (Lackner *et al.*, 2014). Además, se han reportado resultados alentadores en instalaciones de plantas piloto que tratan el efluente de digestores de aguas negras (de Graaff *et al.*, 2011), estiércol digerido (Villegas *et al.*, 2011), orina (Udert *et al.*, 2008) y aguas residuales de la industria farmacéutica (Tang *et al.*, 2011). Recientemente, también se han obtenido resultados positivos en aguas residuales municipales aeróbicamente pre-tratadas, abriendo nuevas perspectivas para convertir las PTARs municipales de ser energéticas-dependientes a constituirse en sistemas generadores de energía (Lotti *et al.*, 2015a).

## 2.4.2 Alternativas para el seguimiento de los procesos

Con base en la estequiometría de los procesos de remoción de nitrógeno (sección 2.4.1), existen varias alternativas disponibles para evaluar los parámetros

cinéticos y estequiométricos de interés durante los ensayos en batch, tales como:

- Determinaciones químicas para el seguimiento de la variación de las concentraciones de nitrito, nitrato o amonio en el tiempo. La selección de las especies químicas que deben determinarse depende del proceso específico de interés.
- Seguimiento por titulación aplicando la técnica pH-estática a aquellos procesos que afectan el pH de manera significativa.
- Seguimiento manométrico, aplicable a procesos que involucran especies gaseosas de baja solubilidad, como el  $\text{N}_2$ .
- Respirometría, aplicable a procesos biológicos aerobios que afectan la concentración de OD.

La última alternativa no es presentada en este capítulo, sino en el Capítulo 3 de Respirometría, que es totalmente dedicado a esta técnica. Las otras alternativas de seguimiento se exponen brevemente a continuación.

### 2.4.2.1 Monitoreo químico

La determinación analítica de las concentraciones de sustratos y productos en el tiempo es la vía más común para valorar la cinética de un proceso.

Cuando se pretende monitorear la nitrificación, se determinan las concentraciones de amonio y nitrato en el tiempo. Para poder evaluar las tasas cinéticas de nitrificación y nitratación separadamente, debe medirse la variación en el tiempo de las concentraciones de amonio y nitrito, o nitrito y nitrato. Finalmente, cuando van a determinarse ambas velocidades (nitrificación y nitratación) simultáneamente, es necesario medir las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato en el tiempo.

Para la desnitrificación, el ensayo en batch más común en el que se aplica el monitoreo químico es el de la llamada prueba de velocidad de consumo de nitrato (o NUR, del inglés *Nitrate-nitrogen Uptake Rate*). Las pruebas de NUR hacen posible evaluar varios parámetros de interés práctico, tales como la velocidad de consumo de nitrato, la tasa cinética de utilización de compuestos orgánicos durante la desnitrificación, y el coeficiente de rendimiento anóxico de la biomasa (Naidoo *et al.*, 1998; Kujawa y Klapwijk, 1999). Como se describe en la Sección 2.2.4, las muestras se colectan durante el curso del ensayo en batch y entonces, se realiza el análisis químico de los principales sustratos

(nitrito, nitrato y DQO) para la obtención de suficiente información que permita evaluar los parámetros cinéticos y estequiométricos relevantes.

Finalmente, cuando este método es aplicado para la evaluación cinética de los procesos anammox, deben determinarse en el tiempo las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato. Además de la tasa cinética del proceso anammox, este método también hace posible determinar los parámetros estequiométricos de interés, tales como las relaciones entre nitrito producido y amonio consumido ( $\text{NO}_2/\text{NH}_4$ ) y entre nitrato producido y amonio consumido ( $\text{NO}_3/\text{NH}_4$ ), que pueden ser consideradas como los cocientes entre las correspondientes tasas de conversión (Lotti *et al.*, 2014).

### 2.4.2.2 Monitoreo por titulación

La técnica de titulación a un pH estático (o titulación “pH-estática”) consiste en controlar la adición de una solución adecuadamente diluida de ácido o base para mantener constante el valor del pH en un sistema biológico donde el pH es afectado por diferentes reacciones. Bajo estas condiciones, la velocidad de consumo de la solución titulante es proporcional a la tasa cinética de la reacción, vía un factor que depende de la estequiometría. En principio esta técnica es aplicable a cualquier proceso biológico o reacción química que afecta la concentración de protones (entonces ligada al pH). Esto es, cualquier reacción que transforme los sustratos neutros en productos ácidos o básicos, o los sustratos ácidos o básicos en productos neutros. Hay muchas reacciones biológicas de interés ambiental que afectan el pH de la suspensión en la que se encuentran. La titulación “pH-estática” se ha enfocado principalmente a la nitrificación (Gerney *et al.*, 1997, 1998; Massone *et al.*, 1998) y a la desnitrificación (Massone *et al.*, 1996; Rozzi *et al.*, 1997; Bogaert *et al.*, 1997; Foxon *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque estas son las dos aplicaciones más consolidadas de la técnica de titulación a pH estático, podrían esperarse otras en el futuro, como en aquellas reacciones que involucran el equilibrio  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ , por ejemplo, durante la degradación heterótrofa de sustratos orgánicos que produce  $\text{CO}_2$  (Ficara y Rozzi, 2004) y la metanogénesis acetoclástica que produce bicarbonatos (Rozzi *et al.*, 2002).

El seguimiento de la nitrificación es la primera y más consolidada aplicación de esta técnica, ya que la relación entre el amonio oxidado y el protón producido  $Y_{\text{NH}_4, \text{H}^+}$  puede calcularse a partir de la

ecuación estequiométrica, tal como se asume en el modelo ASM1 (Henze *et al.*, 2000):

$$Y_{\text{NH}_4, \text{H}^+} = \frac{14}{2 + i_{\text{N,ANO}} \cdot Y_{\text{ANO}}} \approx 6.92 \text{ g N mol}^{-1} \text{ de protones}$$

Ec. 2.4.15

La relación N/H es por tanto el factor de conversión estequiométrico que permite calcular la velocidad de consumo de amonio a partir de la velocidad de consumo del agente de titulación. La técnica de titulación pH-estática también puede aplicarse para la desnitrificación, ya que ese proceso es una reacción que afecta el pH. Sin embargo, la evaluación de la relación entre el consumo de nitrito o nitrato y la producción del protón  $Y_{\text{NO}_x, \text{H}^+}$ , basada en la estequiometría, no es tan directa como lo es para la nitrificación. Eso último debido a que la desnitrificación depende de diversos factores, tales como la fuente de carbono, las características del lodo, y el valor establecido para el pH. Para el cálculo teórico de  $Y_{\text{NO}_x, \text{H}^+}$ , Petersen *et al.* (2002) han propuesto un modelo que considera que durante la desnitrificación los cuatro procesos siguientes tienen una producción de protones dependiente del pH: (i) consumo de ácidos orgánicos débiles como fuente de carbono, (ii) consumo de nitrato, (iii) consumo de amonio para síntesis celular, y (iv) producción de dióxido de carbono por la oxidación del carbono orgánico. Basados en esas suposiciones, las siguientes ecuaciones estequiométricas han sido propuestas para evaluar la relación entre la producción neta de protones y el consumo de nitrato o nitrito:

$$\frac{1}{Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_B + \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{\beta \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_{\text{NO}_x} + i_{\text{N, OHO}} \cdot S_{\text{NH}_x} \rightarrow X_{\text{OHO}} + \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{\beta \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \cdot S_{\text{N}_2} + \left[ -\frac{a}{C \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} - \frac{1 - Y_{\text{OHO, Ax}}}{\beta \cdot 14 \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} + \frac{b \cdot i_{\text{N, OHO}}}{14} + \frac{C \cdot (1 - Y_{\text{OHO, Ax}}) \cdot x}{C \cdot Y_{\text{OHO, Ax}}} \right] \cdot \text{H}^+$$

Ec. 2.4.16

Donde,  $S_{\text{NO}_x}$  es la concentración de nitrito o nitrato;  $x$  es el número de moles de carbono por cada mol de sustrato orgánico;  $C$  es un factor (en g DQO  $\text{mol}^{-1}$  sustrato orgánico) para expresar el carbono orgánico en unidades de DQO;  $\beta$  es el equivalente de oxígeno del nitrógeno oxidado;  $a$ ,  $b$ ,  $c$  son factores dependientes del pH que tienen en cuenta el equilibrio de disociación de los ácidos/bases débiles ( $a$ , para ácidos orgánicos - HA,  $b$ , para ácido carbónico y  $c$ , para el amonio):

$$a = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]} = \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pH} + 10^{-pK_a}} \quad \text{Ec. 2.4.17}$$

$$b = \frac{10^{pH-pK_1} \cdot (1 + 2 \cdot 10^{pH-pK_2})}{1 + 10^{pH-pK_1} \cdot (1 + 10^{pH-pK_2})} \quad \text{Ec. 2.4.18}$$

$$c = \frac{[NH_4^+]}{[NH_4^+] + [NH_3]} = \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pK_{NH_4}}} \quad \text{Ec. 2.4.19}$$

Donde,  $pK_a$  es la constante de disociación del ácido acético (4.75 a 25 °C),  $pK_1$  la constante de disociación del ácido carbónico (6.352 a 25 °C),  $pK_2$  la constante de disociación del bicarbonato (10.33 a 25 °C), y  $pK_{NH_4}$  la constante de disociación para el amonio (9.25 a 25 °C).

Sustituyendo con el valor correcto de  $\beta$  (es decir 2.86 g DQO gN<sup>-1</sup> para N-NO<sub>3</sub> y 1.72 g DQO gN<sup>-1</sup> para N-NO<sub>2</sub>), resulta que  $Y_{NOx_{H+}}$ , en g N mol<sup>-1</sup>, en presencia de nitrato,  $Y_{NO_3_{H+}}$ , o nitrito,  $Y_{NO_2_{H+}}$ , como aceptor de electrones, puede expresarse como :

$$Y_{NO_3_{H+}} = \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{2.86 \cdot Y_{OHO, Ax}} \cdot \left[ \frac{a}{C \cdot Y_{OHO, Ax}} - \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{2.86 \cdot 14 \cdot Y_{OHO, Ax}} + \frac{c \cdot i_{N, OHO}}{14} + \frac{b \cdot (1 - Y_{OHO, Ax}) \cdot x^{-1}}{C \cdot Y_{OHO, Ax}} \right]^{-1} \quad \text{Ec. 2.4.20}$$

$$Y_{NO_2_{H+}} = \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{1.72 \cdot Y_{OHO, Ax}} \cdot \left[ \frac{a}{C \cdot Y_{OHO, Ax}} - \frac{1 - Y_{OHO, Ax}}{1.72 \cdot 14 \cdot Y_{OHO, Ax}} + \frac{c \cdot i_{N, OHO}}{14} + \frac{b \cdot (1 - Y_{OHO, Ax}) \cdot x^{-1}}{C \cdot Y_{OHO, Ax}} \right]^{-1} \quad \text{Ec. 2.4.21}$$

Estas ecuaciones muestran que para evaluar de  $Y_{NOx_{H+}}$  se hace necesario conocer la composición química de la fuente de carbono (C y x, lo que es raro en aplicaciones prácticas), y el coeficiente de crecimiento anóxico de biomasa,  $Y_{OHO, Ax}$ . Como tal, su evaluación teórica es posible, pero difícil de llevar a cabo.

Afortunadamente,  $Y_{NOx_{H+}}$  puede ser evaluado experimentalmente midiendo la cantidad de la solución de titulación (normalmente ácido) que se emplea en la neutralización, durante el proceso de desnitrificación de una cantidad conocida de nitrato o nitrito, bajo condiciones de pH estático y en presencia de la fuente de carbono de interés. Una vez que la relación  $Y_{NOx_{H+}}$  es medida, la velocidad de titulación puede fácilmente

ser convertida a velocidad de consumo de nitrato o nitrito.

Teóricamente, también el proceso de anammox puede ser monitoreado por el método de titulación pH-estática. Sin embargo, hay poca experiencia en esa práctica y por tanto esta alternativa no se trata en este capítulo.

### 2.4.2.3 Monitoreo manométrico

De acuerdo a esta técnica, la velocidad de un bioproceso que produce un componente gaseoso poco soluble es proporcional a la velocidad de aumento de la presión, siempre cuando la bio-reacción tenga lugar en un reactor hermético a los gases. La relación que existe entre la sobrepresión generada,  $P(t)$ , y el volumen estandarizado de gas producido,  $V_G(t)$ , puede obtenerse asumiendo que la rapidez de transferencia de gas del líquido a la fase gaseosa no es un paso limitante (agitar el lodo durante el ensayo permite una transferencia rápida de las especies gaseosas) y que la masa de gas que queda en la solución puede considerarse no significativa. Bajo estas condiciones supuestas, y a temperatura constante, puede aplicarse la siguiente relación (de acuerdo con la ley de los gases):

$$V_G(t) = \frac{P(t) - P_{atm}}{P_{atm}} \cdot V_{HS} \quad \text{Eq. 2.4.22}$$

Donde,  $V_{HS}$  es el volumen del espacio libre sobre el líquido en el reactor y  $P_{atm}$  es la presión atmosférica.

Este principio de medición es aplicable y ventajoso en el seguimiento de la desnitrificación (Sánchez *et al.*, 2000; Ficara *et al.*, 2009) y de la oxidación anaerobia del amonio (Dapena Mora *et al.*, 2007; Scaglione *et al.*, 2009; Bettazzi *et al.*, 2010; Lotti *et al.*, 2012), ya que en ambos procesos se produce gas nitrógeno. Para la desnitrificación puede emplearse un absorbente de CO<sub>2</sub>, típicamente localizado en el volumen libre del reactor (por ejemplo, usando perlas de NaOH), de manera tal que la sobrepresión esté asociada solamente a la liberación de N<sub>2</sub>.

## 2.4.3 Montaje experimental

### 2.4.3.1 Reactores

Independientemente de la tecnología aplicada para remover nitrógeno de las aguas residuales, los ensayos



de actividad en batch pueden realizarse bajo condiciones aerobias (nitrificación) o anóxicas (desnitrificación y anammox), dependiendo de los parámetros de interés y la naturaleza del estudio. En cualquier caso, el reactor o reactores utilizados deben tener los medios para (i) evitar la entrada de oxígeno bajo condiciones anóxicas, (ii) asegurar satisfactoriamente la disponibilidad de  $S_{O_2}$  bajo condiciones aerobias ( $S_{O_2}$  mayor que  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), (iii) proporcionar buenas condiciones de agitación, (iv) mantener la temperatura deseada, (v) proveer un control adecuado del pH, y (vi) tener puertos adicionales para la colección de muestras, la adición de la solución de afluente, gases, y cualquier otro medio líquido o sustrato empleado en el ensayo. Para los requerimientos necesarios para alcanzar las condiciones apropiadas anóxicas, o aerobias, de mezcla, control de temperatura y del pH, y puertos de dosificación y muestreo durante el ensayo, puede consultarse la Sección 2.2.2.1. Sin embargo, cuando el seguimiento de los experimentos se realiza por métodos de titulación o manométrico, se necesitarán aparatos especiales como los descritos más adelante.

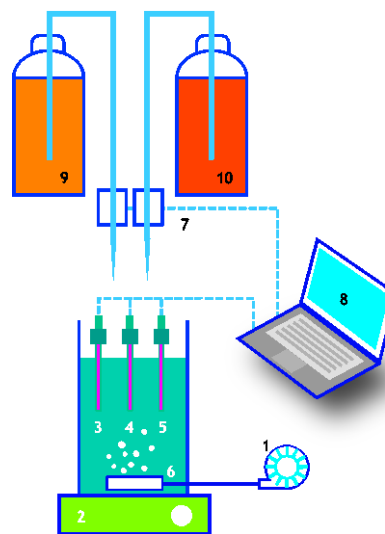
### 2.4.3.2 Instrumentación para ensayos de titulación

Para realizar estos ensayos, se necesita una unidad de titulación automática. También disponible comercialmente. Sin embargo, ellas pueden ser implementadas empleando equipamiento convencional de laboratorio y sistemas básicos de adquisición de datos y control. Específicamente, un montaje para llevar a cabo la titulación automática comprende los siguientes componentes (Figura 2.4.1):

- Vasija o recipiente de reacción: un reactor completamente mezclado para recibir la muestra de lodo activado, con termostato o control de temperatura y con un volumen operativo de 0.5 a 1.5 L. El recipiente de reacción no tiene que ser de un tipo hermético a gases cuando se trata de realizar pruebas de nitrificación. Sin embargo, se prefiere que el área de contacto superficial gas-líquido sea pequeña para limitar la transferencia gas-líquido de oxígeno y dióxido de carbono. Cuando se realicen ensayos anóxicos para desnitrificar o para ensayos anammox, si se necesita utilizar un reactor hermético.
- Sensores para evaluar: temperatura (con una resolución de  $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), pH (con una resolución de 0.01 unidades de pH) y, posiblemente, OD ( $\pm 0.02$

$\text{mg L}^{-1}$  alrededor de la concentración seleccionada de operación).

- Un sistema de aireación (para procesos aerobios), típicamente con una capacidad de aireación de 50-200 L de gas por L de reactor y por hora, y un difusor para aireación con burbuja fina.
- Un sistema automático de titulación, capaz de mantener el pH dentro de un intervalo de variación pequeño (es decir a  $\pm 0.02$  del valor puntual de pH fijado para la operación) y con un registro del volumen de la solución de titulación dosificada en el tiempo, con una resolución de 0.1 mL y una frecuencia mínima de adquisición de datos de 1 lectura por minuto. También puede llevarse un registro manual de la cantidad de solución para titulación añadida, manteniendo la misma en una probeta graduada y leyendo el volumen remanente a intervalos regulares (cada pocos minutos para los ensayos de nitrificación) o instalando la solución sobre una balanza, leyendo el peso directamente o de manera automatizada. Como solución alcalina puede utilizarse NaOH 0.05-0.02 N, y como solución ácida 0.05-0.02 N de HCl.



**Figura 2.4.1** Esquema de un sistema de titulación de pH-estático: 1. aireador; 2. mezclador; 3. sensor de temperatura; 4. electrodo de pH; 5. sonda de OD; 6. recipiente de reacción; 7. sistema de dosificación de la solución para titulación; 8. sistema de adquisición de datos y control; 9. solución para titulación alcalina; 10. solución para titulación ácida.

Cuando los bioprocesos involucrados son aerobios, el sistema de pH estático puede ser sustituido con un sistema pH/OD-estático combinado, en el que una unidad de titulación secundaria suministra una solución diluida de  $H_2O_2$  que sirve como solución para titulación

oxigenada. Para este propósito, el sistema descrito en la Figura 2.4.1 requiere más instrumentos y accesorios, pudiendo mejorarse integrándole:

- Un electrodo de OD con una resolución mínima de  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ .
- Un dosificador automatizado adicional o sistema de titulación capaz de mantener la  $S_{O_2}$  en un intervalo estrecho ( $\pm 0.1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  alrededor del punto fijo predeterminado). Una solución  $0.05\text{-}0.2 \text{ M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es apropiada cuando se realizan ensayos de titulación pH/OD-estática combinada en muestras de lodo activado convencional. Cuando se dosifica, la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se transforma en oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y agua, mediante la peroxidasa producida por las bacterias aerobias para contrarrestar el estrés oxidativo, y así posibilitar que el oxígeno esté disponible para la respiración bacteriana. Como un hecho relevante, se ha observado que las soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden utilizarse en pruebas respirométricas de corta duración sin que exista una inhibición significativa en las bacterias (Ficara *et al.*, 2000).

El propósito de la titulación OD-estática es mantener la concentración de OD a una concentración constante seleccionada, mediante la dosificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , alcanzando así los siguientes objetivos:

- Mantener la condición redox deseada sin necesidad de suministrar aire. Esto hace posible evitar la volatilización de  $\text{CO}_2$  el cual tiende a afectar el pH del proceso, interfiriendo con otras reacciones determinadas sensibles al pH.
- Evaluar la velocidad de consumo de oxígeno de la reacción que, bajo condiciones estáticas de OD, es igual a la velocidad de titulación de la solución oxigenada. Esta información adicional puede servir como complementaria y también para comprobar la velocidad de titulación de la solución alcalina/ácida, tal como se describe más adelante en este capítulo.

### 2.4.3.3 Instrumentación para ensayos manométricos

Los ensayos pueden realizarse empleando recipientes herméticos, a prueba de fugas de gases. Frecuentemente se emplean los sistemas que se aplican en la determinación de la DBO (ver Figura 2.4.2).



**Figura 2.4.2** Aparato comercialmente disponible para realizar ensayos manométricos para propósitos de desnitrificación (foto: Lotti, 2016).

Los requerimientos mínimos del equipo son los siguientes:

- Una botella de vidrio:
  - a. Volumen efectivo de aproximadamente 1 L.
  - b. Dos aberturas laterales selladas con septo de goma y tapón roscado en plástico o aluminio, para la inyección de sustratos y la descarga de gases o el suministro de  $\text{N}_2$ .
  - c. Un soporte de perlas o granos de  $\text{NaOH}$ , montado en el espacio vacío superior al líquido, como trampa de  $\text{CO}_2$ .
  - d. Un dispositivo para la medición de la presión manométrica, fijado en la parte superior de la botella de vidrio y pudiendo tener un sistema de registro de datos con una resolución de 1-3 mbar.
- Una incubadora de temperatura constante con una oscilación de  $\pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Es imprescindible un buen control de la temperatura durante el transcurso del ensayo, ya que sus variaciones causan cambios en los valores de sobrepresión no asociados a la liberación de gases, y puede producir interferencias en los resultados.
- Un agitador magnético que pueda trabajar a 100-200 rpm. Alternativamente puede emplearse una base o plataforma orbital termostática para asegurar tanto el control de la temperatura como del mezclado. En el caso de los ensayos de anammox, se recomienda utilizar el agitador magnético solamente cuando se

trata de biomasa en suspensión (100-200 rpm). Mientras que, para los procesos anammox híbridos, ya sean de biopelícula adherida a medio flotante o biomasa auto-granulada (Hu *et al.*, 2013), es preferible el sistema orbital para evitar el deterioro de las biopelículas debido al esfuerzo cortante producido por el agitador magnético.

#### 2.4.3.4 Recolección de la muestra de lodo activado

El tiempo y momento de muestreo en un lodo activado realizando nitrificación y desnitrificación dependen del tipo de ensayo de actividad en batch a ejecutar. La remoción de nitrógeno vía nitrificación-desnitrificación está basada en la alternancia de condiciones aerobias y anóxicas. Entonces, es preferible tomar la muestra al final de la etapa del proceso que se está evaluando: aerobio para nitrificación, anóxico para desnitrificación. Evidentemente, el lugar de la toma de muestra dependerá de la configuración del sistema. Por ejemplo, el tiempo y momento de toma de una muestra de lodo activado en un sistema NP/anammox (nitrificación parcial/anammox) depende del tipo de tecnología utilizada. Obviamente, cuando los procesos de NP y anammox están divididos en dos etapas separadas, la biomasa anammox debe ser muestreada en la etapa anammox. En plantas a escala real y piloto de tratamiento de aguas residuales, las fronteras físicas de las etapas deben estar bien identificadas con anterioridad a la toma de muestras. En casos extremos, en los que las fases no están bien definidas (físicamente), los límites o fronteras redox necesitan ser determinadas, utilizando medidores de OD, de potencial redox y/o por determinación de las concentraciones de nitrato y nitrito. En sistemas a escala de laboratorio (usualmente operada secuencialmente en el tiempo), la toma o recolección de muestras puede ser relativamente más sencilla, ya que el tiempo de reacción define la duración de cada etapa en el ciclo de operación. Para la obtención de muestras homogéneas y representativas, el lodo debe recolectarse en lugares donde existen buenas condiciones de mezcla.

Cuando el proceso de interés es el anammox, en general, el muestreo a la salida del reactor es el adecuado. Ese punto de toma de muestras asegura que en el lodo recolectado las concentraciones residuales de amonio/nitrito sean bajas. Cuando se trata de un proceso anammox con biomasa granular, la salida del reactor normalmente contiene muy pocos gránulos, debido a que los sistemas granulares usualmente está equipados con un sistema de retención de biomasa (por ejemplo:

separador de tres fases, hidrociclón, fase de sedimentación en el ciclo de un reactor biológico secuencial (RBS), etc.). En sistemas anammox granulares operados como Reactores de Flujo Continuo en Tanques Agitados (RFCTA, o CSTR comúnmente por sus siglas en inglés, *Completely Stirred Tank Reactor*), es adecuado muestrear el licor mixto directamente en el tanque agitado. Por otra parte, para los RBS, la muestra debe tomarse justo antes de la fase de sedimentación, cuando el reactor está completamente mezclado, para asegurar que exista una buena mezcla y hayan cantidades bajas de amonio y nitrito residuales.

Idealmente, los ensayos de actividad en batch deben realizarse tan pronto como sea posible después de la recolección de la muestra. En sistemas a escala de laboratorio, en principio, esto no debe ser un problema, sobre todo cuando el ensayo se realiza en el mismo laboratorio y de forma coordinada y sincronizada con la operación del reactor maduro o de cultivo. De igual manera, en plantas a escala real y piloto los ensayos de actividad batch pueden realizarse *in situ* poco tiempo después de recolectar la muestra en el laboratorio de la planta de aguas residuales (si se dispone de las condiciones para ello). Si el ensayo no puede realizarse *in situ* el mismo día, la muestra de licor mixto debe transferirse inmediatamente al lugar donde se realizará el ensayo de actividad. Durante su transportación y almacenamiento, el lodo debe ser preservado adecuadamente en una nevera o refrigerador (a una temperatura baja y de preferencia a 4 °C) sin aireación. En este caso el ensayo de actividad debe realizarse dentro de las 24 h posteriores a la toma de la muestra. Para evitar que se creen condiciones anaerobias durante el almacenamiento y la producción indeseable de sulfuro (que posee carácter tóxico) por reducción de los sulfatos, puede añadirse nitrato al licor mezclado hasta obtener una concentración final de 50-200 mg N L<sup>-1</sup>. Sin embargo, la disponibilidad de nitrato puede promover la respiración endógena de la biomasa, por lo que debe insistirse en la recomendación de realizar el ensayo de actividad lo antes posible después de recolectar la muestra.

Especialmente después del almacenamiento y antes de la realización del ensayo de actividad en batch, la biomasa presente en el licor mezclado necesita ser “lavada” para eliminar cualquier exceso del nitrato añadido, y ser “reactivada” y adaptada al pH y temperatura de interés. La etapa de lavado debe realizarse con un “medio de lavado” apropiado, con una composición mineral que depende de la población microbiana de interés. El agua del grifo también puede

usarse como “medio de lavado” en la medida que tenga una conductividad similar a la del medio de cultivo. En cualquier caso es preferible la ejecución del ensayo de actividad *in situ*, ya que se evita la exposición de la biomasa a condiciones diferentes a las que se encontraba. El volumen total de lodo activado (licor mezclado) que debe recolectarse depende del tamaño de los reactores batch, del número de ensayos batch a realizar y del número de muestras que serán tomadas durante la realización de cada ensayo de actividad. Para una planta completa, suele ser suficiente extraer una muestra de lodo de 10-20 L de licor mezclado. Por otra parte, muestras recolectadas de reactores a escala de laboratorio, casi nunca pueden ser mayores de 1 L, porque el volumen del reactor en estos casos es en general pequeño (0.5-2.2 L típicamente, o hasta 8-10 L a veces) y el máximo volumen de la muestra que se puede extraer casi siempre está determinada por el lodo en exceso que es purgado del sistema a cada día. Como el máximo volumen que puede ser extraído del reactor de laboratorio está directamente relacionado con la edad del lodo (TRS) con la que es operado, que a su vez está definida por la velocidad de crecimiento de los microorganismos, debe prestarse particular atención cuando se trabaja con microorganismos que tienen una baja velocidad de crecimiento, tales como las bacterias nitrificantes y las anammox.

En la Sección 2.2.3 se han descrito diversas sugerencias para el muestreo y los tiempos adecuados de almacenamiento, mismas que deben ser tomadas en consideración.

#### 2.4.3.5 Preparación de la muestra de lodo activado

En general, las muestras de lodo activado pueden utilizarse tal como se obtienen, o después de ajustar el pH (con o sin la presencia de una solución tampón), de temperatura, concentración de amonio/nitrito/nitrato, concentración de la fuente de carbono y de los sólidos suspendidos volátiles ( $X_{SSV}$ ). Para muestras de lodo activado convencional procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, es ideal una muestra que contenga una concentración  $X_{SSV}$  de aproximadamente 2-4 g SSV L<sup>-1</sup>. Para lodos anammox será preferible una  $X_{SSV}$  de alrededor de 5-10 g L<sup>-1</sup>. Para muestras de lodo muy diluidas o muy concentradas puede introducirse una etapa de pre-concentración en los procedimientos (por sedimentación en un cono Imhoff durante 30 min o mediante centrifugación a 4000 rpm por unos minutos), o de dilución con efluente secundario de la misma planta de tratamiento de agua

residual. Esto evitará que las velocidades de conversión sean muy altas o muy bajas durante las pruebas batch.

Cuando se implementan tales procedimientos en muestras anóxicas o anaerobias de lodo activado, debe dosificarse N<sub>2</sub> gas con el objetivo de restablecer las condiciones anóxicas-anaerobias adecuadas. Cuando se trata de un proceso anammox, en vez de N<sub>2</sub>, se puede dosificar una mezcla de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (comúnmente con una composición de 95/5%) para evitar una volatilización excesiva de CO<sub>2</sub>, que puede causar un incremento de pH, y afectar la actividad de los organismos anammox debido a un déficit de la fuente de carbono inorgánico. En la medida en la que el pH y la temperatura en el ensayo sean idénticas o al menos cercanas a los valores observados durante la operación habitual de la planta, los resultados que se obtengan serán más representativos de las velocidades de los procesos que ocurren durante la operación normal. Como el efecto del proceso anammox sobre el pH es bastante limitado (0.13 moles de protones consumidos por cada mol de amonio convertido), pueden esperarse pocas variaciones del pH durante la ejecución de un ensayo en batch (por ejemplo, de 7.5 a 7.9 de acuerdo con Lotti *et al.*, 2012). Sin embargo, para mantener el pH constante durante todo el ensayo en batch, puede utilizarse una solución amortiguadora del pH, como una solución Hepes [ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperazina-N0-2-etano-sulfónico] o de fosfato (Dapena-Mora *et al.*, 2007; Lotti *et al.*, 2012). Mientras que la solución tampón Hepes puede ser usada a concentraciones de hasta 25 mM sin afectar la actividad de las anammox, (Lotti *et al.*, 2012), la concentración del fosfato (como tampón) debe ser seleccionada cuidadosamente ya que puede inhibir el proceso (Dapena-Mora *et al.*, 2007; Oshiki *et al.*, 2011). Reportes previos, sugieren que una concentración de la solución tampón de fosfato de 5.3 mM es apropiada para conducir ensayos anammox en batch (Dapena-Mora *et al.*, 2007; Lotti *et al.*, 2012).

En general, en el objetivo del muestreo y las campañas experimentales debe estar presente el minimizar tanto como sea posible la necesidad de transportación, enfriamiento, almacenamiento y reactivación del lodo. Siempre que sea posible, es recomendable utilizar el lodo fresco (y también medios/sustratos frescos o recién preparados). Cuando se pretendan evaluar las condiciones operacionales reales, entonces el correspondiente ensayo de actividad en batch debe realizarse inmediatamente después de haber recolectado la muestra de lodo, con un mínimo de ajuste en las condiciones operacionales (por ejemplo, de pH y temperatura). Cuando el ensayo en batch no

puede realizarse *in situ* o en un corto tiempo después de recolectar la muestra, esta última debe mantenerse a una temperatura de alrededor de 4 °C para su preservación durante el transporte y almacenamiento. Para biomasas anammox, puede adoptarse la temperatura ambiente para la preservación durante la transportación y almacenaje. Se sugiere almacenar a temperatura ambiente para evitar choques de temperatura, ya que usualmente la de operación de los sistemas anammox es relativamente alta (25-35 °C), en comparación con 4 °C, que es la temperatura común de preservación de muestras convencionales de lodo activado. Bajo estas circunstancias, el ensayo de actividad en batch debe realizarse preferentemente dentro de las 24 h posteriores a haber tomado la muestra y con posterioridad a la reactivación llevando el lodo al pH y temperatura de interés (después de suministrar N<sub>2</sub> en caso de los procesos de desnitrificación y anammox).

La adición de cantidades limitadas de sustrato puede favorecer la reactivación metabólica de las bacterias. Sin embargo, la preparación requerida para el lodo activado depende del ensayo que se realizará, y para cada caso hay sugerencias/recomendaciones específicas que son descritas en los próximos párrafos.

#### 2.4.3.6 Sustrato

Cuando las aguas residuales reales (crudas o sedimentadas) son utilizadas en la realización de ensayos de actividad en batch, pueden alimentarse directamente en el reactor. Las aguas residuales crudas pueden pasarse previamente por una filtración gruesa (usando un tamaño de poro de 10 µm) para remover restos de desechos y partículas de grandes tamaños presentes en el agua residual cruda.

Si se van a estudiar diferentes fuentes y concentraciones de carbono, el efluente tratado de la planta también puede utilizarse para la preparación de un medio semi-sintético que contenga una concentración de S<sub>B</sub> entre 50 y 100 mg DQO L<sup>-1</sup>.

Para la realización de ensayos convencionales de desnitrificación, pueden prepararse soluciones de nitrato o nitrito a partir de sales de nitrato y nitrito, para crear las condiciones anóxicas requeridas.

Para la ejecución de ensayos anammox, se necesita dosificar amonio y nitrito al agua residual, al inicio del ensayo, para proveer la cantidad deseada de sustrato. Con este propósito, pueden prepararse soluciones estándar utilizando sales de amonio y nitrito (por

ejemplo, de 1-10 g N L<sup>-1</sup>). Las empleadas más comúnmente son el sulfato de amonio y nitrito de sodio, respectivamente. Debe prestarse particular atención a la concentración inicial de sustrato. El nitrito, de hecho, además de ser un sustrato para el proceso anammox, es también un inhibidor (Lotti *et al.*, 2012; Puyol *et al.*, 2014). Una concentración inicial de nitrito de alrededor de 50-70 mg N L<sup>-1</sup> se considera adecuada habitualmente. Sin embargo, se recomiendan concentraciones menores (por ejemplo, 10 mg N L<sup>-1</sup>) si la biomasa anammox proviene de sistemas operados con concentraciones bajas de nitrito (por ejemplo, de sistemas DEMON)(Wett *et al.*, 2007). Parece ser que el efecto inhibitorio del nitrito y su resiliencia depende de la “historia” de cultivo de la biomasa anammox, siendo aquellas cultivadas bajo condiciones estrictas de limitación de nitrito las más proclives a la inhibición (Lotti *et al.*, 2012).

Cuando los ensayos se realizan para valorar el potencial inhibitorio o tóxico de un compuesto dado a diferentes concentraciones, deben prepararse soluciones estándar concentradas que se adicionen durante el ensayo para obtener las concentraciones de interés. Ensayos para conocer si el efecto inhibitorio es reversible o no, deben llevarse a cabo después de “lavar” la biomasa para remover el exceso de compuesto inhibitorio. Frecuentemente, la etapa de lavado se desarrolla en pasos sucesivos de sedimentación y resuspensión de la muestra de lodo en un medio sintético libre de carbono y nitrito, en condiciones anóxicas (el medio puede ser totalmente sintético o una mezcla de sintético con efluente tratado y filtrado).

#### 2.4.3.7 Procedimientos analíticos

Los procedimientos analíticos de interés (NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, SSLM, SSVLM, DQO, DBO) deben llevarse a efecto siguiendo los protocolos analíticos estándar detallados en el Standard Methods (APHA *et al.*, 2012).

Si se utiliza una fuente específica de carbono, su determinación deberá realizarse de acuerdo a algún método analítico reconocido. Sin embargo, la mayor parte del tiempo la determinación de la DQO soluble es apropiada para el seguimiento de la fuente de carbono utilizada.



### 2.4.3.8 Parámetros de interés

#### Nitrificación

El parámetro cinético más importante del proceso de oxidación del amonio (nitrificación), llevado a cabo por las AOO, es la velocidad específica máxima de oxidación de amonio ( $q_{AOO,NH_4}$ ). De manera similar, para el proceso aerobio de oxidación del nitrito (nitratación), realizada por las NOO, el parámetro de interés es la velocidad específica máxima de oxidación del nitrito ( $q_{NOO,NO_2,NO_3}$ ). La Tabla 2.4.1 presenta los valores de los parámetros cinéticos típicos hallados en la literatura, para los procesos de oxidación del amonio y del nitrito. Igualmente, valores procedentes de la literatura para los rendimientos de crecimiento de biomasa AOO y NOO son reportados en la Tabla 2.4.1 ( $Y_{AOO}$  y  $Y_{NOO}$ ).

Los valores de los parámetros cinéticos reportados en la Tabla 2.4.1 se han obtenido a 20 °C y fueron calculados a partir de los valores originales, a través de la ecuación de Arrhenius siguiente:

$$k_S(T_K) = k_S(T_{ref}) \cdot \exp\left(\frac{E_{a,S} \cdot (T_K - T_{ref})}{R \cdot T_K \cdot T_{ref}}\right) \quad \text{Ec. 2.4.23}$$

Donde,  $k_S(T_K)$  es la velocidad específica máxima de consumo de sustrato S, referida a la cantidad de biomasa, y evaluada a la temperatura original (expresada como temperatura absoluta  $T_K$  (K),  $T_{ref}$  es la temperatura absoluta de referencia (273 K), R es la constante de los gases ideales ( $8.31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $E_{a,S}$  es la energía de activación de los bioprocesos consumidores de sustrato S. Los valores típicos de energía de activación para los procesos de nitrificación por las AOO y nitratación por las NOO, respectivamente, son:  $E_{a,NH_4} = 68 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  y  $E_{a,NO_2} = 44 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

Como puede observarse en la Tabla 2.4.1, las velocidades aerobias de consumo de amonio y nitrito reportados en la literatura son muy variables, particularmente para el proceso de nitratación catalizado por NOO. La principal razón de esto puede ser por variaciones en la fracción activa de la biomasa nitrificante presente en diferentes lodos activados, convencionalmente referida a la concentración total de SSVLM. Mientras mayor sea la fracción activa de biomasa nitrificante, mayor será la velocidad de conversión específica esperada. En un sistema convencional de lodo activado esto puede estar directamente relacionado con la proporción DQO/N en el afluente, sabiendo que valores bajos de la relación

DQO/N corresponden a fracciones más altas de biomasa activa nitrificante. Por otro lado, como se aprecia en la Tabla 2.4.1, el rendimiento del crecimiento reportado para las bacterias oxidantes de amonio es más alto que para las bacterias oxidantes del nitrito.

**Tabla 2.4.1** Valores típicos de nitrificación de parámetros cinéticos y estequiométricos de interés en lodos activados a 20 °C.

Oxidación aerobia de amonio (proceso de nitrificación)		
$q_{AOO,NH_4}$ g N g SSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	$Y_{AOO}$ g SSV g N <sup>-1</sup>	Referencia
0.11	0.14	Blackburne <i>et al.</i> , (2007)
0.09	0.11	Jones <i>et al.</i> , (2007)
0.24	0.13	Jubany <i>et al.</i> , (2008)
0.27	0.15	Koch <i>et al.</i> , (2000)
0.21	0.11	Lochtman (1995)
0.22	0.15	Wiesmann (1994)
Oxidación aerobia de nitrito (proceso de nitratación)		
$q_{NOO,NO_2,NO_3}$ g N g SSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	$Y_{NOO}$ g SSV g N <sup>-1</sup>	Referencia
0.21	0.07	Blackburne <i>et al.</i> , (2007)
0.13	0.07	Jones <i>et al.</i> , (2007)
0.39	0.06	Jubany <i>et al.</i> , (2008)
1.78	0.02	Koch <i>et al.</i> , (2000)
0.45	0.03	Lochtman (1995)
0.78	0.04	Wiesmann (1994)
1.07	0.03	Wik and Breitholtz (1996)

#### Desnitrificación

Para cuantificar la actividad de los organismos heterótrofos ordinarios (OHOs) bajo condiciones anóxicas, es necesario conocer los parámetros estequiométricos y las constantes cinéticas más importantes. Con respecto a la estequiometría, el parámetro más importante es el rendimiento del crecimiento heterótrofo en condiciones anóxicas  $Y_{OHO,AX}$  (g DQO-biomasa por g DQO-sustrato). Al igual que el rendimiento de crecimiento aerobio, este parámetro puede depender de varios factores, tales como la fuente de carbono orgánico (cantidad y calidad), y de las condiciones ambientales. Valores típicos para este parámetro aparecen en la Tabla 2.4.2. Este parámetro puede ser fácilmente determinado diseñando un apropiado ensayo de actividad en batch, como se explica más adelante. En el proceso de desnitrificación, en vez de  $Y_{OHO,AX}$  también puede emplearse el rendimiento en términos de masa de carbono requerido por masa de nitrito/nitrato removido (expresado como relación DQO/N o C/N), teniendo en cuenta que existe una relación estequiométrica precisa entre ambos rendimientos. La relación DQO/N representa la

capacidad o el poder de desnitrificación de una fuente de carbono o de una cierta agua residual y puede ser un parámetro de uso más práctico que el  $Y_{OHO,AX}$ .

Con respecto a la cinética del crecimiento, la velocidad específica de consumo de sustrato (ya sea nitrato/nitrito o DQO) puede ser determinada fácilmente mediante ensayos de actividad en batch. Este valor depende de las condiciones operacionales existentes durante el ensayo (especialmente de la temperatura y naturaleza y concentración del sustrato). Por tanto, estos valores deben especificarse siempre cuando se reportan los

resultados del ensayo. Como condición de referencia, los ensayos de desnitrificación deben realizarse a 20 °C y con concentraciones de carbono y nitrato/nitrito no limitantes. Esto permitirá determinar la velocidad específica máxima de desnitrificación. Desde el punto de vista práctico la velocidad específica máxima de desnitrificación  $q_{NOx,N2}$  se expresa con respecto a los sólidos suspendidos totales ( $X_{SST}$ ) o más frecuentemente con respecto a los sólidos suspendidos volátiles ( $X_{SSV}$ ) del licor mezclado. En la Tabla 2.4.2 pueden apreciarse algunos valores reportados en la literatura.

**Tabla 2.4.2** Valores esperados de los parámetros cinéticos y estequiométricos de interés en sistemas de tratamiento de agua residual mediante lodos activados que llevan a cabo el proceso de desnitrificación.

Parámetro (símbolo)	Observaciones	Valor	Referencia
Rendimiento de crecimiento heterotrófico anóxico ( $Y_{OHO,AX}$ )	Acetato	0.66 g DQO g DQO <sup>-1</sup>	Ficara y Canziani (2007)
	Agua residual	0.50 g DQO g DQO <sup>-1</sup>	Orhon <i>et al.</i> , (1996)
	Acetato	0.66 g SSV g DQO <sup>-1</sup>	Kujawa y Klapwijk (1999)
	Etanol	0.22 g SSV g DQO <sup>-1</sup>	Hallin <i>et al.</i> , (1996)
	Metanol	0.18 g SSV g DQO <sup>-1</sup>	Tchobanoglous <i>et al.</i> , (2003)
Relación DQO/N	Metanol	4.6 g DQO g N <sup>-1</sup>	Bilanovic <i>et al.</i> , (1999)
	Metanol	4.7 g DQO g N <sup>-1</sup>	Mokhayeri <i>et al.</i> , (2006)
	Etanol	3.5 g DQO g N <sup>-1</sup>	Mokhayeri <i>et al.</i> , (2006)
	Acetato	3.4 g DQO g N <sup>-1</sup>	Mokhayeri <i>et al.</i> , (2006)
Velocidad específica máxima de desnitrificación ( $q_{NOx,N2}$ )	Acetato	10-19 mg N g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Ficara y Canziani (2007)
	Acetato, nitrito	15-28 mg N g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Ficara y Canziani (2007)
	Metanol, 13 °C	9.2 mg N g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Mokhayeri <i>et al.</i> , (2008)
	Etanol, 13 °C	30.4 mg N g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Mokhayeri <i>et al.</i> , (2008)
	Acetato, 13 °C	31.7 mg N g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Mokhayeri <i>et al.</i> , (2008)
	Acetato	1-3 mg N g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Kujawa y Klapwijk (1999)
	Acetato	2-10 mg N g SSV <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Henze (1991)

### Anammox

Los parámetros cinéticos y estequiométricos más significativos en la remoción de nitrógeno por las bacterias anammox son la velocidad específica máxima de oxidación de amonio ( $q_{AMX, NH4,N2}$ ), la relación nitrito/amonio consumido ( $Y_{NH4,NO2,AMX}$ ) y la relación nitrato producido/amonio consumido ( $Y_{NH4,NO3,AMX}$ ). En la Tabla 2.4.3 se reportan valores típicos de parámetros cinéticos y estequiométricos de la literatura, junto con valores de rendimiento de crecimiento de la biomasa.

Aunque el rendimiento de crecimiento no puede ser medido directamente en ensayos en batch, este parámetro es útil para convertir los valores de actividad específica de biomasa a velocidades de crecimiento. A diferencia de otros procesos descritos en esta sección, las constantes cinéticas de anammox que se reportan en la Tabla 2.4.3 corresponden a valores medidos a 30 °C, que es la temperatura más común a la que operan los

procesos anammox, tanto a escala de laboratorio como de planta a escala real, ya que es un valor próximo al óptimo de estos organismos (Hu *et al.*, 2013).

Como se observa en la Tabla 2.4.3, las velocidades cinéticas del proceso anammox reportadas en la literatura se encuentran dentro de un amplio intervalo de valores. Parece ser que la principal razón de esta variación es causada por la fracción activa de biomasa anammox presente en la muestra. En reactores anammox alimentados con medio sintético autótrofo, como es frecuente a escala de laboratorio, puede esperarse una fracción de  $X_{OHO}$  más baja que cuando se compara con reactores alimentados con agua residual que contiene DQO. El tiempo de retención de sólidos (TRS) utilizado también afecta la fracción de células activas, la cual disminuye cuando se acumula una fracción mayor de células inactivas (debido a la muerte) y de compuestos no degradables, al incrementar el TRS.

También se aprecia una cierta diferencia entre las cinéticas de los sistemas NP/anammox de 1 *versus* de 2 etapas, debido a la presencia de  $X_{A00}$  en la primera de las situaciones, lo que contribuye a reducir la fracción de biomasa activa de anammox. Finalmente, como el proceso anammox opera bajo condiciones de concentraciones limitadas de nitrito, como consecuencia

del carácter inhibitorio de este sustrato (Lotti *et al.*, 2012), los sistemas donde la biomasa no tiende a formar gránulos (como los lodos floculantes y especialmente en suspensión) se caracterizan por exhibir menores limitaciones en la transferencia de masas, teniendo así una mayor fracción de biomasa activa que los sistemas de biopelícula (fija o granular).

**Tabla 2.4.3** Parámetros estequiométricos y cinéticos de biomazas anammox realizando el proceso de oxidación anaerobia de amonio a 30 °C. Tipos de biomazas: suspendida (S), floculenta (F), granular (G). Reactor de origen: reactor a escala de laboratorio (Lab) o de planta a escala real (Ptar) realizando la fase anóxica de un sistema NP/anammox en dos etapas (2-etapas), o de un sistema NP/anammox en una sola etapa (1-etapa).

$q_{AMX, NH_4-N_2}$ g N-N <sub>2</sub> g SSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	$Y_{AMX, NH_4}$ C-mol NH <sub>4</sub> -mol <sup>-1</sup>	$Y_{NH_4, NO_2, AMX}$ mol mol <sup>-1</sup>	$Y_{NH_4, NO_3, AMX}$ mol mol <sup>-1</sup>	Tipo de biomasa	Origen del reactor	Referencia
0.66	0.066	1.32	0.26	F	Lab, 2-etapas	Strous <i>et al.</i> , (1998)
0.22		1.27	0.34	G	Lab, 2-etapas	Puyol <i>et al.</i> , (2013)
0.22	0.105	1.28	0.37	F	Lab, 2-etapas	Puyol <i>et al.</i> , (2013)
2.01	0.071	1.22	0.21	S	Lab, 2-etapas	Lotti <i>et al.</i> , (2014)
3.38	0.071			S	Lab, 2-etapas	Lotti <i>et al.</i> , (2015b)
0.16				G	PTAR, 1-etapa	Lotti <i>et al.</i> , (2015c)
0.55				G	PTAR, 2-etapas	Lotti <i>et al.</i> , (2015c)

Como se observa en la Tabla 2.4.3, los valores de las relaciones estequiométricas de consumo o producción también son muy variables entre los diferentes sistemas anammox. En la literatura hay evidencias de que la estequiometría anammox puede verse afectada por el estado fisiológico de la biomasa, mismo que puede estar influenciado por la carga de N (Dosta *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009), la temperatura (Dosta *et al.*, 2008) o el pH (Carvajal-Arroyo *et al.*, 2013).

### 2.4.3.9 Tipos de ensayos en batch

Para evaluar las conversiones en los procesos de remoción de nitrógeno, pueden utilizarse diferentes ensayos en dependencia del tipo de proceso involucrado (nitrificación, desnitrificación, anammox), y del procedimiento seleccionado para su seguimiento (químico, titrimétrico o manométrico).

La Tabla 2.4.4 presenta un listado exhaustivo de los tipos de ensayos que son descritos a detalle, más adelante, en este capítulo.

En primer orden, en la Sección 2.4.4 se presentan los ensayos de nitrificación y en las Secciones 2.4.5 y 2.4.6 se describen los ensayos de desnitrificación y anammox, respectivamente.

## 2.4.4 Ensayos de actividad de nitrificación en batch: preparación

### 2.4.4.1 Equipo requerido

Cada metodología de seguimiento o monitoreo (químico, por titulación o manométrico) tiene requerimientos particulares de equipamiento. Para el seguimiento químico, se necesita el siguiente equipamiento:

1. Reactor batch equipado con sistema de mezcla y puertos adecuados para el muestreo (Sección 2.4.3.1).
2. Electrodo de pH calibrado (si no cuenta con uno incorporado el reactor).
3. Controlador de pH de 2 vías para la adición de HCl y NaOH (o mínimo de 1 vía para HCl, generalmente), o control manual de pH y adición manual de HCl y NaOH. Para soluciones alcalinas que necesitan ser acidificadas puede considerarse, en lugar de adicionar HCl, el suministro de CO<sub>2</sub> o una mezcla de gases enriquecida con CO<sub>2</sub>, ya que ese procedimiento tiene la ventaja de no necesitar la adición de contra-iones de los protones (por ejemplo, al adicionar Cl<sup>-</sup> cuando se emplea HCl como solución ácida).
4. Termómetro con, preferentemente, un intervalo de temperatura entre 0 °C y 40 °C.

5. Sistema de control de temperatura (si la configuración del reactor no cuenta con uno).
6. Medidor de OD (si no está incluido en la configuración del reactor) para verificar las condiciones aerobias/anóxicas.
7. Cronómetro.

La Sección 2.4.3.1 describe la lista de los equipos requeridos para los métodos de seguimiento manométrico y por titulación.

**Tabla 2.4.4** Tipos de ensayos de actividad en batch para evaluar las conversiones en sistemas de remoción biológica del nitrógeno, dependiendo del tipo de proceso y del método de seguimiento.

Código del ensayo	Proceso	Método de monitoreo	Propósito
NIT.CHE	Nitrificación	Químico	Evaluar la velocidad máxima de oxidación del $\text{NH}_4$
NIT.TIT.1	Nitrificación	Titulación	Evaluar la velocidad máxima de oxidación del $\text{NH}_4$
NIT.TIT.2	Nitrificación	Titulación	Evaluar la velocidad máxima de oxidación de $\text{NH}_4$ y $\text{NO}_2$ y la velocidad de amonificación
DEN.CHE.1	Desnitrificación	Químico	Evaluar la velocidad máxima de desnitrificación y el rendimiento del crecimiento anóxico para una fuente de C específica
DEN.CHE.2	Desnitrificación	Químico	Evaluar el potencial de desnitrificación de un agua residual
DEN.MAN	Desnitrificación	Manométrico	Evaluar la velocidad máxima de desnitrificación
DEN.TIT	Desnitrificación	Titulación	Evaluar la velocidad máxima de desnitrificación
AMX.CHE	Anammox	Químico	Evaluar la velocidad máxima del proceso anammox y las relaciones $\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$ y $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$
AMX.MAN	Anammox	Manométrico	Evaluar la velocidad máxima del proceso anammox

### 2.4.4.2 Materiales

Las instrucciones generales para la preparación de materiales pueden consultarse en la Sección 2.2.3.4 y Tabla 2.2.2. Los requerimientos específicos para cada ensayo serán expuestos dentro de cada protocolo en particular. La lista completa de los materiales necesarios aparece en la Sección 2.2.3.2 (exceptuando los puntos 7 y 8).

### 2.4.4.3 Preparación de medios

- **Agua residual real**

Para ensayos en batch que necesiten el uso de agua residual real, siga las instrucciones reportadas en la 2.2.3.3.

- **Soluciones de titulación**

- a. Se requieren soluciones de NaOH y de HCl. Las soluciones típicas para muchos de los usos son 0.05-0.1 N, respectivamente.
- b. La solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede obtenerse por dilución de las soluciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  disponibles comercialmente. La solución más común es de 3%, lo que corresponde a una concentración de 0.44 mol  $\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$ . Por lo tanto, una solución oxigenada adecuada para para la titulación puede obtenerse diluyendo la solución comercial 10 veces (resultando en una solución final de 44 mmol  $\text{O}_2 \text{ L}^{-1}$ ). Para comprobar

la concentración de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede acudir al método yodométrico (método 4.500-CI B en APHA *et al.*, 2012). La solución diluida puede almacenarse en botellas oscuras. Deben prepararse nuevas soluciones cada 7-10 días.

- **Soluciones de amonio y nitrito**

Las soluciones patrón o madre pueden prepararse a partir de las sales respectivas (por ejemplo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{NaNO}_2$ ). Una concentración adecuada para las soluciones patrón está en el intervalo entre 5 y 10 g N  $\text{L}^{-1}$ . El pH de la solución de amonio debe ajustarse a 7.0 para reducir cualquier interferencia potencial durante el ensayo estático de pH.

- **Allyl-N-thiourea (ATU)**

Generalmente es adecuada una solución de aproximadamente 5-10 g  $\text{L}^{-1}$ .

- **Soluciones de ácido y base**

Estas soluciones pueden ser 100-250 mL de 0.1M HCl 0.2 M y NaOH 0.2 M para control automático o manual de pH, y 10-50 mL de HCl 1M y NaOH 1M, para ajuste inicial de pH si el deseado está muy alejado del pKa del agente tampón. En sustitución del NaOH, como solución alcalina puede emplearse  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2 M, que tiene la ventaja de actuar como base y como fuente de carbono. Por tanto, se recomienda el empleo de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  como solución básica para regular el pH, cuando el agua

residual tiene déficit en carbono inorgánico. Esto no se aplica cuando se emplea la técnica de titulación.

- **Medio sintético**

El medio sintético debe contener todos los macro-nutrientes (sodio, cloruro, fosfato, magnesio, sulfato, calcio, potasio) y micro-nutrientes (hierro, zinc, cobre, manganeso, boro, molibdato, yoduro de cobalto) para asegurar que las células no estén en condiciones límites y en caso extremo evitar el fracaso del ensayo. Así, aunque las concentraciones parezcan muy bajas, se debe asegurar que todos los constituyentes estén añadidos en la solución en las cantidades requeridas. Con respecto a los macro-nutrientes, se sugiere la siguiente composición (cantidades por litro de solución) (según Kampschreur *et al.*, 2007): 72 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 35 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 180 mg  $\text{NaCl}$ ; 30 mg  $\text{KCl}$ ; 1 mg de extracto de levadura. En cuanto a los micro-nutrientes, pueden suministrarse dosificando 0.3  $\text{mL L}^{-1}$  de una solución de elementos traza conteniendo lo siguiente (por litro de solución, según Kampschreur *et al.*, 2007): 10 g EDTA; 1.5 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.15 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.03 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.18 g  $\text{KI}$ ; 0.12 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.06 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.12 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.15 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Otras soluciones similares de nutrientes pueden emplearse en la medida que contengan los nutrientes mencionados.

- **Medio para lavar el lodo**

Si para remover compuestos indeseables (que eventualmente pueden ser inhibidores o tóxicos) la muestra de lodo necesita ser lavada, debe prepararse el medio adecuado para ello. El mismo medio sintético descrito anteriormente puede utilizarse como medio para lavar. El proceso de lavado se repite dos o tres veces aplicando el procedimiento descrito en la Sección 2.2.3.5. Posteriormente, se hace la preparación de los ensayos de actividad en batch. En casos especiales en los que se use lodo procedente de una planta a escala real, el efluente filtrado puede utilizarse como agua de lavado (solamente si no contiene compuestos inhibidores o tóxicos).

Con anterioridad a la realización del experimento, muestras del medio y del licor mezclado o lodo activado que se emplearán en el ensayo deben ser recolectadas para comprobar/conocer las concentraciones iniciales (deseadas) de los parámetros de interés (por ejemplo, de amonio, nitrito, nitrato,  $X_{\text{SST}}$ ,  $X_{\text{SSV}}$ ).

Finalmente, deben prepararse las soluciones patrón y diluirse a las de trabajo requeridas para llevar a cabo

la determinación de los parámetros analíticos, de acuerdo al Standard Methods (APHA *et al.*, 2012) y los correspondientes protocolos.

## 2.4.5 Ensayos de actividad de nitrificación en batch: ejecución

### Ensayo NIT.CHE. Ensayo de nitrificación con seguimiento químico: evaluación de la tasa cinética máxima de oxidación del amonio

#### Preparación del lodo activado

1. Para la colección de la muestra, por favor referirse a la Sección 2.4.3.4.
2. Para lodo activado convencional procedente de plantas reales tratando aguas residuales urbanas, será apropiada una muestra con una concentración  $X_{\text{SSV}}$  de 2-4  $\text{g SSV L}^{-1}$ . La concentración de  $X_{\text{SSV}}$  puede ajustarse siguiendo las indicaciones que aparecen en la Sección 2.4.3.5.
3. Introduzca un volumen de muestra de licor mezclado ( $V_{\text{LM}}$ , típicamente 1 a 3 L) en el recipiente de reacción y ponga en marcha la agitación, la aireación y los sistemas de control de pH y temperatura para su ajuste a los valores deseados. Seleccionar y fijar el pH de trabajo deseado (típicamente adecuado entre 7.5 y 8.4). Si no se dispone de un sistema automatizado de control de pH, puede ajustarse el mismo manualmente al valor deseado, adicionando una solución de ácido o base. En principio, mientras más cercano esté el pH al valor que posee en la operación normal de la planta, la velocidad de nitrificación será más representativa. El mismo principio se aplica para la selección de la temperatura de trabajo. En cuanto al OD, el sistema de aireación debe ser capaz de suministrar suficiente oxígeno para evitar condiciones limitantes de OD durante la ejecución del ensayo de nitrificación. Esto quiere decir que bajo condiciones endógenas el valor de OD debe ser alto ( $> 6 \text{ mg L}^{-1}$ , por ejemplo).
4. Espere durante aproximadamente 30 min para alcanzar y asegurar condiciones iniciales estables. Esta etapa de pre-incubación permitirá que cualquier remanente de nitrito o amonio sea consumido, independientemente del origen del lodo.

#### Ejecución del ensayo

1. Verifique que las lecturas de la temperatura, pH y OD tengan los valores deseados o se encuentren dentro de los intervalos fijados. En caso contrario, haga los ajustes necesarios y espere hasta que el sistema se haya estabilizado.



- Una vez que se alcancen las condiciones estables deseadas, agregue la solución de amonio (habiendo previamente ajustado su temperatura al valor deseado para el ensayo). La concentración de amonio en el licor mezclado puede fijarse entre 20 y 40 mg N L<sup>-1</sup>, para que el amonio no sea limitante ni inhibidor.
- Poner en marcha el cronómetro para mantener un control preciso en los tiempos de muestreo. El ensayo tiene su inicio formal en el instante en el que se suministra el amonio (tiempo 0). Recolecte muestras de licor mezclado cada 20-30 min durante toda la duración del ensayo. Todas las muestras deben filtrarse a través de un tamaño de poro de 0.45 μm (o menor), excepto cuando la muestra es usada para la determinación de las concentraciones de X<sub>SST</sub> y X<sub>SSV</sub>.
- Concluya el ensayo después de 3 a 4 h, o cuando se agote el amonio, si el muestreo y la determinación analítica del amonio en las muestras colectadas lo permiten.
- Al finalizar el ensayo tome una muestra para evaluar la concentración de X<sub>SSV</sub>.

Tenga en cuenta que el nitrito es bastante inestable y por tanto su concentración debe ser evaluada rápidamente, en el mismo día, después de la toma de muestras (ver Tabla 2.2.2).

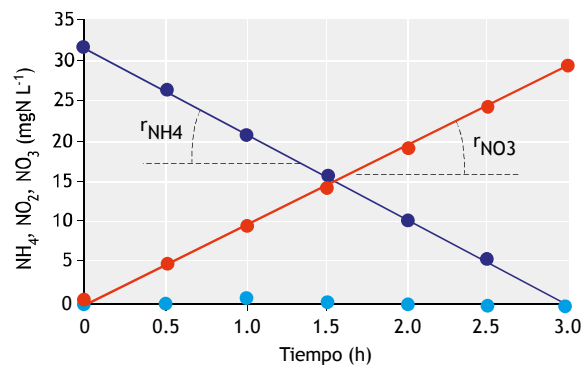
**Análisis de los datos**

Resultados típicos de este ensayo son representados en la Figura 2.4.3. En el eje Y (eje de ordenadas) se reportan las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato (en mg N L<sup>-1</sup>), mientras que el tiempo (en horas) se reporta en el eje X (eje de abscisas). El ajuste mediante regresión lineal de estos datos permite la evaluación de las velocidades de remoción de amonio y producción de nitrato (en mg N L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Preste atención a que los datos sean suficientes para hacer una estimación confiable de las correspondientes velocidades de remoción y/o producción (r<sub>NH4</sub> y r<sub>NO3</sub>) mediante regresión lineal con un coeficiente de determinación R<sup>2</sup> alto (por ejemplo superior a 0.98). Así, se necesitan al menos 4 o 5 puntos para llevar a cabo la regresión lineal, implicando que al inicio del ensayo se requiere recolectar un mayor número de muestras.

El nitrito podría acumularse ligeramente hasta algunos mg N L<sup>-1</sup> cuando se utiliza lodo activado convencional. Sin embargo, si el lodo activado es usado para ejecutar ensayos de nitrificación (nitrificación parcial), entonces puede esperarse una mayor

acumulación de nitrito. Esta concentración debe ser monitoreada en el tiempo, de modo similar a la de amonio y nitrato (por ejemplo, ver el Ensayo NIT.TIT.2). Cuando se utiliza el lodo activado para realizar la oxidación total de amonio a nitrato, la velocidad de remoción de amonio deberá ser igual a la de formación de nitrato, con una despreciable acumulación de nitrito durante el ensayo. La velocidad específica máxima de oxidación de amonio (q<sub>AOO,NH4</sub>, expresada como mg N g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) puede calcularse entonces mediante la siguiente expresión:

$$q_{AOO,NH4} = r_{NH4} / X_{SSV} \tag{Ec. 2.4.24}$$



**Figura 2.4.3** Perfiles típicos obtenidos en un Ensayo NIT.CHE: las concentraciones de amonio (●), nitrito (●) y nitrato (●) son representadas en el eje Y. También se ilustran las velocidades de interés (es decir las tasas cinéticas de remoción de amonio r<sub>NH4</sub>, y producción de nitrato r<sub>NO3</sub>).

**Ensayo NIT.TIT.1. Ensayo de nitrificación por titulación: evaluación de la tasa cinética máxima de oxidación de amonio**

**Preparación del lodo activado**

- Para muestras de lodo activado convencional procedentes de plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) municipal, será apropiada una muestra con X<sub>SSV</sub> entre 2 y 4 g SSV L<sup>-1</sup>. Para muestras de lodo muy diluidas o muy concentradas, se necesita una etapa previa de concentración o dilución de la muestra según sea el caso. La concentración se efectúa decantando el lodo en un cono Imhoff durante 30 min o mediante centrifugación a 4 000 rpm durante unos minutos. Para diluir la muestra se puede emplear el efluente de la misma PTAR. Un control adecuado de la concentración de X<sub>SSV</sub> evitará tener velocidades de nitrificación muy bajas o muy altas.
- Introduzca un volumen conocido de muestra de lodo activado (típicamente 1 L) en el recipiente de reacción y ponga en marcha la aireación y el sistema

de control de la temperatura. Fije el valor deseado de pH (típicamente adecuado entre 7.5 y 8.4). En principio, el valor de pH debe ser lo más próximo posible al de la PTAR de donde procede el lodo, para que la velocidad de nitrificación que se encuentre sea lo más representativa posible de lo que ocurre en la planta. El mismo principio se aplica para la selección de la temperatura. En cuanto al OD, el sistema de aireación debe ser capaz de suministrar suficiente oxígeno para evitar condiciones limitantes de OD durante la ejecución del ensayo de nitrificación. Esto quiere decir que bajo condiciones endógenas el valor de OD debe ser relativamente alto ( $S_{O_2} > 6 \text{ mg L}^{-1}$ , por ejemplo.)

3. Active el sistema de titulación automática para un período de pre-incubación de aproximadamente 1 h. Esta etapa de pre-incubación permite que: (i) las condiciones endógenas se alcancen al inicio del ensayo de titulación ( $S_B$ , amonio y nitrito son oxidados durante esta fase de aireación) y (ii) la temperatura, pH y  $S_{O_2}$  estén estables al inicio del ensayo. Se recomienda el empleo de aire pre-humidificado para evitar mucha evaporación durante la fase de pre-incubación. Tenga en cuenta que prolongados períodos de incubación (mayores a 4 h, por ejemplo) pueden reducir la velocidad de nitrificación como consecuencia de una rápida muerte endógena de la biomasa bajo condiciones aerobias.

### Ejecución del ensayo

1. Active el sistema de registro de datos.
2. Agregue la solución estándar de cloruro de amonio (habiendo ajustado previamente la temperatura a la del ensayo) para obtener una concentración de amonio en el lodo activado que no sea limitante ni inhibidora (entre 20 y 40 mg N  $L^{-1}$ , típicamente). La adición de  $NH_4Cl$  a una suspensión alcalina tiene un efecto acidificante (hidrólisis ácida) que conduce a una rápida disminución de pH que debe compensarse con el sistema de control de pH automatizado, o manualmente a través de la adición de NaOH. Cualquier consumo de la solución de titulación durante esta fase de ajuste de pH no debe ser considerada durante el análisis de los datos. Después de la adición de amonio, las bacterias nitrificantes oxidarán el amonio y consecuentemente se necesitará añadir una solución para titulación alcalina para compensar el efecto acidificante de la nitrificación.
3. Registre el volumen de la solución para titulación de NaOH añadido en el tiempo ( $V_{NaOH}$  versus tiempo)

(20-40 min son usualmente suficientes). Verifique que la lectura del pH se mantenga próximo al valor fijado  $\pm 0.02$  y que el valor de  $S_{O_2}$  no sea limitante. No cambie el flujo de aireación ni las condiciones de mezclado ya que esto podría afectar la velocidad de titulación y hacer que la evaluación de la velocidad de titulación relacionada con la nitrificación sea laboriosa. Los datos recolectados deben ser los suficientes para una estimación confiable de la velocidad de titulación ( $Q_{NaOH}$ ) a partir de la regresión lineal relacionando  $V_{NaOH}$  al tiempo, con un coeficiente de determinación alto ( $R^2 > 0.98$ ).

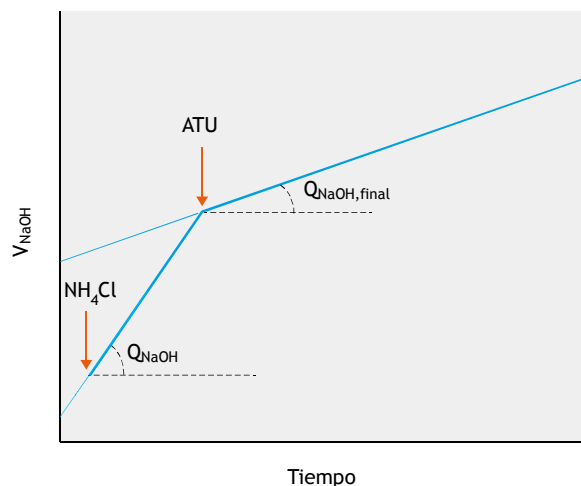
4. Agregue allyl-N-thiourea hasta obtener una concentración final de ATU de 10 mg  $L^{-1}$ . A esta concentración se inhibe la oxidación de amonio. Continúe registrando la velocidad de titulación del NaOH por unos 20-30 min más, para medir la velocidad de titulación residual ( $Q_{NaOH,final}$ ), misma que se debe al efecto que tienen sobre la titulación medida otros procesos que afectan el pH y que pueden estar presentes, como la volatilización de  $CO_2$ . Mientras más prolongado sea el período de pre-incubación, menos relevante será el  $Q_{NaOH,final}$ .
5. Ahora puede concluirse el ensayo. Mida el volumen final de lodo activado y tome una muestra para determinar la concentración de  $X_{SSV}$ . Tome en cuenta que el volumen de la suspensión cambiará durante el ensayo por las soluciones de titulación añadidas, pero es de esperar que la diferencia de volumen no sea mayor a 10 % con respecto al volumen inicial.

### Análisis de los datos

Una tendencia típica del volumen añadido de NaOH durante el ensayo se presenta en la Figura 2.4.4. Con estos datos (volumen de titulación versus tiempo), puede calcularse la velocidad de titulación ( $Q$ ) a través de la pendiente de la curva, utilizando la correspondiente herramienta en hojas de cálculo, o aplicando la siguiente fórmula:

$$Q = \frac{n \cdot \sum t_i \cdot V_{NaOH,i} - \sum t_i \cdot \sum V_{NaOH,i}}{n \cdot \sum t_i^2 - (\sum t_i)^2} \quad \text{Ec. 2.4.25}$$

Donde  $n$  es el número total de datos [ $t_i$ ,  $V_{NaOH,i}$ ] disponibles, correspondientes a diferentes instantes  $i$ .



**Figura 2.4.4** Ejemplo de una curva de titulación pH-estática durante un ensayo de nitrificación realizado para evaluar la capacidad máxima de oxidación del amonio. Las flechas indican la adición de cloruro de amonio y allyl-N-thiourea (ATU). También se identifican las velocidades de titulación.

Las velocidades de titulación de NaOH ( $Q_{NaOH}$  y  $Q_{NaOH,final}$  en  $mL \cdot min^{-1}$ ) se usan para evaluar la tasa cinética de oxidación de amonio ( $F_{NHx}$  en  $mg \ N \cdot min^{-1}$ ), teniendo en cuenta la concentración de la solución de NaOH ( $N_{NaOH}$  en  $meq \ mL^{-1}$ ) y la relación entre el amonio oxidado y la alcalinidad consumida  $Y_{NH4,H+}$  que puede ser evaluada a partir de la Ec. 2.4.15. Por tanto:

$$F_{NHx} = (Q_{NaOH} - Q_{NaOH,final}) \cdot N_{NaOH} \cdot Y_{NH4,H+} \quad \text{Ec. 2.4.26}$$

Finalmente la velocidad específica máxima de oxidación de amonio ( $q_{AOO,NH4}$ , in  $mg \ N \ g \ SSV^{-1} \ h^{-1}$ ) puede calcularse considerando la concentración  $X_{SSV}$  en la muestra de lodo ( $g \ SSV \ L^{-1}$ ) y el volumen de la suspensión al concluir el ensayo ( $V_{LM}$ ):

$$q_{AOO,NH4} = 60 \cdot F_{NHx} / (V_{LM} \cdot X_{SSV}) \quad \text{Ec. 2.4.27}$$

**Ensayo NIT.TIT.2. Ensayo de nitrificación por titulación: evaluación de las tasas cinéticas máximas de oxidación de amonio y nitrito**

**Preparación del lodo activado**

Siga las etapas 1, 2 y 3 de preparación del lodo activado descritas para el Ensayo NIT.TIT.1.

**Ejecución del ensayo**

1. Seleccionar un valor apropiado de  $S_{O2}$  (nivel de OD fijado como concentración de trabajo). Valores típicos comprendidos entre  $4.0 \ mg \ N \ L^{-1}$  y

$6.0 \ mg \ N \ L^{-1}$  son adecuados para evaluar la velocidad de nitrificación máxima. Fijar también el pH de trabajo. Tenga activado el sistema de registro de datos para el seguimiento de la titulación pH/OD-estática.

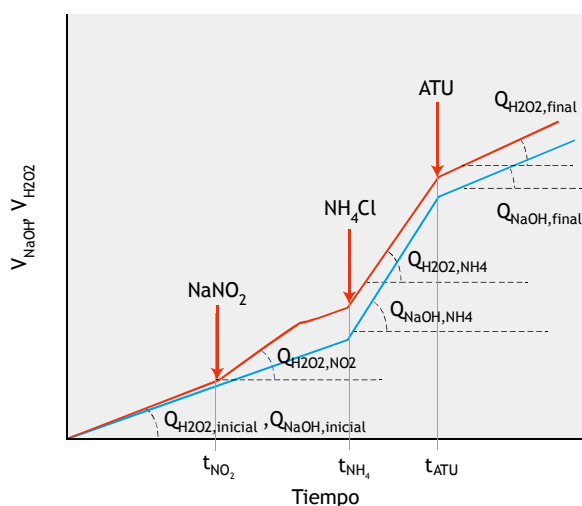
2. Registre los volúmenes de las soluciones de titulación de  $H_2O_2$  y NaOH añadidas en el tiempo ( $V_{H2O2}$  y  $V_{NaOH}$  versus tiempo) (20-40 min es lo normalmente adecuado). Verifique que los valores de pH y OD permanezcan en el intervalo de los valores fijados deseados ( $pH \pm 0.02$  y  $S_{O2} \pm 0.10 \ mg \ L^{-1}$ ). La información recolectada debe ser suficiente para una estimación confiable ( $R^2 > 0.98$ ) de la velocidad de titulación alcalina, aplicando regresión lineal a los datos de  $V_{NaOH}$  versus tiempo, y de la velocidad de titulación de oxígeno ( $Q_{H2O2}$ ) aplicando una regresión lineal a los valores de  $V_{H2O2}$  versus tiempo. Durante esta etapa, las velocidades de titulación son atribuibles a la respiración endógena que tiene como consecuencia el consumo de OD y producción de  $CO_2$ . El primer efecto es compensado con la adición de  $H_2O_2$  (a la velocidad indicada como  $Q_{H2O2,ini}$ ), y el segundo por la adición de NaOH (a una velocidad indicada como  $Q_{NaOH,ini}$ ).
3. Agregue nitrito a una concentración que no sea limitante ni inhibidora para el lodo (alrededor de  $10 \ mg \ N \ L^{-1}$  es un valor típico) para desencadenar su oxidación. Repita la adquisición de datos como se describió en la etapa 2, para estimar la velocidad de titulación del oxígeno (peróxido), que incluye el oxígeno requerido para la oxidación del nitrito ( $Q_{H2O2,NO2}$ ). La velocidad de titulación alcalina no deberá cambiar, ya que la oxidación de nitrito no afecta significativamente el pH de la suspensión.
4. Agregue la solución patrón de cloruro de amonio (una vez que se ha consumido el nitrito) de acuerdo a las instrucciones dadas en la etapa 2 del procedimiento de operación descrito para el Ensayo NIT.TIT.1. Esta adición va a desencadenar la oxidación del amonio. Repita la adquisición de datos descrita en la etapa 2 para evaluar la velocidad de titulación alcalina ( $Q_{NaOH,NH4}$ ) y la velocidad de titulación del oxígeno ( $Q_{H2O2,NH4}$ ) que incluyen las necesidades de la oxidación del amonio.
5. Agregue allyl-N-thiourea (ATU) hasta alcanzar una concentración final de  $10 \ mg \ L^{-1}$ . Esta adición inhibirá la oxidación de amonio. Continúe registrando la velocidad de titulación del NaOH durante 20-30 min para evaluar la velocidad de titulación residual (línea base) que resulta de otros

procesos presentes que afectan el pH, como la producción de  $\text{CO}_2$  ( $Q_{\text{NaOH,final}}$ ). Al mismo tiempo, continúe registrando la velocidad de titulación residual del oxígeno ( $Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{final}}$ ), misma que es causada por aquellas reacciones que afectan al oxígeno ( $Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{final}}$ ) incluyendo la respiración endógena y oxidación residual de nitrito.

- 6 Concluya el ensayo de acuerdo con las instrucciones reportadas en la etapa 4 del procedimiento de operación descrito para el Ensayo NIT.TIT.1.

### Análisis de datos

La Figura 2.4.5 muestra la tendencia típica del volumen acumulado de las soluciones de titulación añadidas durante el ensayo. De los datos (volumen *versus* tiempo), pueden calcularse las velocidades de titulación ( $Q$ ) a partir de las pendientes de las rectas, utilizando la herramienta correspondiente en hojas de cálculo o aplicando la fórmula descrita en el ensayo NIT.TIT.1.



**Figura 2.4.5** Ejemplo de curva de titulación pH/OD-estática durante la ejecución de un ensayo de nitrificación en batch para evaluar las capacidades máximas de oxidación de amonio y nitrito. Las flechas indican las adiciones de nitrito, amonio y allyl-N-thiourea. También se muestran las velocidades de titulación de interés (pendientes de las rectas roja, para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y azul para NaOH).

Las velocidades de titulación con NaOH ( $Q_{\text{NaOH,NH}_4}$  y  $Q_{\text{NaOH,final}}$  en  $\text{mL min}^{-1}$ ) pueden ser usadas primero para evaluar la velocidad de oxidación de amonio ( $F_{\text{NH}_x,\text{NaOH}}$  en  $\text{mg N min}^{-1}$ ) teniendo en cuenta la concentración de la solución para titulación de NaOH ( $N_{\text{NaOH}}$  en  $\text{meq mL}^{-1}$ ) y la relación estequiométrica

teórica entre amonio oxidado y alcalinidad consumida, tal como se sugiere en el Ensayo NIT.TIT.1:

$$F_{\text{NH}_x,\text{NaOH}} = (Q_{\text{NaOH,NH}_4} - Q_{\text{NaOH,final}}) \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot Y_{\text{NH}_4,\text{H}^+} \quad \text{Ec. 2.4.28}$$

Similarmente, las velocidades de titulación de oxígeno ( $Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{NH}_4}$  y  $Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{final}}$  en  $\text{mL min}^{-1}$ ) pueden ser usadas primero para evaluar la velocidad de oxidación del amonio ( $F_{\text{NH}_x,\text{H}_2\text{O}_2}$  en  $\text{mg N min}^{-1}$ ) teniendo en cuenta la concentración de la solución para titulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $N_{\text{H}_2\text{O}_2}$  en  $\text{mmol O}_2 \text{mL}^{-1}$ ) y la relación entre el amonio oxidado a nitrato y el oxígeno consumido,  $Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2,\text{NO}_3}$ , esto es, en correspondencia con la estequiometría de nitrificación de los modelos ASM (Henze *et al.*, 2000):

$$F_{\text{NH}_x,\text{H}_2\text{O}_2} = (Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{NH}_4} - Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{final}}) \cdot N_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 32 \cdot Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2,\text{NO}_3} \quad \text{Ec. 2.4.29}$$

$$Y_{\text{NH}_4/\text{O}_2,\text{NO}_3} = \frac{1}{4.57 - Y_{\text{AOO}}} = 0.23 \text{ g N g O}_2^{-1} \quad \text{Ec. 2.4.30}$$

Los valores de  $F_{\text{NH}_x,\text{NaOH}}$  y  $F_{\text{NH}_x,\text{H}_2\text{O}_2}$  deben ser similares y su comparación puede usarse para validar los datos experimentales. Diferencias mayores a 15 % pueden sugerir la necesidad de revisar la configuración experimental.

Las velocidades de titulación de oxígeno encontradas en la etapa 3 ( $Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{NO}_2}$  en  $\text{mL min}^{-1}$ ) serán usadas para determinar las velocidades de oxidación de nitrito ( $F_{\text{NO}_2}$  en  $\text{mg N min}^{-1}$ ) teniendo en cuenta la relación que existe entre el nitrito oxidado a nitrato y el consumo de oxígeno,  $Y_{\text{NO}_2/\text{O}_2,\text{NO}_3}$ , de acuerdo con la estequiometría de nitrificación en dos etapas:

$$F_{\text{NO}_2} = (Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{NO}_2} - Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{inicial}}) \cdot N_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 32 \cdot Y_{\text{NO}_2/\text{O}_2,\text{NO}_3} \quad \text{Ec. 2.4.31}$$

$$Y_{\text{NO}_2/\text{O}_2,\text{NO}_3} = \frac{1}{1.14} = 0.88 \text{ g N g O}_2^{-1} \quad \text{Ec. 2.4.32}$$

Si no se observan diferencias entre los valores de  $Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{NO}_2}$  y  $Q_{\text{H}_2\text{O}_2,\text{inicial}}$ , entonces, o la velocidad de oxidación del nitrito es muy baja, o es mucho menor que la de oxidación del amonio. Esto puede ocasionar la acumulación de nitrito durante la fase endógena ya que la oxidación de amonio probablemente tendría lugar

sobre el amonio producido durante la amonificación. Si eso es así,  $Q_{H2O2, inicial}$  puede incluir el consumo de oxígeno debido al lento proceso de oxidación del nitrito, y ser igual a  $Q_{H2O2, NO2}$ . En este caso, para evaluar la velocidad de oxidación del nitrito, la muestra de lodo activado debe ser elutriada (lavada) con un medio libre de nitrito para remover cualquier contenido de nitrito, mediante centrifugación y resuspensión. Sin embargo, cuando la velocidad de oxidación del nitrito es muy baja, el seguimiento químico del proceso durante un período más prolongado (algunas horas) del ensayo puede brindar una estimación más confiable y por esa razón es preferible acudir a este método. Es de destacar que para velocidades de oxidación del nitrito bajas,  $F_{NHx, H2O2}$  puede ser mayor que  $F_{NHx, NaOH}$ . Es un hecho que el uso de  $Y_{NH4/O2, NO3}$  entonces ya no sería el adecuado, debido a que se debe de tomar en cuenta solamente la oxidación de amonio a nitrito, porque  $Y_{NH4/O2, NO3}$  cuantifica los requerimientos de oxígeno de ambas reacciones, la oxidación de amonio y la del nitrito. Por lo tanto, en tal caso,  $F_{NHx, H2O2}$  será estimado mejor si se utiliza más bien la relación entre el amonio oxidado y el oxígeno consumido para la oxidación del amonio a nitrito,  $Y_{NH4/O2, NO2}$ , que puede expresarse, de acuerdo a la estequiometría de la nitrificación en dos etapas como:

$$F_{NHx, H2O2} = (Q_{H2O2, NH4} - Q_{H2O2, final}) \cdot N_{H2O2} \cdot 32 \cdot Y_{NO2/O2, NO2} \quad \text{Ec. 2.4.33}$$

$$Y_{NO2/O2, NO2} = \frac{1}{3.43 - Y_{AOO}} = 0.31 \text{ g N g O}_2^{-1} \quad \text{Ec. 2.4.34}$$

Por otra parte, la diferencia entre  $Q_{NaOH, inicial}$  y  $Q_{NaOH, final}$  hace posible estimar la velocidad de amonificación bajo condiciones endógenas. La primera velocidad de titulación compensa el efecto alcalino de la respiración endógena y de la nitrificación endógena, que está limitada por el proceso de amonificación responsable de la liberación de amonio. La amonificación relacionada con el efecto alcalino no estará presente una vez que se agregue ATU. De este modo, la velocidad de amonificación ( $F_{N, NHx}$  en mg N min<sup>-1</sup>) puede ser estimada por diferencia, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F_{N, NHx} = Y_{NH4/O2, NO3} \cdot (Q_{NaOH, inicial} - Q_{NaOH, final}) \cdot N_{NaOH} \quad \text{Ec. 2.4.35}$$

Finalmente, las velocidades máximas específicas de oxidación de amonio y nitrito (por unidad de masa de lodo) ( $q_{AOO, NHx}$ , y  $q_{NOO, NO2, NO3}$  en mg N g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y la velocidad específica de amonificación ( $q_{N, NHx}$ ), pueden ser calculadas considerando la concentración de  $X_{SSV}$  de la muestra de lodo (en g SSV L<sup>-1</sup>) y el volumen de la suspensión observado al finalizar el ensayo ( $V_{LM}$ ):

$$q_{AOO, NHx} = 60 \cdot F_{NHx} / (V_{LM} \cdot X_{SSV}) \quad \text{Ec. 2.4.27}$$

$$q_{NOO, NO3, NO2} = 60 \cdot F_{NO2} / (V_{LM} \cdot X_{SSV}) \quad \text{Ec. 2.4.36}$$

$$q_{N, NHx} = 60 \cdot F_{N, NHx} / (V_{LM} \cdot X_{SSV}) \quad \text{Ec. 2.4.37}$$

## 2.4.6 Ensayos de actividad de desnitrificación en batch: preparación

Estos ensayos son el medio para evaluar la máxima velocidad de desnitrificación de una muestra de lodo, y el rendimiento anóxico de crecimiento de la biomasa. Pueden usarse varias fuentes de carbono, tanto internas como externas (por ejemplo, azúcar o alcohol) o agua residual. Típicamente la máxima velocidad de desnitrificación se alcanza a observar cuando se emplea una fuente de carbono fácilmente biodegradable (al cuál el lodo esté adaptado y degrade rápidamente), mientras que velocidades menores son observadas en presencia de moléculas orgánicas complejas que requieren de una etapa primaria de hidrólisis o cuando se dosifica una fuente externa de carbono que requiere capacidades metabólicas específicas (o clases particulares de microorganismos).

Se presentan cuatro tipos de ensayos diferentes. El primero de ellos (DEN.CHE.1) se refiere al uso de una fuente de carbono fácilmente biodegradable, con la que se quiere evaluar la máxima velocidad de desnitrificación y el rendimiento de crecimiento anóxico de la biomasa. En el segundo ensayo (DEN.CHE.2), se emplea agua residual real. Aunque se puede obtener información cinética con este ensayo, el mismo se aplica principalmente para evaluar la capacidad de desnitrificación del agua residual con la que se trabaja (esto es la cantidad de nitrato que puede desnitrificarse por unidad de volumen de esa agua residual en específico). Finalmente se presentan otros dos ensayos para evaluar la máxima velocidad de desnitrificación aplicando procedimientos de seguimiento manométrico (DEN.MAN) o por titulación (DEN.TIT).



### 2.4.6.1 Equipo

Cada metodología (química, por titulación o manométrica) tiene requerimientos específicos de equipamiento. La aplicación del seguimiento químico necesita el siguiente equipamiento:

1. Un reactor batch hermético a gases (en particular al aire), equipado con sistema de mezclado y puertos de muestreo apropiados (como se describe en la Sección 2.4.3.1).
2. Suministro de gas nitrógeno (recomendado).
3. Electrodo de pH calibrado (si no está incorporado a las facilidades de que dispone el reactor).
4. Controlador de pH de dos vías para adición de HCl y NaOH (alternativamente un controlador de una vía, generalmente para adición de HCl o un control no automatizado con la adición manual de HCl o NaOH).
5. Termómetro con un intervalo de trabajo de 0-40 °C.
6. Controlador de temperatura (si no está incorporado al reactor).
7. Medidor de OD con electrodo (si no está incorporado a las facilidades de que dispone el reactor), para verificar las condiciones anóxicas.
8. Cronómetro.

Cuando se va a realizar el seguimiento por titulación refiérase a la siguiente lista de equipamiento:

1. El equipamiento de titulación automática descrita en la Sección 2.4.3.1.
2. Se recomienda disponer de suministro de gas nitrógeno.

Cuando se va a realizar seguimiento manométrico refiérase a la siguiente lista de equipamiento:

1. El equipamiento de sistema manométrico descrito en la Sección 2.4.3.1.
2. Se recomienda disponer de suministro de gas nitrógeno.

### 2.4.6.2 Materiales

Para una lista completa de los materiales requeridos, referirse a la Sección 2.2.3.2 (con excepción de los puntos 7 y 8).

### 2.4.6.3 Soluciones de trabajo

#### • Agua residual real

Para ensayos en batch que requieran del uso de agua residual real, siga las instrucciones dadas en la Sección 2.2.3.3.

#### • Solución de la fuente de carbono

Esta solución generalmente está compuesta por una fuente de carbono rápidamente (fácilmente) biodegradable ( $S_B$ ), preferiblemente soluciones de ácidos grasos volátiles como el acético y el propiónico, azúcares, o alcohol. La selección de la fuente de carbono depende de la naturaleza y objetivo del ensayo y las preguntas científicas a las que se deben dar respuesta. Algunas veces se emplean sustratos más complejos que son más parecidos a las aguas residuales reales, conteniendo una mezcla de fracciones de DQO fácilmente y lentamente degradables. Para la realización de los ensayos de actividad anóxica en batch, la concentración de DQO (soluble y total, ambas) debe ser conocida para hacer la selección de la dosificación adecuada.

#### • Soluciones de nitrato y nitrito

Se necesitan sales de nitrato y nitrito para ajustar sus concentraciones durante los ensayos de desnitrificación.

#### • Medio para lavar el lodo

Si la muestra de lodo activado debe ser “lavada” para remover compuestos indeseables, puede acudir a la Sección 2.4.3.4.

#### • Soluciones de ácido y base

Estas soluciones pueden ser 100-250 mL de 0.1M HCl y 100-250 mL de 0.1M NaOH para control automático o manual de pH, y 10-50 mL de HCl 1 M y 10-50 mL de NaOH 1 M para un ajuste inicial de pH si el deseado está muy alejado del pKa del agente tampón. Para ensayos por titulación, las soluciones de titulación deben prepararse según las instrucciones dadas en la Sección 2.4.4.3.

#### • Solución de nutrientes

La solución de nutrientes debe contener todos los macro-nutrientes (aluminio, magnesio, sulfato, calcio, potasio) y micro-nutrientes (hierro, zinc, boro, cobre, manganeso, molibdato, cobalto) requeridos para asegurar que los elementos básicos no hagan falta al metabolismo de las células. Así, independientemente del hecho de que las concentraciones parecen ser pequeñas, se debe asegurar que se añadan todos los constituyentes

en las cantidades requeridas. Para los macro-nutrientes se recomienda la siguiente composición (según Smolders *et al.*, 1994), (cantidades por cada litro de solución de nutriente): 107 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 90 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 14 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 36 mg  $\text{KCl}$ , y 1 mg de extracto de levadura. Los micro-nutrientes pueden suministrarse dosificando 10 mL  $\text{L}^{-1}$  de una solución de elementos traza (por litro de solución) (según Vishniac y Santer, 1957): 50 g  $\text{EDTA}$ ; 22 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5.54 g  $\text{CaCl}_2$ ; 5.06 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 4.99 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1.10 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 1.57 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; y 1.61 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Otras soluciones de nutrientes pueden utilizarse, en la medida que contengan todos los compuestos anteriormente reportados como nutrientes requeridos.

Se recomienda tomar una muestra del medio y del lodo antes de la ejecución del experimento para comprobar la concentración inicial deseada de los parámetros de interés (por ejemplo, DQO, nitrato/nitrito,  $X_{\text{SSV}}$ ).

Finalmente, las soluciones de trabajo y las soluciones estándar requeridas para realizar la determinación de los parámetros deben prepararse de acuerdo al Standard Methods (APHA *et al.*, 2012) y a los correspondientes protocolos de preservación de muestras y análisis.

### 2.4.6.4 Preparación de materiales

Para disponer de instrucciones generales de cómo organizar la preparación de los materiales, favor de remitirse a la Sección 2.2.3.4 y a la Tabla 2.2.2. Los requerimientos específicos de cada ensayo serán enumerados en cada uno de los protocolos de ensayo.

## 2.4.7 Ensayos de actividad de desnitrificación en batch: ejecución

### Ensayo DEN.CHE.1 Ensayo de desnitrificación con seguimiento químico: evaluación de la velocidad máxima de desnitrificación y del rendimiento de crecimiento anóxico en presencia de una fuente de carbono específica

#### Preparación del lodo activado

El lugar de muestreo óptimo del lodo activado sería la salida del tanque de post-desnitrificación.

1. Para lodo activado convencional que traten aguas residuales urbanas, puede ser apropiada una muestra de lodo que contenga una  $X_{\text{SSV}}$  alrededor de 2-4 g

SSV  $\text{L}^{-1}$ . La concentración de SSV del lodo puede ajustarse de acuerdo a lo sugerido en la Sección 2.4.3.5.

2. Introduzca un volumen conocido ( $V_{\text{LM}}$ ) de lodo activado (típicamente 1 a 3 L) en el recipiente que sirve como reactor, e inicie la agitación. También inicie la operación del sistema de control de temperatura y pH, y mantenga el valor de estos parámetros alrededor de los valores deseados.
3. Suministre  $\text{N}_2$  gas en el volumen libre superior del reactor durante aproximadamente 10 min para asegurar que el ambiente no contenga oxígeno. Asegure una salida de gases para evitar que se cree una sobrepresión. La entrada de nitrógeno puede mantenerse durante todo el ensayo. De no ser esto posible, entonces el reactor para el ensayo debe ser hermético a las intrusiones de aire y tener una válvula unidireccional (o un sello de agua) que permita la salida de los gases que se producen durante el ensayo, pero que evite que ingresen desde el exterior. Para mayor información de cómo asegurar condiciones anóxicas, puede remitirse a la Sección 2.2.2.1.
4. Espere durante unos 30 min para asegurar condiciones estables al inicio. Esta fase de pre-incubación usualmente logra remover cualquier nitrato residual.

#### Ejecución del ensayo

Verifique que los valores de temperatura, pH, y  $\text{SO}_2$  sean los de interés o cercanos a ellos (dentro del intervalo fijado). En caso contrario, deben ajustarse y dar un tiempo de espera hasta que se restablezcan las condiciones de estabilidad necesarias.

1. Adicione las soluciones patrón de nitrato y  $S_B$ . La temperatura de ambas soluciones debe ajustarse previamente a la de interés. La concentración inicial de nitrato no debe ser limitante ni inhibitoria (valores de 20 a 25 mg  $\text{N L}^{-1}$  son típicamente adecuados). Si se espera que exista nitrato residual en el lodo activado, entonces debe adicionarse en menor concentración.
2. Adicione una cantidad no limitante de la fuente de carbono fácilmente degradable ( $S_B$ ). Para estimar la cantidad apropiada de  $S_B$ , debe tener en cuenta la relación estequiométrica ( $Y_{\text{NO}_3\text{-SB,AX}}$ ) entre la cantidad de  $S_B$  y el nitrato que se consume durante la desnitrificación:

$$Y_{\text{NO}_3\text{-SB,AX}} = \frac{2.86}{1 - Y_{\text{OHO,AX}}} \text{ (g DQO g N}^{-1}\text{)} \quad \text{Ec. 2.4.38}$$

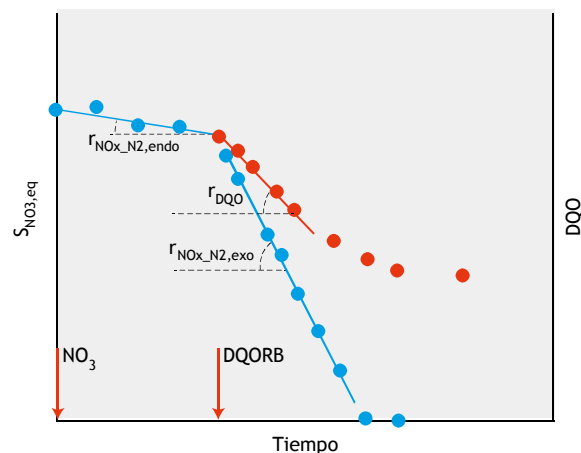
El parámetro  $Y_{OHO,AX}$  es el rendimiento de crecimiento de la biomasa heterótrofa en condiciones anóxicas.

- La fuente de  $S_B$  debe añadirse en exceso, garantizando que la relación de  $S_B$  a nitrato sea de al menos el doble del valor estequiométrico teórico estimado por la expresión anterior. Tenga en consideración que el rendimiento anóxico de crecimiento de biomasa,  $Y_{OHO,AX}$ , depende de la fuente de carbono, tal como se reporta en la Tabla 2.4.2. Sin embargo, el valor típico de 0.5 puede ser usado para una estimación a grosso modo. Bajo esta suposición una concentración de  $S_B$  en el lodo activado de 200 mg DQO  $L^{-1}$  es habitualmente conveniente. Esta concentración también satisface la relación inicial  $S_B/X_{SSV}$  (0.05-0.1 g DQO g  $SSV^{-1}$ ) que se sugiere en la Sección 2.2.4.1. Valores inferiores a esta relación se traducen en un rápido agotamiento del carbono y, por el contrario, valores muy altos pueden causar una inhibición de la biomasa. Puede adicionarse también una solución de amonio para ajustar la relación amonio/ $S_B$  a 0.05 g N g  $DQO^{-1}$ .
- El ensayo inicia con la adición de las soluciones de nitrato y  $S_B$ . Ponga en marcha el cronómetro para poder dar un seguimiento a los tiempos de la campaña de toma de muestras.
- Colecte las muestras de lodo activado a intervalos regulares de tiempo. Como sugerencia general considere tomar las muestras para la determinación de la fuente de carbono (o de la DQO soluble dependiendo del parámetro analítico de interés) y de nitrito y nitrato, cada 10 min durante los 30 primeros minutos de adición de  $S_B$ , cada 15 min durante la siguiente hora, y por último cada 30 min hasta finalizar el ensayo.
- Concluya el ensayo cuando todo el nitrito y nitrato se hayan agotado. Para una evidencia cualitativa rápida de que estos compuestos han sido consumidos, utilice tiras de papel para la detección de nitrito y nitrato.
- Tome una muestra para determinar la concentración final de  $X_{SSV}$ .

Debe tenerse presente que el nitrito es inestable, por lo que las concentraciones de nitrito y nitrato deben determinarse tan pronto como sea posible, preferiblemente dentro de las 24 horas posteriores a la ejecución del ensayo.

### Análisis de los datos

Un ejemplo típico de resultados de este ensayo es ilustrado en la Figura 2.4.6.



**Figura 2.4.6** Perfiles típicos observados en el Ensayo DEN.CHE.1: concentraciones de nitrato en el eje Y principal (●), concentraciones de DQO en el eje Y secundario (●). También se muestran algunas velocidades de interés (tasa cinética de desnitrificación endógena  $r_{NOx\_N2,endo}$ , tasa de desnitrificación exógena,  $r_{NOx\_N2,exo}$ , y tasa de consumo de DQO  $r_{DQO}$ ). Las flechas indican la adición de los sustratos correspondientes.

En el eje Y principal se reporta el equivalente de nitrógeno oxidado  $S_{NO3,Eq}$ , que corresponde a la suma ponderada de las concentraciones de nitrito y nitrato:

$$S_{NO3,Eq} = S_{NO3} + 0.6 \cdot S_{NO2} \quad \text{Ec. 2.4.39}$$

El factor de 0.6 aplicado a la concentración de nitrito corresponde a la capacidad relativa del aceptor final de electrones del nitrito con respecto al nitrato ( $1.71/2.86 = 0.6$ ), tal como sugieren Kujawa y Klapwijk (1999). En el eje Y secundario, se representaron los datos de DQO soluble. Durante el primer período del ensayo (antes de la adición de la fuente externa de C), tiene lugar la desnitrificación endógena y se aprecia una baja velocidad de disminución de  $S_{NO3,Eq}$ .

Para evaluar la velocidad de desnitrificación endógena ( $r_{NOx\_N2,endo}$ , en  $mg\ N\ L^{-1}\ min^{-1}$ ), puede usarse la regresión lineal sobre estos datos (ver Sección 2.4.4.2). Después de la adición de  $S_B$ , la disponibilidad de carbono exógeno acelera las velocidades de consumo de nitrato y nitrito. Los datos de nitrato y nitrito colectados en esta segunda zona (excluyendo los puntos donde estas concentraciones son limitantes) permiten calcular la velocidad de desnitrificación exógena ( $r_{NOx\_N2,exo}$ , en  $mg\ N\ L^{-1}\ min^{-1}$ ). De manera similar,

utilizando el mismo intervalo de tiempo, puede evaluarse la velocidad o tasa máxima de consumo de DQO ( $r_{DQO}$ , en mg DQO L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>).

Se puede hallar la velocidad específica máxima de desnitrificación ( $q_{NOx\_N2,SB}$  en mg N g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) para la fuente de carbono utilizada en particular ( $S_B$ ), con la siguiente expresión:

$$q_{NOx\_N2,SB} = 60 \cdot (r_{NOx\_N2,exo} - r_{NOx\_N2,endo}) / X_{SSV} \quad \text{Ec. 2.4.40}$$

Además, combinando las velocidades de desnitrificación, y la tasa cinética de consumo de DQO, puede calcularse el rendimiento de crecimiento de la biomasa en condiciones anóxicas ( $Y_{OHO,AX}$ ):

$$Y_{OHO,AX} = 1 - 2.86 \frac{(r_{NOx\_N2,exo} - r_{NOx\_N2,endo})}{r_{DQO}} \quad \text{Ec. 2.4.41}$$

### Ensayo DEN.CHE.2. Ensayo de desnitrificación con seguimiento químico: valoración del potencial de desnitrificación de un agua residual

#### Preparación del lodo activado

Las muestras para este ensayo deben recolectarse a la salida del tanque de pre-desnitrificación.

1. Siga el paso 1 del procedimiento de preparación del lodo activado descrito para el ensayo DEN.CHE.1. Note que en este caso una concentración de biomasa de 3-4 g SSV L<sup>-1</sup> podrá ser más adecuada ya que existirá un efecto de dilución cuando se agregue el agua residual.
2. Introduzca en el reactor batch un volumen conocido de la muestra de lodo activado ( $V_{LM}$ , típicamente 0.6-0.8 L) y guarde una muestra del mismo para determinar su concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSVLM en g SSV L<sup>-1</sup>). Siga los pasos 2, 3 y 4 del procedimiento de preparación del lodo activado descrito para el ensayo DEN.CHE.1.

#### Ejecución del ensayo

1. Verifique que los valores de temperatura, pH, y OD del reactor estén dentro de los intervalos deseados. En caso contrario haga los ajustes necesarios y espere un tiempo hasta que se estabilicen.
2. Seleccione el volumen apropiado de agua residual a añadir ( $V_{AR}$ ). Sería ideal adicionar una cantidad de agua residual tal que la concentración final de la DQO biodegradable en el recipiente de reacción permanezca dentro de un intervalo entre 30 y 70 mg

L<sup>-1</sup>. Asumiendo una concentración típica de carbono biodegradable ( $S_B + X_{CB}$ ) de 100-180 mg DQO L<sup>-1</sup>, puede ser apropiado un factor de dilución ( $V_{LM}:V_{AR}$ ) de 2 a 6. Introduzca el agua residual en el reactor y agregue una solución patrón (concentrada) de nitrato para obtener una concentración inicial en la mezcla final ( $V_{LM}+V_{AR}$ ) de 20-25 mg N L<sup>-1</sup>.

3. Ponga en marcha el cronómetro para hacer un seguimiento preciso del tiempo de toma de las muestras. Como sugerencia general, las muestras para la determinación de las concentraciones de nitrito y nitrato deben recolectarse cada 5 minutos durante los primeros 30-45 min del ensayo, cada 10 o 15 min durante los siguientes 30-45 min, y finalmente cada 15 o 30 min hasta concluir el ensayo.
4. Concluya el ensayo después de 3-4 h cuando se observe baja velocidad del proceso (similar a un proceso endógeno).

#### Análisis de los datos

Resultados típicos de este ensayo son mostrados en la Figura 2.4.7. El eje Y representa la concentración en equivalente de nitrógeno de los nitratos y nitritos ( $S_{NO3,Eq}$ ) durante el curso del ensayo. Se aprecian varias velocidades de desnitrificación. La mayor ( $r_{NOx\_N2,SB}$ ) se observa al inicio, es decir cuando  $S_B$  y  $X_{CB}$  están presentes (intervalo  $\Delta t_1$  en la gráfica). Una vez que la fracción orgánica  $S_B$  es totalmente utilizada, la desnitrificación ocurre empleando solamente compuestos orgánicos solubles producidos por la hidrólisis de  $X_{CB}$ , conocida como fracción de DQO lentamente biodegradable (intervalo  $\Delta t_2$  en la gráfica). Por lo tanto, la velocidad de desnitrificación ( $r_{NOx\_N2,XCB}$ ) está limitada por la velocidad de hidrólisis de  $X_{CB}$ . Cuando los componentes orgánicos hidrolizables se consumen totalmente, y si todavía quedan nitrato y nitrito disponibles, la desnitrificación continuará utilizando carbono endógeno a una velocidad menor ( $r_{NOx\_N2,endo}$ ).

La regresión lineal de los datos de  $S_{NO3,Eq}$  en función del tiempo para cada intervalo (ver la Sección 2.4.4.2) permite calcular la velocidad de desnitrificación (mg N L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) de cada fase. La velocidad específica de desnitrificación (mg N g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) puede calcularse como se indica a continuación:

- Velocidad específica de desnitrificación sobre  $S_B$ :

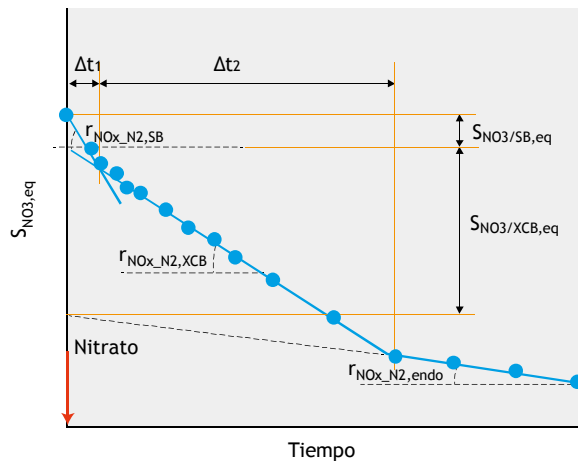
$$q_{NOx\_N2,SB} = 60 \cdot (r_{NOx\_N2,SB} - r_{NOx\_N2,endo}) / X_{SSV} \quad \text{Ec. 2.4.42}$$

- Velocidad específica de desnitrificación sobre  $X_{CB}$ :

$$q_{NOx\_N2,XCB} = 60 \cdot (r_{NOx\_N2,XCB} - r_{NOx\_N2,endo}) / X_{SSV} \quad \text{Ec. 2.4.43}$$

- Velocidad específica de desnitrificación endógena:

$$q_{NOx\_N2,endo} = 60 \cdot (r_{NOx\_N2,endo}) / X_{SSV} \quad \text{Ec. 2.4.44}$$



**Figura 2.4.7** Perfiles típicos obtenidos en un ensayo DEN.CHE.2. Se observan las concentraciones equivalentes de nitrato durante el ensayo (●). Se muestran también las velocidades de interés (velocidades de desnitrificación  $r_{NOx\_N2,SB}$  y  $r_{NOx\_N2,XCB}$  propiciadas por las fracciones de carbono fácilmente, y lentamente biodegradables, respectivamente, y velocidad de desnitrificación endógena  $r_{NOx\_N2,endo}$ ). La flecha roja indica el periodo de adición del nitrato y del agua residual. También se identifican las variaciones relevantes en equivalentes de nitrato ( $S_{NO3/SB,eq}$  sobre  $S_B$  y  $S_{NO3/XCB,eq}$  sobre  $X_{CB}$ ).

Los equivalentes de nitrato que son consumidos al degradar las fracciones de carbono, rápidamente- ( $S_{NO3/SB,eq}$ ) y lentamente- ( $S_{NO3/XCB,eq}$ ) biodegradables, también se aprecian en la figura y pueden ser estimados según las expresiones:

$$S_{NO3/SB,eq} = (r_{NOx\_N2,SB} - r_{NOx\_N2,XCB}) \cdot \Delta t_1 \quad \text{Ec. 2.4.45}$$

$$S_{NO3/XCB,eq} = (r_{NOx\_N2,XCB} - r_{NOx\_N2,endo}) \cdot \Delta t_2 \quad \text{Ec. 2.4.46}$$

Considerando el volumen utilizado de agua residual, se puede cuantificar el Potencial de Desnitrificación de los compuestos orgánicos rápidamente (fácilmente) biodegradables ( $PD_{SB}$ ) y de los lentamente biodegradables ( $PD_{XCB}$ ):

$$PD_{SB} = \frac{S_{NO3/SB,eq} \cdot (V_{LM} + V_{AR})}{V_{AR}} \quad \text{Ec. 2.4.47}$$

$$PD_{XCB} = \frac{S_{NO3/XCB,eq} \cdot (V_{LM} + V_{AR})}{V_{AR}} \quad \text{Ec. 2.4.48}$$

## Ensayo DEN.MAN. Ensayo manométrico de desnitrificación

### Preparación del lodo activado

1. Siga el paso 1 del protocolo de preparación de lodo activado descrito para el ensayo DEN.CHE.1.
2. Seleccione el volumen apropiado de lodo activado ( $V_{LM}$ ) a introducir en el recipiente de reacción. Para este propósito, tenga en cuenta que la magnitud del incremento de presión causada por la liberación de gases depende del volumen libre en la parte superior del recipiente ( $V_{HS}$ ) y de la cantidad esperada de  $N_2$  gas generado (cantidad de nitrógeno a desnitrificar). Entonces, la selección correcta del volumen de lodo es crucial para evitar presiones extremas (muy altas o muy bajas). La sobrepresión máxima se obtendrá al final del ensayo, cuando todo el nitrato se haya desnitrificado, siendo descrita como:

$$P_{max} - P_{atm} = \frac{P_{atm}}{V_{HS}} \cdot \frac{M_{N2}}{28 \cdot 1000} \cdot 22.4 \cdot \frac{(273 + T_C)}{273} \quad \text{Ec. 2.4.49}$$

Donde,  $T_C$  es la temperatura ( $^{\circ}C$ ),  $M_{N2}$  es la masa de gas nitrógeno generada por la desnitrificación durante el curso del ensayo (mg N), que depende de la concentración de nitrato ( $S_{NO3\_N2,Ax}$ , en mg N  $L^{-1}$ ) y el volumen de lodo activado:

$$M_{N2} = S_{NO3\_N2,Ax} \cdot V_{ML} \quad \text{Ec. 2.4.50}$$

Sustituyendo esta ecuación en la Ec. 2.4.49 y reagrupando, se obtiene la siguiente relación:

$$\frac{V_{LM}}{V_{HS}} = \frac{P_{max} - P_{atm}}{P_{atm}} \cdot \frac{28}{22.4} \cdot \frac{273}{(273 + T_C)} \cdot \frac{1}{\frac{S_{NO3\_N2,Ax}}{1000}} \quad \text{Ec. 2.4.51}$$

El valor óptimo para la diferencia de presiones ( $P_{max} - P_{atm}$ ) es de 0.2 atm, lo que significa que, bajo condiciones típicas ( $T_C \sim 20^{\circ}C$ ,  $S_{NO3\_N2,Ax} \sim 20$  mg N  $L^{-1}$ ), se obtiene una relación  $V_{LM}$  to  $V_{HS}$  próxima a 11. Por lo tanto, para un volumen de reactor de 1 L,



el volumen ideal de lodo activado a utilizar durante el ensayo debe ser 0.92 L.

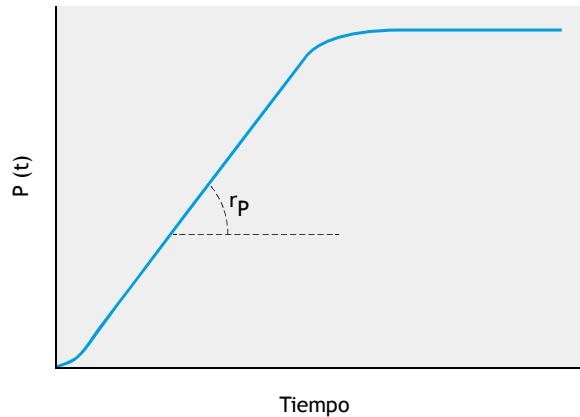
- Introduzca la cantidad calculada previamente de lodo activado en el recipiente de reacción. Inserte el imán para la agitación. Inserte perlas de NaOH en el espacio libre para la absorción de CO<sub>2</sub>. Purgar el espacio libre superior del reactor con N<sub>2</sub> y tapar herméticamente la botella con septo de goma. Introduzca el reactor en una cámara termostática y con agitación a baja velocidad espere durante 30 minutos hasta que la temperatura se estabilice.

**Ejecución del ensayo**

- Determine el volumen de la solución de nitrato a adicionar (de un pulso) para obtener una concentración de nitrógeno en el lodo activado de 20-25 mg N L<sup>-1</sup>. Utilice una jeringa para inyectar la solución patrón de nitrato a través del tapón de goma. Seleccione y dosifique también en forma de pulso, la cantidad de la fuente de carbono, de manera tal que se ejecute bajo condiciones no limitantes ni inhibitorias (ver paso 4 de la ejecución del ensayo DEN.CHE). Cuando inyecte la fuente de carbono ponga en marcha el cronómetro.
- Comience a registrar la información manométrica. Registre los datos cada 15-30 min o hasta que se observe una inflexión en la curva de sobrepresión, lo que indica el agotamiento del nitrato.
- Finalice el ensayo. Verifique el pH final y tome una muestra final del lodo para determinar la concentración de SSVLM.

**Análisis de los datos**

Un ejemplo de resultado típico del ensayo manométrico de desnitrificación se muestra en la Figura 2.4.8. Durante los primeros 10-15 minutos pueden superponerse varios fenómenos como consecuencia de diferentes interferencias potenciales, tales como: (i) intrusión de oxígeno remanente del espacio libre superior del reactor a la fase líquida, (ii) transición de la presión de vapor de agua hacia el equilibrio (iii) retención y acumulación inicial de N<sub>2</sub> en la fase líquida, y/o, (iv) fase de latencia y adaptación microbiológica. Por esta razón, deben descartarse los datos de sobrepresión obtenidos inicialmente. Los datos de sobrepresión registrados posteriormente son los que deben usarse para calcular la velocidad de aumento de la presión (r<sub>p</sub>, atm min<sup>-1</sup>) a través de regresión lineal (ver Sección 2.4.3.3).



**Figura 2.4.8** Perfil de sobrepresión típico obtenido en un ensayo manométrico de desnitrificación realizado con un manómetro acoplado a un sistema automático de adquisición de datos. El gráfico muestra la velocidad máxima de incremento de presión r<sub>p</sub>.

A partir de r<sub>p</sub>, puede calcularse la velocidad de desnitrificación (F<sub>NO<sub>3</sub>\_N<sub>2</sub></sub>, mg N min<sup>-1</sup>) como sigue:

$$F_{NO_3\_N_2} = \frac{r_p}{P_{atm}} \cdot V_{HS} \cdot \frac{28}{22.4} \cdot \frac{273}{273 + T_c} \tag{Ec. 2.4.52}$$

Con, P<sub>atm</sub> en atm y V<sub>HS</sub> en mL.

Finalmente, puede calcularse la velocidad específica de desnitrificación q<sub>NO<sub>x</sub>\_N<sub>2</sub></sub> (mg N g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) utilizando la concentración de SSVLM del lodo activado (X<sub>SSV</sub>):

$$q_{NO_x\_N_2} = 60 \cdot F_{NO_3\_N_2} / (V_{LM} \cdot X_{SSV}) \tag{Ec. 2.4.53}$$

**Ensayo DEN.TIT. Ensayo de desnitrificación por titulación: evaluación de la tasa cinética de desnitrificación**

**Preparación del lodo activado**

Para muestras de lodo activado convencional de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas, la concentración de sólidos suspendidos volátiles (X<sub>SSV</sub>) puede estar en el intervalo entre 2-4 g SSV L<sup>-1</sup>. La muestra debe colectarse a la salida del tanque de pre-desnitrificación o de pos-desnitrificación, dependiendo de la sección objeto de tratamiento.

- Introduzca un volumen conocido de muestra de lodo activado (típicamente 1 L) en el recipiente de reacción y ponga en operación los sistemas de control de temperatura y pH. Fije los valores deseados de pH y temperatura de trabajo.
- Ponga en operación el sistema de titulación automática. Mantenga el lodo en condiciones de pre-

incubación (durante 1 hora, idealmente). La etapa de pre-incubación facilitará el agotamiento de cualquier nitrato o nitrito remanente del lodo traído de la planta de donde procede.

### Ejecución del ensayo

1. Poner en marcha el registro de datos.
2. Adicione la solución estándar de nitrato (después de ajustar su temperatura al valor de la del ensayo), alcanzando una concentración que no sea limitante (el valor típicamente adecuado se encuentra entre 10 y 20 mg N L<sup>-1</sup>). Adicione la solución de S<sub>B</sub> a una concentración que no sea limitante ni inhibitoria. Debe destacarse que la cantidad de nitrato adicionado (M<sub>NO<sub>x</sub>,ini</sub> en mg N) debe ser conocida. Para valorar la cantidad apropiada de S<sub>B</sub>, puede basarse en la relación estequiométrica (Y<sub>NO<sub>3</sub>\_SB,Ax</sub>) entre la cantidad de S<sub>B</sub> y el nitrato consumido, misma que puede calcularse como:

$$Y_{NO_3\_SB,Ax} = \frac{2.86}{1 - Y_{OHO,Ax}} \quad (\text{g DQO g N}^{-1}) \quad \text{Ec. 2.4.38}$$

Nótese que el mismo tipo de ensayo puede realizarse utilizando nitrito en lugar de nitrato. En este caso, se emplea la siguiente expresión:

$$Y_{NO_2\_SB,Ax} = \frac{1.71}{1 - Y_{OHO,Ax}} \quad (\text{g DQO g N}^{-1}) \quad \text{Ec. 2.4.54}$$

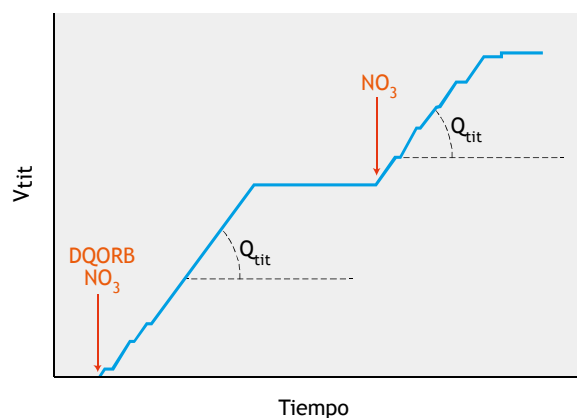
- Debe calcularse la cantidad de S<sub>B</sub> a adicionar (en exceso) de tal manera que la relación S<sub>B</sub>/nitrato (o nitrito) sea de al menos 3-4 veces el valor estequiométrico teórico reportado más previamente. Nótese que el valor de Y<sub>OHO</sub> depende de la fuente o procedencia del carbono. Sin embargo, para una estimación a *grosso modo* puede utilizarse el valor de 0.5. Esto sugiere la necesidad de adicionar S<sub>B</sub> de manera tal que en el lodo activado la concentración S<sub>B</sub> sea de 350 mg DQO L<sup>-1</sup> cuando se usa nitrato y 200 mg DQO L<sup>-1</sup> cuando se usa nitrito. Al realizar estas adiciones, las bacterias desnitrificantes entran en actividad, y usualmente su actividad tiende a producir un incremento del pH. El sistema de titulación automático reaccionará, adicionando ácido para mantener el pH en el valor estático deseado.
3. Registre el volumen añadido de la solución de titulación en el tiempo (V<sub>tit</sub> versus t). Verifique que el valor de pH permanezca en el punto de operación fijado ± 0.02. La concentración de OD debe estar por debajo del límite de detección. Continúe el ensayo hasta que se observe en la curva de titulación un punto de inflexión bien definido. Este punto de

inflexión indica que el nitrato se ha agotado totalmente y que consecuentemente ha concluido la desnitrificación. Los datos registrados deben ser los suficientes para una estimación confiable de la velocidad de titulación (Q<sub>tit</sub>) a partir de la regresión lineal de V<sub>tit</sub> versus tiempo con un coeficiente de determinación alto (R<sup>2</sup> > 0.98, normalmente).

4. El paso 3 puede repetirse adicionando otra dosis de nitrato. Debido a que todavía hay presente una suficiente cantidad de S<sub>B</sub> residual, no es necesario agregar más para llevar a cabo la segunda fase de desnitrificación.
5. Concluya el ensayo de acuerdo a las instrucciones que aparecen en el paso 4 del procedimiento de operación del ensayo NIT.TIT.1.

### Análisis de los datos

La tendencia típica del volumen acumulado de solución titulante se ilustra en la Figura 2.4.9.



**Figura 2.4.9** Ejemplo de curva de titulación a pH estático durante un ensayo de desnitrificación realizado para evaluar la velocidad máxima de desnitrificación. Las flechas indican la adición de las soluciones de nitrato y S<sub>B</sub>. En la gráfica también se muestran las velocidades relevantes de la titulación.

Del juego de datos (V<sub>tit</sub> versus tiempo), la velocidad de titulación (Q<sub>tit</sub>) corresponde al valor de la pendiente de la curva de titulación (ver Sección 2.4.3).

El rendimiento Y<sub>NO<sub>3</sub>\_H+,Ax</sub>, en g N mol<sup>-1</sup> protones, puede evaluarse considerando el volumen V<sub>T</sub> añadido de la solución para titulación hasta que se observe la meseta (parte plana) de la curva de titulación y la masa de nitrato o nitrito añadida (M<sub>NO<sub>x</sub>,ini</sub>):

$$Y_{NO_3\_H+,Ax} = \frac{M_{NO_x,ini}}{V_T \cdot N_T} \quad \text{Ec. 2.4.55}$$

Donde,  $N_T$  es la normalidad de la solución para titulación. Cuando hay más de un pulso añadido (como es el caso de la Figura 2.4.9), el cálculo se hace para cada adición y el valor promedio entre ambos se toma como el valor estimado de  $Y_{NO_3_{H+,Ax}}$ .

La velocidad de titulación ( $Q_{tit}$  en  $mL \text{ min}^{-1}$ ) puede emplearse para hallar la velocidad de desnitrificación ( $F_{NO_3_{H+,Ax}}$  en  $mg \text{ N min}^{-1}$ ). Para ello hay que tener en cuenta la concentración de la solución para titulación ( $N_T$ ) y el valor de  $Y_{NO_3_{H+,Ax}}$ :

$$F_{NO_3_{H+,Ax}} = Q_{tit} \cdot N_T \cdot Y_{NO_3_{H+,Ax}} \quad \text{Ec. 2.4.56}$$

Por último, conociendo la concentración de SSVLM ( $g \text{ SSV L}^{-1}$ ) de la muestra y el volumen de la suspensión ( $L$ ), entonces puede calcularse la velocidad específica máxima de desnitrificación ( $q_{NOx_{N_2}}$ , en  $mg \text{ N g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ):

$$q_{NOx_{N_2}} = 60 \cdot F_{NO_3_{H+,Ax}} / (V_{LM} \cdot X_{SSV}) \quad \text{Ec. 2.4.57}$$

## 2.4.8 Ensayos de actividad anammox en batch: preparación

Como ha sido descrito en la Sección 2.4.1, el proceso anammox consume amonio y nitrito convirtiéndolos en gas nitrógeno principalmente y en una fracción pequeña de nitrato. Cuando el proceso anammox tiene lugar en un reactor operando en batch, entonces las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato varían en el tiempo, lo que puede ser monitoreado para dar seguimiento a la evolución del proceso. Además, cuando se utiliza un reactor hermético a los gases para realizar el ensayo batch, el gas nitrógeno liberado causará un aumento de la presión, que podrá ser medido en el tiempo para determinar las velocidades de los procesos que están ocurriendo. Por lo tanto, hay dos alternativas disponibles para dar seguimiento a la evolución de un proceso anammox:

- Seguimiento químico, midiendo la evolución en el tiempo de las concentraciones de amonio/nitrito/nitrato.
- Seguimiento manométrico, midiendo la sobrepresión causada por la liberación de  $N_2$  en un reactor hermético.

Cada una de estas alternativas es discutida en los siguientes dos ensayos. En el primer ensayo (AMX.CHE), se trata de un batch realizado con seguimiento químico con el objetivo de evaluar la actividad máxima de un cultivo anammox alimentado con un medio sintético autótrofo. En este ensayo también pueden calcularse las relaciones estequiométricas  $NO_2/NH_4$  and  $NO_3/NH_4$ . En el segundo ensayo (AMX.MAN), la biomasa anammox es suspendida en un agua residual real y se emplea un procedimiento manométrico para evaluar su tratabilidad mediante un proceso anammox. En este caso, el potencial inhibitor del agua residual se evalúa comparando la velocidad máxima obtenida en presencia de agua residual y la máxima obtenida en un medio sintético.

### 2.4.8.1 Equipo

Cada metodología de seguimiento, sea química o manométrica, tiene requerimientos especiales de equipamiento.

El equipamiento necesario para el seguimiento químico se detalla a continuación:

1. Reactor hermético, equipado con un sistema de agitación para mezclado y puertos apropiados para la toma de muestras (como se describe en la Sección 2.4.3.1).
2. Suministro de gas nitrógeno (recomendado).
3. Electrodo de pH calibrado (si no está incorporado a las facilidades de que dispone el reactor).
4. Controlador de pH de dos vías para la adición de HCl y NaOH (alternativamente, control de una vía para HCl habitualmente, o bien control manual mediante la adición de HCl y NaOH).
5. Termómetro (rango de temperatura recomendado de 0- 40 °C).
6. Sistema de control de temperatura (si no está incorporado a las facilidades de que dispone el reactor).
7. Medidor de oxígeno disuelto (si no está incorporado a las facilidades de que dispone el reactor) para verificar las condiciones anóxicas.
8. Cronómetro.

Para el ensayo manométrico se necesita el siguiente equipamiento:

1. Sistema manométrico según se describe en la Sección 2.4.3.3.
2. Suministro de nitrógeno (se recomienda)

### 2.4.8.2 Materiales

La lista completa de materiales se detalla en la Sección 2.2.3.2. Se exceptúan los puntos 7 y 8.

### 2.4.8.3 Soluciones de trabajo

- **Agua residual real**

Para los ensayos batch que requieran del uso de agua residual real, siga las instrucciones dadas en la Sección 2.2.3.3.

- **Medio sintético**

Si se desea realizar los ensayos con medio sintético, el medio puede contener una mezcla de amonio, nitrito y bicarbonato, además de los macro y micro-nutrientes necesarios. Generalmente pueden mezclarse todos en el mismo medio, o prepararse separadamente si es que su adición se requiere en diferentes fases o tiempos. La composición y concentraciones usuales (según Graaf *et al.*, 1996) son las siguientes: 1 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (7.6 mM, 106 mg N L<sup>-1</sup>); 0.6 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> (7.1 mM, 99 mg N L<sup>-1</sup>); 0.25 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> (3.6 mM, 51 mg N L<sup>-1</sup>); 1 g L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> (11.9 mM); 0.025 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.18 mM); 0.1 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.41 mM); 0.15 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (1.02 mM); y 1.25 mL L<sup>-1</sup> de cada una de las soluciones A y B de elementos traza (más adelante se describe la preparación de los elementos traza A y B). Otras soluciones similares pueden igualmente ser utilizadas en la medida que contengan los nutrientes señalados. Las soluciones de elementos traza deben contener todos los micro-nutrientes necesarios (hierro, zinc, cobalto, manganeso, cobre, molibdato, níquel, selenio y boro) para asegurar que las células no se vean limitadas por su ausencia y evitar la obtención de malos resultados en los ensayos. Así, independientemente de que sus concentraciones parecen ser muy bajas, hay que asegurar que todos los constituyentes sean añadidos a la solución, y en las concentraciones requeridas. Para las soluciones traza, se recomienda la siguiente composición (cantidades por litro de solución de micro-nutriente) (según van de Graaf *et al.*, 1996): Solución A de elementos traza: 5 g EDTA; 9.14 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Solución B de elementos traza: 15 g EDTA; 0.43 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.24 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.99 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0.25 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0.22 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.19 g NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.21 g NaSeO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O; y 0.014 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

- **Soluciones de amonio o nitrito**

Para la dosificación del sustrato para anammox (casos en los que el agua residual real que se utiliza es deficiente en sustratos), pueden prepararse soluciones

patrón de amonio y nitrito (con concentraciones de, por ejemplo, 1-10 g N L<sup>-1</sup>) usando sales de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o NH<sub>4</sub>Cl para el amonio, y sales de NaNO<sub>2</sub> o KNO<sub>2</sub> para el nitrito. Pueden prepararse todas en una misma solución patrón o en soluciones distintas si se van a añadir en etapas o momentos diferentes. Cuando se prepara la solución amonio/nitrito, la relación molar entre los dos sustratos usualmente es 1, para asegurar un exceso de amonio durante todo el ensayo. Para evitar que el carbono inorgánico (CI) sea limitante, también se puede añadir bicarbonato durante el ensayo batch. Para asegurarse que el CI sea agregado en exceso, se recomienda añadir el bicarbonato a la solución de amonio siguiendo una relación molar de hasta 0.7 mol-CI mol-NH<sub>4</sub><sup>-1</sup> (esto es 10 veces el requerimiento estequiométrico de 0.066 mol de CI por mol de NH<sub>4</sub>). Esto último debe ser considerado en el caso en el que el agua residual del ensayo tenga CI en cantidades limitantes y/o cuando el oxígeno sea removido mediante el suministro o burbujeo de gases que no contengan CO<sub>2</sub> (por ejemplo, N<sub>2</sub>) los cuales pueden producir la volatilización de CO<sub>2</sub>.

- **Solución de nitrato**

Para asegurar que existan las condiciones redox adecuadas, puede dosificarse nitrato con anterioridad a la ejecución del ensayo. La solución patrón (1-10 g N L<sup>-1</sup>, típicamente) para la adición de nitrato puede ser preparada a partir de sales de NaNO<sub>3</sub> o KNO<sub>3</sub>. Esto se necesita especialmente cuando se van a realizar ensayos consecutivos en batch utilizando el mismo lodo anammox (por ejemplo, para evaluar el efecto de la exposición prolongada a un compuesto en particular) para evitar la reducción de sulfato a sulfuro, que puede ser tóxico a las bacterias anammox.

- **Medio para lavado del lodo**

Si la muestra de lodo debe ser “lavada” para remover cualquier compuesto indeseable (que puede ser inhibidor o tóxico), se necesita emplear un medio adecuado. El medio sintético anteriormente descrito puede ser utilizado para lavar, pero omitiendo el nitrito de la receta. El proceso de lavado puede repetirse dos o tres veces. Posteriormente, se realizan las siguientes etapas de preparación. En casos especiales, por ejemplo, cuando se emplean lodos de plantas a escala real, el efluente de éstas puede utilizarse como medio para lavar el lodo.

- **Soluciones ácido base**

Estas pueden ser respectivamente 100-250 mL de solución HCl 0.2 M y 100-250 mL de solución NaOH

0.2 M para el control automático o manual del pH, y 10-50 mL de solución HCl 1 M y 10-50 mL de solución NaOH 1 M para ajuste inicial del pH a las condiciones deseadas cuando el pH operacional al que se realizará el ensayo es muy diferente al pKa del agente tampón.

Finalmente, las soluciones de trabajo y patrón a utilizar para la determinación analítica de los parámetros de interés deben prepararse de acuerdo al Standard Methods (APHA *et al.*, 2012) y los protocolos correspondientes.

Se recomienda tomar alícuotas del medio y de la muestra de lodo activado antes de la ejecución experimental, para verificar las concentraciones iniciales deseadas de los parámetros de interés (por ejemplo, amonio, nitrito, nitrato,  $X_{SST}$  y  $X_{SSV}$ ).

#### 2.4.8.4 Preparación de materiales

Las instrucciones generales de cómo organizar la preparación de los materiales están referidas en la Sección 2.2.3.4 y en la Tabla 2.2.2. Los requerimientos específicos de cada ensayo, aparecen listados en los protocolos particulares.

#### 2.4.9 Ensayos de actividad anammox en batch: ejecución

**Ensayo AMX.CHE. Ensayo de anammox con seguimiento químico: evaluación de la máxima velocidad anammox y las relaciones estequiométricas  $NO_2^-/NH_4^+$  y  $NO_3^-/NH_4^+$**

##### Preparación del lodo activado

Para la selección adecuada del punto donde tomar la muestra del lodo puede consultarse la Sección 2.4.3.4.

1. Para muestras de lodo activado convencional de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, será apropiada una muestra que contenga una concentración  $X_{SSV}$  de alrededor de 2-10 g L<sup>-1</sup>. La concentración de  $X_{SSV}$  puede ajustarse según lo descrito en la Sección 2.4.3.5. Cuando se trata de lodo anammox granular en lugar de lodo activado, la biomasa granular puede separarse del sobrenadante por sedimentación (en una probeta o en un cono Imhoff) y re-suspenderse en una solución de lavado o con efluente de la planta. Deben realizarse ensayos preliminares para evaluar la densidad del lodo granular sedimentado (g SSV L<sup>-1</sup>) para colocar una cantidad definida de lodo granular anammox (g SSV) en el recipiente de reacción.

2. Introduzca un volumen definido de lodo activado (1 a 3 L típicamente) o una cantidad conocida (re-suspendido en el medio a evaluar) en el recipiente de reacción e inicie el mezclado mediante agitación. Al mismo tiempo ponga en operación los sistemas de control de temperatura y pH para mantener ambos parámetros en valores cercanos a los deseados.
3. Suministre N<sub>2</sub> durante 10 min (o una mezcla de gases N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ver la Sección 2.4.3.5) en el espacio libre superior del recipiente de reacción para asegurar la creación de un ambiente libre de oxígeno. Instale una salida de gas para evitar la sobrepresión. Continúe o mantenga la dosificación de N<sub>2</sub> gas hasta que termine el ensayo. Si eso no es posible, entonces utilice un reactor hermético que disponga de un dispositivo de salida de gases que impida la intrusión de oxígeno desde el exterior (válvula de retención o sello de agua; para más detalles, ver Sección 2.2.2.1).
4. Dosifique nitrato hasta tener una concentración de 50-100 mg N L<sup>-1</sup> en el lodo activado para asegurar un adecuado potencial redox y evitar la reducción de sulfato.
5. Espere durante aproximadamente 30 min para asegurar que se desarrollen las condiciones estables deseadas al inicio. En esta fase de pre-incubación normalmente se remueve todo el nitrito residual presente.

##### Ejecución del ensayo

1. Verifique que los valores de la temperatura, pH y OD estén dentro de los intervalos deseados. De otra manera, debe ajustarse y esperar hasta que se estabilicen.
2. Adicione la solución patrón de amonio/nitrito o el medio sintético requerido (previamente ajustados a la temperatura deseada). Para que el nitrito no sea limitante ni inhibidor en el ensayo, su concentración en el lodo activado debe estar entre 50 y 75 mg N L<sup>-1</sup> que es un intervalo adecuado para biomasas de anammox provenientes de procesos operados bajo condiciones no limitantes de nitrito (para una explicación más detallada puede consultarse la Sección 2.4.3.6). Si hay nitrito residual en la muestra de lodo activado, en consecuencia, debe reducirse la adición de nitrito. La concentración inicial de amonio es menos crítica. Debido al bajo efecto inhibidor del amonio en la prueba anammox, se considera adecuado un intervalo de concentración de amonio de entre 50 y 200 mg N L<sup>-1</sup>.

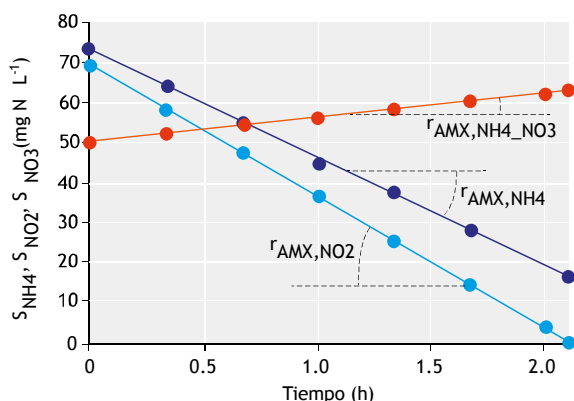


3. Ponga en marcha el cronómetro justo después de la adición de la solución de amonio/nitrito, para dar seguimiento al tiempo de muestreo.
4. Colecte las muestras de lodo activado a intervalos regulares de tiempo, pudiendo ser cada 20 a 30 min durante todo el periodo del ensayo (que usualmente dura de 3 a 4 horas).
5. Concluya el ensayo cuando el nitrito sea totalmente consumido. Pueden usarse tiras de detección para la estimación rápida de la concentración de nitrito.
6. Tome una muestra para determinar la concentración final de los SSVLM.

Tenga en cuenta que el nitrito es inestable y por tanto la concentración debe ser determinada rápidamente después del muestreo.

### Análisis de los datos

Un ejemplo típico de resultados para este ensayo se muestra en la Figura 2.4.10.



**Figura 2.4.10** Perfiles típicos de N en un ensayo AMX.CHE: las concentraciones de amonio (●), nitrito (●) y nitrato (●) aparecen en el eje Y. Se indican las velocidades de reacción de interés (velocidad de remoción de amonio  $r_{AMX,NH4}$ , velocidad de remoción de nitrito  $r_{AMX,NO2}$ , y velocidad de producción de nitrato  $r_{AMX,NH4\_NO3}$ ).

Se puede llevar a cabo la regresión lineal de estos datos (ver Sección 2.4.5) para determinar las velocidades de remoción de amonio ( $r_{AMX,NH4}$ ) y nitrito ( $r_{AMX,NO2}$ ) así como de producción de nitrato ( $r_{AMX,NH4\_NO3}$ ), (expresadas todas como  $\text{mg N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). La velocidad del proceso anammox usualmente se expresa en términos del gas nitrógeno producido, que es equivalente al nitrógeno removido del agua residual. La velocidad específica máxima del proceso anammox ( $q_{AMX,N2}$  como  $\text{mg N}_2\text{-N g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) puede entonces calcularse como sigue:

$$q_{AMX,N2} = \frac{r_{AMX,NH4} + r_{AMX,NO2} - r_{AMX,NH4\_NO3}}{X_{SSV}} \quad \text{Ec. 2.4.58}$$

En la expresión anterior, cuando se utiliza en el ensayo un lodo anammox granular, la concentración de biomasa en el denominador (el término  $X_{SSV}$ ) corresponde a la masa de lodo (g de SSV) añadida al reactor durante la preparación del ensayo, dividida por el volumen del licor mezclado.

Las relaciones estequiométricas de interés, tales como  $Y_{NH4\_NO2,AMX}$  y  $Y_{NH4\_NO3,AMX}$ , pueden calcularse fácilmente a partir de las velocidades de remoción/producción relativas al amonio, nitrito y nitrato, usando las siguientes expresiones:

$$Y_{NH4\_NO2,AMX} = \frac{r_{AMX,NO2}}{r_{AMX,NH4}} \quad \text{Ec. 2.4.59}$$

$$Y_{NH4\_NO3,AMX} = \frac{r_{AMX,NH4\_NO3}}{r_{AMX,NH4}} \quad \text{Ec. 2.4.60}$$

### Ensayo AMX.MAN. Ensayo anammox con seguimiento manométrico.: valorando las máximas velocidades anammox

#### Preparación del lodo activado

1. Siga el paso 1 del protocolo de preparación del lodo activado descrito anteriormente para el ensayo AMX.CHE.
2. Seleccione el volumen apropiado de lodo ( $V_{LM}$ ) a agregar en el recipiente de reacción. Para lodo anammox granular debe consultar las instrucciones descritas para el ensayo AMX.CHE. En este ensayo manométrico, la sobrepresión depende de la relación entre la cantidad de amonio que se oxida (que se basa en la estequiometría de la reacción: 1 mol de  $\text{NH}_4$  consumido producirá 1 mol de  $\text{N}_2$ ) (ver la Sección 2.4.1) y del volumen vacío en la parte superior del recipiente de reacción ( $V_{HS}$  en L). Entonces, la selección correcta de esta relación es crucial para evitar sobrepresiones extremas (muy alta o muy baja). La máxima sobrepresión se obtendrá al final del ensayo, o sea, cuando el nitrito (usualmente sustrato limitante) haya sido totalmente convertido. Considerando la relación estequiométrica  $Y_{NH4\_NO2,AMX}$  igual a  $1.32 \text{ mol-NO}_2 \text{ mol-NH}_4^{-1}$ , la sobrepresión máxima ( $P_{\max} - P_{\text{atm}}$ ) puede estimarse como:

$$P_{\max} - P_{\text{atm}} = \frac{P_{\text{atm}}}{V_{HS}} \cdot \frac{M_{\text{NO}_2\text{-N}_2}}{14} \cdot 22.4 \cdot \frac{(273 + T_C)}{273} \quad \text{Ec. 2.4.61}$$

Donde,  $M_{\text{NO}_2\text{N}_2}$  (en mg N) es la masa de nitrito a convertir durante el ensayo, y depende de la concentración inicial de nitrito ( $S_{\text{NO}_2,\text{ini}}$ , en mg N L<sup>-1</sup>) y del volumen del lodo activado ( $V_{\text{LM}}$  en L):

$$M_{\text{NO}_2\text{N}_2} = S_{\text{NO}_2,\text{ini}} \cdot V_{\text{LM}} \quad \text{Ec. 2.4.62}$$

Sustituyendo esta ecuación en la anterior y reagrupando:

$$\frac{V_{\text{LM}}}{V_{\text{HS}}} = \frac{P_{\text{max}} - P_{\text{atm}}}{P_{\text{atm}}} \cdot \frac{14 \cdot 1.32}{22.4} \cdot \frac{273}{(273 + T_C)} \cdot \frac{1\,000}{S_{\text{NO}_2,\text{ini}}} \quad \text{Ec. 2.4.63}$$

El valor óptimo de sobrepresión máxima ( $P_{\text{max}} - P_{\text{atm}}$ ) usualmente está alrededor de 0.2 atm, lo que quiere decir que bajo condiciones típicas de ensayo, ( $T_C \sim 30^\circ\text{C}$ ,  $S_{\text{NO}_2,\text{ini}} \sim 50$  mg N L<sup>-1</sup>), la relación entre  $V_{\text{LM}}$  y  $V_{\text{HS}}$  debe tener un valor cercano a 3. Por lo tanto, para un volumen de 1 L ( $V_{\text{TOT}} = V_{\text{LM}} + V_{\text{HS}}$ ), un volumen adecuado de lodo activado es de 0.75 L.

3. Coloque el volumen de lodo activado estimado previamente en el recipiente de reacción. Ponga el recipiente en una base orbital para llevar a cabo la agitación (ver Sección 2.4.3.1). Inyecte N<sub>2</sub> (o mezcla de N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, ver Sección 2.4.3.3) para purgar el aire presente en el espacio vacío superior del recipiente de reacción. Ponga el reactor en una cámara termostática, agite suavemente y espere durante 30 min a que la temperatura se estabilice.

### Ejecución del ensayo

1. Seleccione el volumen de la solución de nitrito a dosificar al inicio del ensayo, de manera tal que la concentración de nitrito en el lodo activado no sea limitante ni inhibitoria. Típicamente, una concentración inicial de nitrito de 50 - 75 mg N L<sup>-1</sup> es adecuada cuando se trata de evaluar una biomasa anammox que proviene de un lodo cultivado bajo condiciones no limitantes del nitrito (para más detalles, ver la Sección 2.4.3.4). Usualmente la concentración de amonio es similar a la de nitrito. Se pueden utilizar mayores concentraciones iniciales de amonio, siempre que sean menores que las reportadas como inhibitorias para las bacterias anammox (< 1 g N L<sup>-1</sup>). Si en la muestra de lodo activado hay presente nitrito residual, en consecuencia debe reducirse la adición de nitrito. Inyecte la solución de amonio/nitrito mediante una jeringa a través del tapón de goma del reactor.

2. Inicie la adquisición y registro de los datos manométricos. Haga la lectura de datos cada 30 a 60 min hasta observar el punto de ruptura en la curva de sobrepresión, que corresponde al agotamiento del nitrito.
3. Concluya el ensayo. Verifique el pH final y tome una última muestra para determinar la concentración de SSVLM.

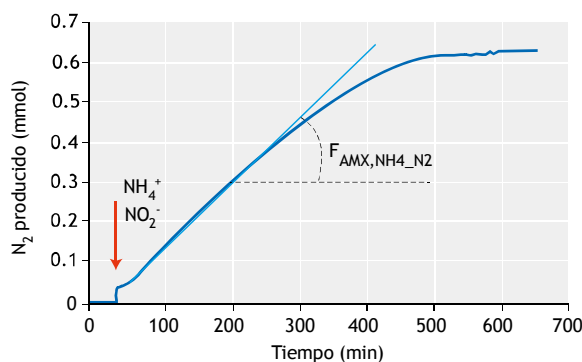
### Análisis de datos

Utilizando a ley de gases ideales, los datos de presión deben convertirse en moles de gas (en este caso N<sub>2</sub>) presentes en el espacio libre superior del reactor:

$$n(t) = \frac{P(t) \cdot V_{\text{HS}}}{R \cdot T_K} \quad \text{Ec. 2.4.64}$$

Donde,  $n(t)$  es el número de moles de N<sub>2</sub> presentes en el volumen libre superior del recipiente de ensayo ( $V_{\text{HS}}$ ) en el tiempo  $t$ ,  $P(t)$  es la presión en el tiempo  $t$ ,  $R$  la constante universal de los gases ideales y  $T_K$  es la temperatura a la que se realizó el ensayo, en Kelvin.

La Figura 2.4.11 muestra un perfil típico de ensayo anammox ejecutado con un manómetro equipado con registro de datos, y después de convertir los datos de presión a moles de N<sub>2</sub> producidos. Se desestiman los datos recogidos durante los primeros 10-15 min de ensayo debido a que hay varios fenómenos que pueden superponerse, afectando la sobrepresión, tales como: (i) la presencia de oxígeno residual en el espacio libre superior, (ii) transición hacia el equilibrio de la presión de vapor de agua, (iii) acumulación inicial de N<sub>2</sub> en la fase líquida, y (iv) fase de adaptación microbológica.



**Figura 2.4.11** Perfil típico de gas N<sub>2</sub> obtenido en un ensayo AMX.MAN realizado con un manómetro equipado con registro de datos. En la figura se representa la velocidad máxima de producción de N<sub>2</sub>,  $F_{\text{AMX,NH}_4\text{N}_2}$ .

Calculando la regresión lineal (ver la Sección 2.4.5), puede hallarse la velocidad de producción de  $N_2$  ( $F_{AMX,NH_4,N_2}$ ,  $N_2\text{-mol min}^{-1}$ ), a partir de la curva de producción acumulada de  $N_2$ . También, la información puede expresarse en  $mg\ N_2\text{-N min}^{-1}$  usando el equivalente molar del gas  $N_2$  ( $28\ g\ N\ mol^{-1}\ N_2$ ). La velocidad específica  $q_{AMX,N_2}$  ( $mg\ N\ g\ SSV^{-1}\ h^{-1}$ ) del proceso anammox puede calcularse utilizando la concentración de los SSVLM:

$$q_{AMX,N_2} = 60 \cdot F_{AMX,NH_4,N_2} / (V_{LM} \cdot X_{SSV}) \quad \text{Ec. 2.4.65}$$

## 2.4.10 Ejemplos

### 2.4.10.1 Ensayo de actividad de nitrificación en batch

#### Descripción

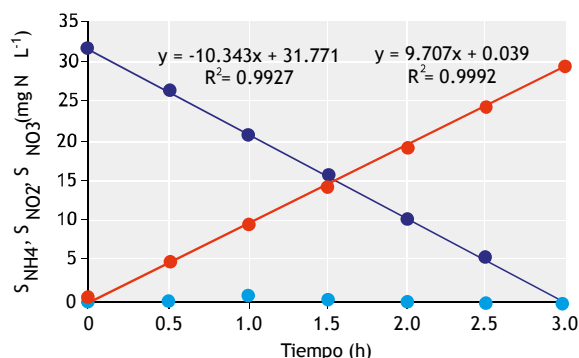
Con el objetivo de ilustrar la ejecución de un ensayo aerobio de nitrificación en batch, se presentan en esta sección los datos de un ensayo realizado a  $20^\circ\text{C}$  con un lodo activado procedente de una planta real. El ensayo NIT.CHE.1 se llevó a cabo para determinar la velocidad específica máxima de oxidación de amonio. Para el ensayo de actividad se utilizó un reactor de 2.5 L. Todo el equipamiento, aparatos y materiales se prepararon como se describe en la Sección 2.4.4.1. Los sensores de pH y OD se calibraron dentro de las 24 horas anteriores al ensayo. El ensayo en batch duró 3 h. Si se incluye el tiempo de preparación y limpieza, el tiempo de duración total de la operación fue de 5 h. Con anterioridad al ensayo 2.0 L de lodo fresco recolectados a la salida de la fase aerobia de una planta completa (de acuerdo con la Sección 2.4.3.4) fueron transferidos al reactor y aclimatados durante 1 h a  $20^\circ\text{C}$  con agitación lenta (100 rpm), siguiendo las instrucciones descritas en la Sección 2.4.3.5. Los controles de pH y OD fueron fijados respectivamente a los valores de 7.5 y  $6\ mg\ O_2\ L^{-1}$ . Posteriormente, 15 min antes de iniciar el ensayo, la agitación fue incrementada a 200 rpm y se recolectaron muestras para la determinación de parámetros de interés (concentraciones de amonio, nitrito, nitrato y SSVLM). Antes de la adición del medio sintético se ajustó su temperatura a la del ensayo ( $20^\circ\text{C}$ ). Para determinar las condiciones iniciales del reactor, se recolectó la primera muestra 5 min antes de la adición del medio sintético. El ensayo se inició con la adición del sustrato sintético (minuto cero):  $50\ mL$  conteniendo  $1\ g\ N\text{-}NH_4\ L^{-1}$  así como otros macro y micro-nutrientes según se describe en la Sección 2.4.3.6. Las muestras se tomaron cada 30 min en un período de 3 h. La selección de la duración

del batch se fijó en función de que todo el amonio presente se oxidara. Inmediatamente después de haber recolectado las muestras, se prepararon y preservaron como se describe en la Sección 2.2.3.4. El análisis de las muestras fue acorde con la sección 2.4.3.7. La Tabla 2.4.5 ilustra la implementación del plan experimental y los resultados de la realización del ensayo.

#### Análisis de los datos

A partir de los datos del experimento mostrados en la Tabla 2.4.5, la Figura 2.4.12 grafica los resultados del ensayo y también provee una estimación de las velocidades máximas volumétricas (aplicando regresión lineal).

Las tasas cinéticas máximas volumétricas de remoción de amonio y producción de nitrato son, respectivamente,  $10.3$  y  $9.7\ mg\ N\ L^{-1}\ h^{-1}$ . Teniendo en cuenta que la concentración promedio de los SSVLM entre el inicio y el final del ensayo fue de  $3.1\ g\ L^{-1}$ , puede calcularse la velocidad específica de oxidación de amonio ( $3.3\ mg\ N\ g\ SSV^{-1}\ h^{-1}$  lo que aproximadamente equivale a  $80\ mg\ N\ g\ SSV^{-1}\ d^{-1}$ ). Es importante destacar que la suma de todo el nitrógeno inorgánico soluble es comparable al inicio *versus* final del ensayo ( $31.1$  vs  $30.1\ mg\ N\ L^{-1}$ ), indicando que el proceso dominante durante todo el ensayo fue la nitrificación.



**Figura 2.4.12** Representación gráfica de las concentraciones de amonio (●), nitrito (●) y nitrato (●) obtenidas en el ejemplo del ensayo de actividad de nitrificación en batch (Prueba NIT.CHE.1). El ensayo se realizó con un lodo activado proveniente de una planta real, usando un medio sintético como afluente durante la prueba.

Las dos líneas de tendencia muestran las velocidades de conversión de amonio y producción de nitrato para la posterior estimación de las velocidades específicas correspondientes. Un decrecimiento en la suma de las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato, hubiera sugerido que ha ocurrido un proceso de remoción simultánea de nitrógeno como la

desnitrificación o de un proceso anammox, que tiene lugar en presencia de condiciones anóxicas. El hecho de que en el lodo del ensayo se hayan obtenido velocidades de oxidación de amonio y de producción de nitrato que son comparables, indica que las actividades de los AOO y NOO en el lodo están bien balanceadas y que permiten alcanzar una nitrificación total. Estas

observaciones también están respaldadas por la ausencia de nitrito. La velocidad específica de oxidación de amonio del ejemplo, es comparable con las reportadas en la Tabla 2.4.1, indicando que el lodo activado de la muestra del ensayo está enriquecido en bacterias nitrificantes.

**Tabla 2.4.5** Resultados del ensayo de actividad de nitrificación en batch.

Ensayo batch de actividad de nitrificación						Code: NIT.CHE				
<b>Fecha:</b>	Lunes	05.10.2015	10:00 h	<b>Procedimiento experimental (simplificado)</b>						<b>Tiempo (h:min)</b>
<b>Descripción:</b>	Ensayo de nitrificación a 20 °C con lodo activado real			1. Confirmar la disponibilidad de equipos y materiales.						08:00
<b>Ensayo No.:</b>	1			2. Confirmar funcionalidad y calibración de sistema, medidores y sensores.						08:10
<b>Duración:</b>	3 h (180 min)			3. Transferir 2 L de lodo al reactor de ensayo.						08:30
<b>Substrato:</b>	Sintético: amonio y nitrito (1,000 mg L <sup>-1</sup> ) + minerales			4. Iniciar agitación lenta con suministro de aire a la T y pH definidos.						08:40
<b>Punto de muestreo:</b>	Altura media en el reactor de ensayo			5. 15 min antes del inicio, recolectar muestra preliminar (muestra NIT.CHE 1).						09:40
<b>Muestras No.:</b>	NIT.CHE 1-8			7. Inicio del ensayo en batch: adicionar 0.05 L de influente sintético.						10:00
<b>Volumen muestras:</b>	80 mL			8. Tomar muestra inicial (minuto cero)						10:00
<b>Volumen del reactor:</b>	(10 mL para muestra normal, 20 mL para SSVLM)			9. Minuto 30, continúe con el programa de muestreo.						10:30
	2.5 L			10. Minuto 180, detener la aireación y la agitación.						13:00
				11. Organizar las muestras y limpiar el sistema.						13:10
				12. Verificar que todos los sistemas han sido apagados.						13:20
<b>Plan de muestreo y recolección de muestras</b>										
Tiempo (min)	-15	0	30	60	90	120	150	180		
Tiempo (h)	-0.25	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00		
Muestra No.	1	2	3	4	5	6	7	8		
Parámetro	FASE AERÓBICA									
NH <sub>4</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	6.8	31	27.3	20.6	17.2	12.4	4.9	0.4		
NO <sub>2</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	0	0	0.4	0.9	0.6	0.3	0.4	0.1		
NO <sub>3</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	0.1	0.1	5.1	9.8	14.2	19.4	24	29.6		
SSLM & SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )	Ver Tabla							Ver Tabla		
<b>Determinación de las concentraciones de SSLM &amp; SSVLM</b>										
Punto de muestreo	Muestra No.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	SSLM	SSVLM	Razón SSV/SS	
Inicio del ensayo <sup>2</sup>	1	0.09630	0.16530	0.10210	0.06900	0.06320	3,450	3,160	0.92	
	2	0.09580	0.16380	0.10190	0.06800	0.06190	3,400	3,095	0.91	
	3	0.09640	0.16440	0.10230	0.06800	0.06210	3,400	3,105	0.91	
						Average	3,417	3,120	0.91	
Final del ensayo	4	0.09540	0.16490	0.10200	0.06950	0.06290	3,475	3,145	0.91	
	5	0.09610	0.16410	0.10180	0.06800	0.06230	3,400	3,115	0.92	
	6	0.09570	0.16400	0.10220	0.06830	0.06180	3,415	3,090	0.90	
						Average	3,430	3,117	0.91	
<b>Composición de la biomasa</b>										
Punto de muestreo	Inicio	Final								
SSLM (mg L <sup>-1</sup> )	3,417	3,430								
SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )	3,120	3,117								
Razón SSVLM/SSLM	0.91	0.91								
Sólidos fijos (mg L <sup>-1</sup> )	297	313								

<sup>2</sup> Muestra recolectada antes de agregar el medio sintético.

### 2.4.10.2 Ensayo de actividad de desnitrificación en batch

#### Descripción

En esta sección se describe un ensayo que fue realizado para evaluar la velocidad máxima de desnitrificación y el rendimiento de crecimiento anóxico en presencia de acetato como fuente de carbono.

Fue empleado un reactor hermético equipado con un sistema de agitación mecánica y con sistemas de control

automático de pH y temperatura. También está provisto de suministro de gas N<sub>2</sub>.

El día anterior al ensayo se calibraron los electrodos de pH y OD y todos los materiales fueron preparados según se sugiere en la Sección 2.2.3.2 (con excepción de los puntos 7 y 8). Se preparó una solución de nitrato de 10 g N L<sup>-1</sup> con NaNO<sub>3</sub> y una solución patrón de acetato a partir de acetato de sodio, para una concentración de 10 g DQO L<sup>-1</sup> (teniendo en cuenta que 1 g CH<sub>3</sub>COONa corresponde a 0.78 g DQO). Para rectificar el pH se

prepararon soluciones 1 M de HCl y 1 M de NaOH. Se utilizó 2 L de lodo. El plan de trabajo preliminar se indica en la Tabla 2.4.6.

**Tabla 2.4.6** Resultados del ensayo de desnitrificación en batch.

Ensayo batch de actividad de desnitrificación										Código: DEN.CHE.1		
Fecha:	Miércoles	02.09.2015	9:00 h	Procedimiento experimental (simplificado)						Tiempo (h:min)		
Descripción:	Tests at 20 °C, pH 7, artificial substrate & enriched lab culture			1. Un día antes confirmar la disponibilidad de equipos y materiales.								
Ensayo No.:	1			2. Confirmar funcionalidad y calibración de sistema, medidores y sensores.								
Duración:	3.5 h (210 min)			3. Transferir muestra de lodo al reactor de ensayo.						09:00		
Substrato:	Sintético: Acetato (200 mg DQO/L) + nitrato (20 mgN/L)			3. Activar suministro de N <sub>2</sub> gas.						09:05		
Punto de muestreo:	Altura media en el reactor de ensayo			4. Adición de nitrato y toma de primera muestra.						09:10		
Muestras No.:	DEN.CHE.1 (1-18)			5. Tomar las siguientes 5 muestras en intervalos de 20 min.						09:10:00-10:30		
Volumen muestras:	240 mL (10 mL para muestra normal, 10 mL para SSVLM)			6. Adición de acetato y muestreo.						10:30		
Volumen del reactor:	2.5 L			7. Recolectar las siguientes 13 muestras en intervalos de 5/10 min.						10:30-11:35		
				8. Terminar el ensayo.						11:35		
				9. Colecte muestras para determinación de SSVLM y volumen total.						11:40		
				10. Organice las muestras y limpie el sistema.						11:50		
				11. Verifique que el sistema ha sido apagado.						12:00		
Plan de muestreo y recolección de muestras												
Tiempo (min)	0	20	40	60	80	85	90	95	100	105	110	120
Tiempo (h)	0.00	0.33	0.67	1.00	1.33	1.42	1.50	1.58	1.67	1.75	1.83	2.00
Muestra No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Parámetro	FASE ANÓXICA											
NO <sub>3</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	23.0	23.2	22.0	21.8	20.2	18.2	15.8	14.0	12.3	11.2	10.2	7.3
NO <sub>2</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	1.0	2.0	2.5	2.8	3.0	3.0	2.7
HAc (mg DQO L <sup>-1</sup> )					418.0	407.3	397.3	385.8	378.0	366.5	353.7	336.5
Plan de muestreo y recolección de muestras (continuación)												
Tiempo (min)	130	140	150	160	180	185						
Tiempo (h)	2.17	2.33	2.50	2.67	3.00	3.08						
Muestra No.	13	14	15	16	17	18						
Parámetro	FASE ANÓXICA											
NO <sub>3</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	4.9	1.8	0.3	0.0	0.0							
NO <sub>2</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	2.0	2.1	1.5	1.0	0.0							
HAc (mg DQO L <sup>-1</sup> )	315.0	303.6	285.7	275.0	271.4							
SSVM (g L <sup>-1</sup> )						2.51						
Biomasa total (gSSV)	4.58											
r <sub>D, end</sub> (mg N L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0.035											
r <sub>D, end</sub> (mg N L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	0.278											
r <sub>DQO</sub> (mg DQO L <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	2.050											
Rendimiento anóxico de crecimiento	0.660											
Tasa de desnitrificación (mgN gSSVM <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	6.600											

La concentración inicial de nitrato se fijó en 20 mg N-NO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> (correspondiente a la adición de 4 mL de la solución patrón de nitrato). La concentración inicial de DQO se fijó en 200 mg L<sup>-1</sup> (adición de 40 mL de la solución patrón de acetato). De acuerdo con las instrucciones dadas en la Sección 2.4.7, se planificó recolectar más de 18 muestras. Todos los materiales fueron preparados y los recipientes etiquetados para evitar errores de identificación durante la recolección de las muestras. El día del ensayo se extrajo el lodo activado del final de la etapa de desnitrificación de un reactor SBR a escala de laboratorio. Se transfirieron 2 L de lodo activado al recipiente de reacción y la temperatura fue fijada a 20 °C, similar a la que tenía en el reactor SBR madre o de cultivo. Simultáneamente, se activó el sistema de control de pH con un valor fijado a 7.4. El pH inicial fue 7.7. Se inició la alimentación de N<sub>2</sub> gas para remover todo el OD remanente y asegurar

condiciones anóxicas después que se añada el nitrato. Pasados 5 min, la concentración de S<sub>02</sub> disminuyó por debajo del límite de detección, y se detuvo la alimentación de N<sub>2</sub>. Se agregó en el reactor el volumen predefinido de la solución patrón de nitrato mediante un pulso a través de un puerto de entrada. Después de aproximadamente 1 min, se puso en marcha el cronómetro y se tomó la primera muestra, marcándose ese momento como el minuto cero. Se tomaron cuatro muestras más con un intervalo de 20 min para evaluar la velocidad de desnitrificación endógena. Posteriormente se añadió la solución patrón de DQO y 30 segundos después se tomó una muestra. Más tarde, fueron tomadas 6 muestras con 5 min de intervalo y después cada 10 min. La campaña de muestreo continuó mientras se dio seguimiento a los perfiles de nitrato y nitrito usando tiras de detección rápida, hasta que tanto el nitrato como el nitrito fueron totalmente consumidos.

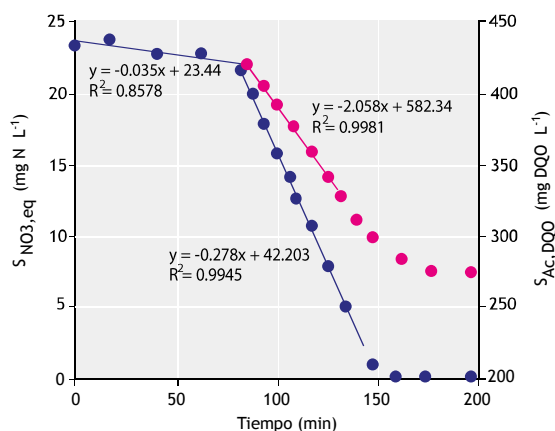


Estas muestras se utilizaron para evaluar las concentraciones de nitrato, nitrito y DQO. El ensayo terminó después de 180 min, momento en el que se tomó una última muestra para evaluar la concentración de SSVLM. Finalizado el ensayo, todos los sistemas fueron detenidos y el reactor fue abierto para medir el volumen final de lodo activado. Todas las muestras fueron recolectadas y preservadas como se describe en la Sección 2.2.3.4. Los análisis de las muestras se realizaron según se describe en la Sección 2.4.3.7.

### Análisis de los datos

Información relevantes de la implementación del ensayo y los resultados de las determinaciones analíticas son reportados en la Tabla 2.4.6. En la Figura 2.4.13, se refleja las tendencias de la DQO y de  $S_{NO_3,Eq}$  (calculado como  $S_{NO_3,Eq} = S_{NO_3} + 0.6 \cdot S_{NO_2}$ ).

Como se muestra en la Figura 2.4.13, las velocidades de desnitrificación endógena y exógena fueron estimadas mediante regresión lineal ( $r_{NOx\_N2,exo}$  y  $r_{NOx\_N2,endo}$  en  $mg\ N\ L^{-1}\ min^{-1}$ ), así como la velocidad de consumo exógeno de DQO ( $r_{DQO}$ , en  $mg\ DQO\ L^{-1}\ min^{-1}$ ). Note que en las determinaciones de las tasas cinéticas solamente se emplearon los datos obtenidos en la fase no limitante de la desnitrificación. Por ejemplo, solamente aquellos datos que permiten alcanzar el mayor ajuste lineal, basándose en el mayor coeficiente de regresión  $R^2$ , para ambos,  $N-NO_{eq}$  y DQO soluble.



**Figura 2.4.13** Representación gráfica de las concentraciones de (●)  $N-NO_{eq}$  y (●) DQO soluble obtenidas en el Ensayo DEN.CHE.1 (como se presenta en la Tabla 2.4.6). En el ensayo se utilizó muestra de lodo activado de un reactor SBR operado a 20 °C y pH 7.5 utilizando acetato como fuente de carbono. Las pendientes de las líneas de tendencia fueron utilizadas para cuantificar las velocidades de desnitrificación endógena y exógena y la velocidad de consumo exógeno de carbono.

Entonces, las velocidades máximas pueden determinarse como:

- Velocidad específica máxima de desnitrificación:

$$q_{NOx\_N2} = 60 \cdot \frac{r_{NOx\_N2,exo} - r_{NOx\_N2,endo}}{X_{SSV}}$$

$$= 60 \cdot \frac{0.28 - 0.035}{2.51} = 5.8\ mg\ N\ g\ SSV^{-1}\ h^{-1} \quad Ec. 2.4.66$$

- Rendimiento de crecimiento anóxico sobre acetato:

$$Y_{OHO,AX} = 1 - 2.86 \cdot \frac{r_{NOx\_N2,exo} - r_{NOx\_N2,endo}}{r_{DQO}}$$

$$= 1 - 2.86 \cdot \frac{0.28 - 0.035}{2.05}$$

$$= 0.66\ g\ DQO_{biomasa}\ g\ DQO_{acetato}^{-1} \quad Ec. 2.4.67$$

Ambos valores obtenidos están en el intervalo de datos reportados en la Tabla 2.4.2, avalando la validez de los resultados.

### 2.4.10.3 Ensayo de actividad anammox en batch

#### Descripción

En esta sección se presentan los datos de un ensayo de actividad anammox en batch realizado a 30 °C con una muestra de biomasa procedente de una planta a escala real. El ensayo AMX.CHE se realizó para determinar la velocidad específica máxima del proceso anammox ( $k_{AMX}$ ,  $mg\ N\ g\ SSVLM^{-1}\ d^{-1}$ ) así como los parámetros estequiométricos de interés para consumo de nitrito y producción de nitrato con respecto al consumo de amonio (relaciones  $NO_2/NH_4$  y  $NO_3/NH_4$  descritas en la Sección 2.4.3.8). Para el ensayo de actividad en batch se utilizó un reactor de 2.5 L. Los equipos, aparatos y materiales fueron preparados según se describe en la Sección 2.4.3. El electrodo de pH fue calibrado dentro de las 24 horas anteriores a la ejecución del ensayo. El ensayo tuvo una duración de 3 h. No obstante, el tiempo total, incluyendo la preparación y limpieza posterior de los aparatos, fue de aproximadamente 5 h. Con anterioridad al ensayo, se recolectó 1 L de lodo anammox fresco de una planta completa, tipo NP/anammox de 1 etapa (de acuerdo a la Sección 2.4.3.4). El lodo fue transferido al reactor y aclimatado durante 1 h a 30 °C bajo un régimen de agitación lenta (100 rpm), según las recomendaciones descritas en la Sección 2.4.9. Para asegurar un ambiente libre de oxígeno, se inyectó una mezcla gases  $N_2/CO_2$  (ver la Sección 2.4.3.5) en el seno del líquido durante los

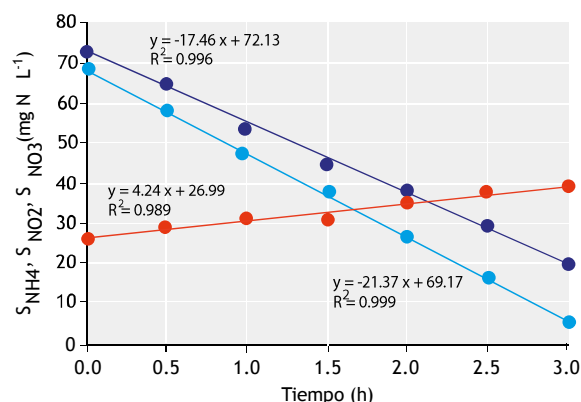
primeros 10 min, y posteriormente durante todo el ensayo, en la parte superior vacía del reactor. Fue previsto un dispositivo de salida de los gases para evitar la sobrepresión y la intrusión de aire. Se puso en marcha el control de pH, fijando el valor en 7.5. Posteriormente, y antes de iniciar el ensayo, se incrementó la agitación a 200 rpm y se recolectaron muestras para determinar las características iniciales del lodo anammox utilizado en el ensayo (concentraciones de amonio, nitrito, nitrato y SSVLM). Para determinar las condiciones iniciales, la primera muestra se tomó 5 min antes de la adición del medio sintético. El ensayo se inició con la adición de 70 mL de medio sintético conteniendo 1 g N-NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> y 1 g N-NO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> así como macro y micro-nutrientes tal como se describe en la Sección 2.4.9 (minuto cero). En el ejemplo el nitrato no se dosificó al inicio del ensayo porque estaba presente en la muestra de lodo anammox. Antes de su adición, se ajustó la temperatura del medio sintético (en un baño de agua) a la temperatura del ensayo (30 °C). Las muestras se recolectaron cada 30 min durante un período de 3 h.

La actividad máxima debe ser evaluada bajo condiciones no limitantes. Considerando la constante de saturación media para nitrito de 0.035 mg N L<sup>-1</sup> reportada en la literatura (en la mayoría de los casos el sustrato limitante) (Lotti *et al.*, 2014), las concentraciones no limitantes de nitrito están en el orden de 1-2 mg N L<sup>-1</sup> para biomasa anammox floculante o en suspensión. Para tipos de biomasas caracterizadas por tener mayores limitaciones de transferencia de masa, como las biopelículas adheridas a un medio inerte y los lodos granulares, las condiciones no limitantes pueden asegurarse con una concentración de nitrito en el orden 5-10 mg N L<sup>-1</sup>, dependiendo de la densidad de la biopelícula y de la actividad específica de anammox. Cuando no hay información detallada sobre las características de la transferencia de masa de la biomasa utilizada durante el ensayo en batch, en el análisis de los datos deben considerarse solamente aquellas concentraciones que permitan ser interpoladas satisfactoriamente mediante regresión lineal ( $R^2 > 0.95$ ). Inmediatamente después de su toma, las muestras fueron preparadas y preservadas como se describe en la Sección 2.2.3.4. Todas las muestras fueron analizadas según se detalla en la Sección 2.4.3.7. La Tabla 2.4.7 muestra el plan de implementación experimental del ensayo.

#### Análisis de los datos

Siguiendo el experimento planteado en la Tabla 2.4.7 (plan de implementación), la Figura 2.4.14 muestra la representación de resultados típicos para este tipo de

ensayo, así como la estimación de las velocidades volumétricas máximas.



**Figura 2.4.14** Resultado típico de un ensayo de actividad anammox en batch (tipo AMX.CHE) - concentraciones observadas durante el ensayo, de amonio (●), de nitrito (●) y nitrato (●), resultando en las siguientes velocidades de conversión de nitrógeno dadas por las pendientes de las ecuaciones: velocidad de remoción de amonio ( $r_{AMX,NH_4}$ ), nitrito ( $r_{AMX,NO_2}$ ), y de producción de nitrato ( $r_{AMX,NH_4,NO_3}$ ). Nota: los datos utilizados en la figura fueron obtenidos de otro ensayo diferente al de la Tabla 2.4.7.

Las velocidades volumétricas máximas de remoción de amonio y nitrito y de producción de nitrato son, respectivamente: 17.5, 21.4 y 4.2 mg N L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Teniendo en cuenta que la concentración promedio de SSVLM fue de 2.2 g L<sup>-1</sup> para la muestra recolectada al inicio y al final del ensayo en batch, puede calcularse el valor de la velocidad específica de oxidación del amonio ( $q_{AMX,NH_4,N_2}$ ), siendo 7.9 mg N g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> o 189 mg N g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Usando la misma aproximación, puede calcularse las velocidades específicas de reducción de nitrito ( $q_{AMX,NO_2,N_2}$ ) y de producción de nitrato ( $q_{AMX,NH_4,NO_3}$ ), resultando en valores de 9.7 y 1.9 mg N g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, que corresponden a 232 y 46 mg N g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Finalmente, la velocidad máxima de remoción de nitrógeno puede ser calculada como la suma de la velocidad volumétrica máxima de remoción de amonio y la de nitrito, menos la velocidad volumétrica máxima de producción de nitrato, obteniendo un valor de 830 mg N L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. De manera similar puede estimarse la velocidad específica máxima de remoción de nitrógeno, la cual resulta ser una tasa cinética específica de la biomasa anammox ( $q_{AMX,N_2}$  o actividad específica de anammox - AEA), siendo de 375 mg N g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Así, las relaciones de  $Y_{NH_4,NO_2,AMX}$  y  $Y_{NH_4,NO_3,AMX}$  pueden calcularse dividiendo las velocidades volumétricas correspondientes.

En este ejemplo (Figura 2.4.14), los valores observados de las relaciones  $Y_{NH_4,NO_2,AMX}$  y  $Y_{NH_4,NO_3,AMX}$  son 1.22 y 0.24 g N g N<sup>-1</sup>, respectivamente. La velocidad específica de remoción de nitrógeno obtenida es comparable con los valores reportados en la Tabla 2.4.3, indicando un alto nivel de enriquecimiento de bacterias anammox en la muestra de lodo activado evaluada en este ensayo. También, los valores obtenidos de los parámetros estequiométricos de interés concuerdan con los valores de  $Y_{NH_4,NO_2,AMX}$  y

$Y_{NH_4,NO_3,AMX}$  reportados en la Tabla 2.4.3, indicando que la oxidación anaerobia del amonio es el bioproceso dominante que ocurre en la muestra de lodo analizada. Es importante notar que cuando la muestra analizada contiene DQO, es de esperar que las relaciones  $Y_{NH_4,NO_2,AMX}$  y/o  $Y_{NH_4,NO_3,AMX}$  observadas sean diferentes de los valores estequiométricos de referencia, debido a que simultáneamente ocurre la desnitrificación heterótrofa convencional.

**Tabla 2.4.7** Plan de implementación y resultados de un ensayo de actividad anammox en batch.

Ensayo batch de actividad Anammox										Código AMX.CHE.1	
<b>Fecha:</b>	Martes	13.10.2015	10:00 h	<b>Procedimiento experimental (simplificado)</b>						<b>Tiempo (h:min)</b>	
<b>Descripción:</b>	Ensayo Anammox a 30 °C con lodo activado real			1. Confirmar disponibilidad de equipos y materiales.						08:00	
<b>Ensayo No.:</b>	1			2. Confirmar funcionalidad y calibración de sistema, medidores y sensores.						08:10	
<b>Duración:</b>	3 h (180 min)			3. Transferir 1.0 L de lodo activado al reactor de ensayo.						08:30	
<b>Substrato:</b>	Sintético: amoníaco y nitrito (1,000 mg L <sup>-1</sup> cada uno) + minerales			4. Inicie la operación del sistema: suministro de N <sub>2</sub> gas y agitación suave a T y pH seleccionados.						08:40	
<b>Punto de muestreo:</b>	Altura media en el reactor de ensayo			5. 15 min antes del inicio tome la primera muestra (muestra AMX.CHE.1).						09:45	
<b>Muestras No.:</b>	AMX.CHE 1-8			6. Inicie el ensayo: agregue 0.07 L de influente sintético.						10:00	
<b>Volumen muestras:</b>	80 mL			7. Minuto 30, continúe con el programa de muestreo.						10:30	
	(5 mL para muestra normal, 20 mL para SSVLM)			8. Minuto 180, detenga la agitación y el suministro de N <sub>2</sub> gas.						13:00	
<b>Volumen del reactor:</b>	2.5 L			9. Organice las muestras y limpie el sistema.						13:10	
				10. Verifique que el sistema ha sido apagado.						13:20	
<b>Plan de muestreo y recolección de muestras</b>											
Tiempo (min)	-15	-5	0	30	60	90	120	150	180		
Tiempo (h)	-0.25	-0.08	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00		
Muestra No.	1		2	3	4	5	6	7	8		
Parámetro	ANAEROBIC PHASE										
NH <sub>4</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	8.2		73.1	63.9	52.7	44.8	38.1	29.5	19.4		
NO <sub>2</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	0 <sup>1</sup>		69.1	58.3	47.6	38.1	25.8	16.2	4.7		
NO <sub>3</sub> -N (mg N L <sup>-1</sup> )	27.5		27.2	29.3	31.1	32.4	35.9	38	39.6		
SSLM & SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )	Ver tabla								Ver tabla		
<sup>1</sup> Valores promedio de las concentraciones iniciales al inicio del ensayo.											
<b>Determinación de las concentraciones de SSLM &amp; SSVLM</b>											
Punto de muestreo	Muestra No.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	SSLM	SSVLM	Razón SSV/SS		
Inicio del ensayo <sup>2</sup>	1	0.09440	0.14430	0.09880	0.04990	0.04550	2,495	2,275	0.91		
	2	0.09480	0.14210	0.09950	0.04730	0.04260	2,365	2,130	0.90		
	3	0.09530	0.14190	0.09860	0.04660	0.04330	2,330	2,165	0.93		
						Promedio	2,397	2,190	0.91		
Final del ensayo	4	0.09350	0.14360	0.09790	0.05010	0.04570	2,505	2,285	0.91		
	5	0.09410	0.14330	0.09840	0.04920	0.04490	2,460	2,245	0.91		
	6	0.09370	0.14200	0.09850	0.04830	0.04350	2,415	2,175	0.90		
						Promedio	2,460	2,235	0.91		
<sup>2</sup> Muestra recolectada antes de agregar el medio sintético.											
<b>Composición de la biomasa</b>											
Punto de muestreo	Inicio	Final									
SSLM (mg L <sup>-1</sup> )	2,397	2,460									
SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )	2,190	2,235									
Razón SSVLM/SSLM	0.91	0.91									
Sólidos fijos (mg L <sup>-1</sup> )	207	225									

## 2.4.11 Consideraciones adicionales

### 2.4.11.1 Presencia de otros organismos

La presencia de otros organismos además de los que llevan a cabo la conversión biológica que se estudia, puede alterar los resultados, minimizando o sobrevalorando la estimación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de interés.

En los ensayos de nitrificación en batch, la manifestación simultánea de alguna actividad de desnitrificación y/o anammox puede dar lugar a una estimación incorrecta de la remoción de nitrito y/o de producción de nitrato. Sin embargo, como estos dos últimos procesos requieren de condiciones anóxicas, basta asegurar una completa penetración del oxígeno dentro de la biomasa para contrarrestar la desnitrificación y el anammox. Mientras que

3-4 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> son considerados suficientes para disponer de condiciones totalmente aerobias cuando se trata de lodo floculante y suspendido, cuando se valora la actividad de nitrificantes de biopelículas, se necesitan concentraciones de oxígeno más altas. Es importante destacar que cuando el ensayo en batch se realiza en presencia de DQO la remoción aerobia de DQO llevada a cabo por microorganismos heterótrofos puede reducir la penetración de oxígeno en la biopelícula y contribuir a crear zonas anóxicas indeseables para la nitrificación (si el oxígeno se hace limitante).

En ensayos de desnitrificación en batch, la presencia simultánea de organismos anammox puede dar lugar a la sobre-estimación o sub-estimación de las velocidades de reducción de nitrito en el primer caso o de nitrato en el segundo. Para evitar esta dificultad, el ensayo de desnitrificación debe realizarse bajo condiciones limitantes de amonio. Es importante destacar que la presencia de amonio durante el ensayo, de cualquier manera, debe ser suficiente para satisfacer los requerimientos en fuente de N asimilable por las bacterias desnitrificantes. Cuando el ensayo en batch pretende evaluar el impacto que sobre la velocidad de desnitrificación tiene una fuente de carbono en particular, el hecho de que ocurra de manera simultánea la desnitrificación por bacterias que pueden almacenar intracelularmente DQO (por ejemplo, PAO y GAO) podría dar lugar a resultados incorrectos. En este caso puede utilizarse un período de aireación antes de realizar el ensayo, para remover la DQO intracelular almacenada en la biomasa.

En ensayos de actividad anammox en batch, la manifestación simultánea de actividades desnitrificante y anammox puede dar lugar a una estimación incorrecta de la velocidad de remoción de nitrito y/o de producción de nitrato, que consecuentemente afectará a  $Y_{NH_4,NO_2,AMX}$  y/o  $Y_{NH_4,NO_3,AMX}$ . Cuando los OHOs constituyen la población desnitrificante dominante, es suficiente realizar el ensayo en ausencia de  $S_B$  para limitar los compuestos donantes de electrones usados para la reducción del nitrito/nitrato. Sin embargo, cuando un lodo activado EBPR es usado en su lugar, esto no será suficiente, ya que los compuestos almacenados intracelularmente pueden permitir la reducción del nitrito/nitrato durante el ensayo anammox en batch. Para remover totalmente la concentración presente de  $S_B$  en el seno del líquido o de la DQO intracelular, puede usarse un período de aireación con anterioridad al inicio del ensayo de anammox. Sin embargo, como la vía metabólica de anammox es la única capaz de oxidar el amonio en medio anóxico, la

actividad de anammox puede valorarse exitosamente en un ensayo en batch aún en presencia de DQO, siguiendo la variación de la concentración de amonio en el tiempo.

### 2.4.11.2 Carencia de micro y macro-nutrientes esenciales

Aunque pudiera parecer trivial, la presencia de macro y micro-nutrientes en las concentraciones y biodisponibilidad apropiadas es esencial para los bioprocesos involucrados en la remoción de nitrógeno en sistemas de lodo activado, tales como nitrificación, desnitrificación y los procesos anammox descritos en este capítulo. Comúnmente, los macro y micro-nutrientes están presentes en la mayoría de las aguas residuales municipales, pero su presencia debe ser verificada y confirmada, particularmente si la planta de tratamiento de aguas residuales bajo estudio recibe regularmente efluentes industriales. Debido al bajo rendimiento de los microorganismos autótrofos como los nitrificantes y las bacterias anammox, la carencia de macro-nutrientes no es tan frecuente cuando se tratan aguas residuales municipales. Sin embargo, puede ser un aspecto al cual es necesario prestar atención cuando se aplican estos bioprocesos al tratamiento de aguas residuales industriales y, en general, para aguas residuales “altamente concentradas”. Para este propósito, puede realizarse la estimación del requerimiento de nutrientes de la biomasa en función de la carga de nitrógeno a tratar, y compararse con las concentraciones de nutrientes del afluente, para valorar si es suficiente para suplir las necesidades del crecimiento biológico y de las tasas de conversión. En algunos casos la dosificación externa de algún micro-nutriente en particular, más allá del requerimiento mínimo, puede aumentar la cinética de una población en específico, como ha sido recientemente reportado en el caso de la dosificación de hierro en cultivos anammox (Chen *et al.*, 2014; Bi *et al.*, 2014).

### 2.4.11.3 Efectos tóxicos o inhibidores

Se han identificado varios compuestos que pueden causar efectos tóxicos o inhibidores sobre las comunidades bacterianas que llevan a cabo procesos de nitrificación, desnitrificación y anammox. Debido a la abundancia y diversidad de organismos OHOs capaces de realizar la desnitrificación en sistemas de lodo activado, ellos pueden aclimatarse y adaptarse a diferentes condiciones ambientales y operacionales y aún resistir la presencia de compuestos potencialmente tóxicos o inhibitorios. Pero, por otra parte, las bacterias

autótrofas que catalizan la nitrificación y los procesos anammox son más proclives a la inhibición y toxicidad. La lista de compuestos que pueden ser tóxicos o inhibitorios para las bacterias nitrificantes y anammox es tan extensa que es necesario verificar la literatura especializada para cada caso o compuesto. A pesar del hecho de que las comunidades microbianas también pueden aclimatarse y adaptarse a condiciones subnormales, los efectos inhibitorios de ciertos compuestos pueden dar lugar a condiciones subóptimas para el desarrollo de algunos procesos e inclusive causar que fracase el bioproceso. Para evaluar el efecto inhibitorio en los procesos de nitrificación, desnitrificación o anammox de un determinado compuesto o de un agua residual en particular, puede realizarse una serie de ensayos de actividad como se describe en el presente capítulo. Comparar la actividad de los organismos sin y con la presencia de diferentes concentraciones del compuesto presuntamente inhibitorio puede permitir definir el potencial inhibitorio del compuesto en cuestión. De manera similar, cuando se sospecha que el agua residual utilizada para realizar el ensayo posee o puede generar un efecto inhibitorio en un bioproceso dado, deben realizarse dos ensayos de actividad en batch: uno con el lodo activado original y otro con la misma biomasa, pero lavada con solución mineral, para eliminar los compuestos potencialmente tóxicos o

inhibitorios. Sin embargo, debe destacarse que esta última experiencia es exitosa solamente si el efecto inhibitorio del agua residual sometida a estudio es (rápidamente) reversible.

#### 2.4.11.4 Efecto de la fuente de carbono sobre la desnitrificación

Es bien conocido que la velocidad de desnitrificación depende de la fuente o procedencia del carbono utilizado como donante de electrones (Mokhayeri *et al.*, 2006, 2008). Para un monitoreo regular del potencial de desnitrificación de un lodo activado, se emplea un medio sintético que contenga  $S_B$ . En este sentido los AGV son adecuados para permitir una evaluación satisfactoria de la actividad de desnitrificación (como se presentó en este capítulo). El empleo de fuentes más complejas de DQO, que indudablemente pueden estar presentes en las aguas residuales municipales crudas o pre-sedimentadas, puede dar lugar a una condición subnormal de actividad de desnitrificación. Cuando es necesario el empleo de una fuente externa de DQO para incrementar la remoción de nitrógeno (por ejemplo, en la post-desnitrificación), pueden utilizarse los métodos descritos en este capítulo para evaluar la incidencia de diferentes fuentes de DQO en la velocidad de desnitrificación de una muestra de lodo activado.



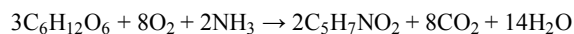
**Figura 2.4.15** Ejecución de un ensayo de actividad en batch. Observe el color rojizo típico del cultivo anammox enriquecido (foto: Lotti, 2015).



## 2.5 REMOCIÓN AEROBIA DE MATERIA ORGÁNICA

### 2.5.1 Descripción del proceso

En sistemas convencionales de tratamiento aerobio de aguas residuales para la remoción de compuestos orgánicos, los organismos heterótrofos ordinarios (OHOs) degradan esos compuestos, consumiendo oxígeno para la respiración y produciendo a su vez biomasa. Desde una perspectiva metabólica, el mecanismo de remoción involucra dos procesos: anabólico (para síntesis celular) y el catabólico (en el que se genera la energía necesaria para la síntesis celular). En el proceso anabólico los OHOs obtienen el carbono requerido para la síntesis celular de los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales. Mientras tanto, en el proceso catabólico ocurren reacciones de oxidación-reducción que involucran la transferencia de electrones desde la materia orgánica (que actúa como donante de electrones y por tanto se oxida), hacia el oxígeno (que es el último aceptor de electrones en el medio aerobio), produciendo la energía necesaria para la síntesis celular. Sin embargo, debido a que la materia orgánica es formada de una mezcla muy variada de compuestos orgánicos biodegradables y no-biodegradables, usualmente presentes en las aguas residuales, la DQO es comúnmente el parámetro empleado para estimar su concentración total. El uso de la DQO se prefiere sobre otros parámetros analíticos (como la demanda bioquímica de oxígeno: DBO<sub>5</sub> o el carbono orgánico total: COT), debido a sus numerosas ventajas. Éstas incluyen (Henze *et al.*, 1997; Henze y Comeau, 2008): (i) la determinación del equivalente de oxígeno (o capacidad para donar electrones) de compuestos orgánicos, (ii) es capaz de medir todos los compuestos orgánicos, degradables y no degradables, (iii) la posibilidad que brinda, para el balance de compuestos orgánicos, de agruparlos todos sobre una misma base de DQO (como consecuencia de las dos ventajas anteriores), además de implicaciones prácticas tales como (iv) rapidez en el análisis (a diferencia de la DBO<sub>5</sub> que necesita 5 días, la DQO se realiza en unas horas). En general la estequiometría realmente involucrada en la remoción aerobia no se puede conocer de una forma directa y precisa. Sin embargo, la siguiente ecuación de consumo aerobio de glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (donde se ignoran todos los nutrientes excepto el nitrógeno) suele utilizarse para ilustrar el proceso aerobio de remoción biológica (Metcalf y Eddy, 2003):



Ec. 2.5.1

Donde, C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> es una expresión simplificada (formula empírica) de las nuevas células generadas durante la degradación aerobia de los compuestos orgánicos (Hoover y Porges, 1952).

Desde la perspectiva del crecimiento microbiano, aproximadamente  $\frac{2}{3}$  de los compuestos orgánicos biodegradables (de acuerdo con el denominado rendimiento verdadero, Y<sub>OHO</sub>, de ~0.67 g DQO-biomasa por DQO consumido de materia orgánica) es convertido en nueva biomasa vía el proceso anabólico, y el  $\frac{1}{3}$  remanente es oxidado empleando oxígeno a través de una ruta catabólica para generar la energía necesaria para el crecimiento de biomasa (Marais y Ekama, 1976). Además, para la síntesis celular son necesarios macronutrientes (como nitrógeno y fósforo) y micronutrientes (tales como potasio, sodio, calcio, magnesio, zinc, hierro y manganeso, entre otros) (Metcalf y Eddy, 2003). La falta de alguno de estos elementos puede arrojar como resultado limitaciones en el proceso microbiano. Se acepta que los requerimientos de nitrógeno y fósforo para la biomasa producida son de aproximadamente 0.10 g N g SSV<sup>-1</sup> y 0.03 g P g SSV<sup>-1</sup>, respectivamente (Ekama y Wentzel, 2008a). Esto significa que si el agua residual contiene una concentración de 100 mg DQOB L<sup>-1</sup> (fracción biodegradable de la DQO), entonces las concentraciones de nitrógeno y fósforo que necesitan estar presente para obtener los requerimientos de nutrientes no deben ser menores a 4.7 mg N-NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> y 1.4 mg P-PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esto asume un rendimiento verdadero de Y<sub>OHO</sub> of 0.67, un rendimiento observado de 0.40 (considerando una edad del lodo cercana a los 5 días) y una relación DQO/SSV de la biomasa de 1.42 mg DQO mg SSV<sup>-1</sup> (llamado en ocasiones equivalente de oxígeno de la biomasa o sólidos suspendidos volátiles). Debido al intervalo en que se presentan los valores de Y<sub>OHO</sub> (ver Tabla 2.5.1), desde una perspectiva práctica y para evitar limitaciones en los nutrientes, se sugiere adoptar una relación DQO:N:P de 100:5:1 (Metcalf y Eddy, 2003).

Es importante destacar que no todos los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales pueden ser degradados. Siguiendo una clasificación básica que toma en cuenta las diferentes características físicas y grados de biodegradabilidad, que determinan el potencial para su remoción en un sistema de tratamiento biológico de

aguas residuales, un agua residual puede contener al menos cuatro fracciones orgánicas diferentes (Ekama y Wentzel, 2008a). Estas son (i) materia orgánica soluble biodegradable que es rápidamente convertida por los OHOs (y por tanto conocida como fracción orgánica rápidamente biodegradable, DQORB, o  $S_B$  de acuerdo a la notación estandarizada según Corominas *et al.*, 2010), (ii) compuestos orgánicos particulados biodegradables que mayoritariamente se encontrarán “atrapados” en los flóculos del lodo activado. Estos compuestos deben ser hidrolizados antes de poder ser biodegradados, y por eso se caracterizan comúnmente por su lenta degradación (conocidos como fracción lentamente biodegradable, DQOLB, o  $XC_B$  según Corominas *et al.*, 2010), (iii) orgánicos particulados no biodegradables, que serán “atrapados” en los flóculos del lodo y que se acumulan en el sistema de lodo activado, y (iv) orgánicos solubles no biodegradables, que ni pueden ser “atrapados” ni degradados, y que permanecen en la fase soluble.

La DQORB puede ser utilizada por los OHOs muy rápidamente. Aunque la hidrólisis biológica de la DQOLB es lenta, el tiempo de retención de sólidos (TRS) comúnmente aplicado en las plantas de lodo activado generalmente es mayor a 3-4 días, y en ese tiempo la fracción DQOLB virtualmente es totalmente utilizada. (Ekama y Wentzel 2008a). Entonces, los OHOs utilizan ambas fracciones biodegradables de DQORB y DQOLB para la síntesis celular, produciendo más biomasa. La nueva biomasa de OHOs generada por la remoción y conversión de las fracciones DQORB y DQOLB, así como las fracciones de DQO particulada no biodegradable que se acumulan en el sistema, conforman la masa orgánica del lodo activado en el reactor, medida usualmente como SSVLM. Debido a la capacidad de floculación del lodo activado, los sólidos suspendidos tienen cierta facilidad para la sedimentación, de manera tal que pueden ser separados fácilmente de la suspensión en un tanque de sedimentación secundario, proveyendo un efluente tratado clarificado. Una parte de la masa de lodo que sedimenta en el clarificador secundario es retornada al reactor biológico, mientras que eventualmente otra parte es removida del sistema vía el desecho o purga del exceso de lodo activado, en función del TRS de la instalación de tratamiento (Arden y Lockett, 1914). Sin embargo, como los compuestos orgánicos solubles no biodegradables no pueden ser removidos en el sistema de lodo activado, esta fracción sale de la instalación de tratamiento a través del efluente, contribuyendo a la concentración de DQO del efluente.

En sistemas de lodo activado en los que se realiza remoción biológica de nutrientes (RBN), parte de la

materia orgánica es removida en la fase aerobia, pero la mayoría de los compuestos orgánicos son removidos en la etapa anaerobia o anóxica que precede a la etapa aerobia. Por ejemplo, en la etapa anaerobia del sistema de lodo activado conocido como EBPR, los AGV son consumidos por los PAOs, mientras que en la etapa anóxica de una planta de RBN los orgánicos biodegradables son consumidos por los organismos desnitrificantes con propósitos de desnitrificación, utilizando nitrato o nitrito como aceptor de electrones (ver subcapítulos precedentes). Adicionalmente, la potencial ocurrencia de procesos de reducción de sulfato por las SRBs, en las etapas anaerobias de un lodo activado, también contribuye a la remoción de orgánicos. Por otra parte, la remoción de compuestos orgánicos también puede tener lugar en sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales (por ejemplo, en reactores de manto de lodos de flujo ascendente UASB), bajo condiciones totalmente anaerobias y por organismos estrictamente anaerobios.

Como se observa, la remoción de compuestos orgánicos puede ocurrir bajo diferentes condiciones ambientales y por diferentes grupos de microorganismos. La presente sección enfoca su atención en los ensayos de actividad en batch para la evaluación de la remoción aerobia de compuestos orgánicos, realizada principalmente por OHOs, en sistemas de lodo activado convencional bajo condiciones aerobias estrictas. La evaluación de la actividad de otros procesos se presenta en otras secciones de este capítulo y de los siguientes.

Esta sección puede ser usada como guía para la ejecución de ensayos de actividad aerobia en batch para la determinación de las velocidades de remoción de DQORB en lodos activados y en otros sistemas de tratamiento de biomasa en suspensión. La sección no incluye la remoción de la fracción de DQOLB debido a que su determinación requiere de la realización de los ensayos respirométricos descritos en el Capítulo 3. Sin embargo, e independientemente de que sea esencial la identificación de las fracciones en que se presenta la DQO, así como el N y P, este capítulo no trata acerca de la caracterización de las aguas residuales. Para este último propósito puede acudir a reportes técnicos y científicos que han sido publicados anteriormente (Henze, 1992; Kappeler y Gujer, 1992; Wentzel *et al.*, 1995; Hulsbeek *et al.*, 2002; Roeleveld y van Loosdrecht, 2002; Vanrolleghem *et al.*, 2003; WERF, 2003; Langergraber *et al.*, 2004).

Es importante hacer notar que algunos protocolos de caracterización y fraccionamiento de las aguas

residuales, así como la determinación de rendimiento de biomasa empleando compuestos orgánicos de diferentes aguas residuales, también necesitan la ejecución de ensayos respirométricos (Capítulo 3).

## 2.5.2 Montaje experimental

### 2.5.2.1 Reactores

Para evaluar la actividad de remoción aerobia de compuestos orgánicos por sistemas de lodo activado, es necesario realizar ensayos en batch bajo condiciones aerobias, garantizando la disponibilidad de suficiente OD (manteniendo una concentración de OD mayor de 2 mg L<sup>-1</sup>) y buenas condiciones de mezclado. Como para otros procesos, es también importante mantener en el reactor, un adecuado control de temperatura y pH, así como disponer de puertos para coleccionar muestras, adicionar el afluente y otras soluciones, así como facilitar la entrada y salida de gases. En general, se necesitan reactores con facilidades y características similares a los empleados para la ejecución de ensayos de actividad en batch de procesos EBPR (ver la Sección 2.2.2.1). Son válidas las recomendaciones dadas en la Sección 2.2.2.1 relacionadas con la aireación, agitación y mezclado, control de pH, la ubicación y las características de los puertos de dosificación y de toma de muestras.

### 2.5.2.2 Recolección de la muestra de lodo activado

Para la realización de ensayos de actividad en batch para la remoción de compuestos orgánicos, debe coleccionarse una muestra fresca de lodo a la salida del tanque de aireación o al final de la fase aerobia, lo anterior desde un punto de muestreo donde existan buenas condiciones de mezclado. Idealmente, el ensayo de actividad en batch deberá realizarse con prontitud una vez que se haya recolectado la muestra (dentro de las 2-3 h siguientes). Si cuando se extraiga la muestra de lodo no se puede realizar el ensayo de actividad el mismo día, la muestra debe ser guardada a una temperatura cercana a 4 °C. En todo caso, es obvio que es preferible la realización del ensayo *in situ*. El volumen total de lodo activado a recoleccionar depende del número (repetición) de ensayos, volumen del reactor y el volumen total de las muestras que sea necesario recoleccionar para evaluar la actividad de la biomasa. Frecuentemente pueden ser suficientes, entre 10 y 20 L de lodo activado (para cada ensayo batch) tomados de plantas reales. Por otra parte, el volumen de muestra de lodo activado extraída de un reactor a escala de laboratorio pocas veces sobrepasa 1 L, debido a que los reactores de esa escala son generalmente pequeños (0.5 -

2.4 L, en algunos casos hasta de 8-10 L, y excepcionalmente alcanzan los 15 L). El máximo volumen de lodo activado que puede tomarse de un reactor a escala de laboratorio está limitado por el volumen de extracción necesario para mantener el tiempo medio de residencia celular (TRMC) (también conocido como edad del lodo), y consecuentemente está definido por la velocidad de crecimiento del organismo de interés.

### 2.5.2.3 Preparación de la muestra de lodo activado

Para ensayos de actividad en batch realizados *in situ*, el lodo debe ser transferido desde el reactor madre (en caso de un lodo enriquecido a escala de laboratorio), o del tanque de reacción (cuando se trata de una planta piloto o planta a escala real), al reactor o fermentador donde se realizará el ensayo de actividad. Entonces, el lodo transferido debe airearse al menos durante 1-2 h para remover cualquier cantidad residual de DQO degradable presente en el sistema. Mientras tanto, también se ajusta la temperatura y el pH a los valores deseados (como se describe en la Sección 2.2.3.5). Otra manera de eliminar el exceso de DQO es “lavando el lodo” (empleando el medio para lavado), siguiendo los procedimientos descritos en las Secciones 2.2.3.3 y 2.2.3.5, respectivamente.

Si el ensayo de actividad es solamente sobre la remoción aerobia de compuestos orgánicos (es decir, cuando no interesa el ensayo de nitrificación), entonces se puede adicionar al lodo un inhibidor de la nitrificación inmediatamente después que es transferido al reactor del ensayo (se recomienda la adición de allyl-N-thiourea a una concentración final de ATU de 20 mg L<sup>-1</sup> en el reactor). El ATU restringe la nitrificación evitando su alta contribución al consumo de oxígeno, lo que es útil en el caso de que, de manera paralela, se lleven a cabo ensayos de respirometría (ver Capítulo 3). Las muestras de lodo almacenadas en condiciones de baja temperatura también pueden ser lavadas con una solución mineral para eliminar el exceso de cualquier orgánico remanente.

Las muestras de lodo almacenadas bajo condiciones de baja temperatura (alrededor de 4 °C) que serán utilizadas para realizar ensayos necesitan ser “reactivadas” debido a que las bajas temperaturas disminuyen el metabolismo celular. El lodo activado debe reactivarse mediante aireación durante 1-2 h al pH y temperatura seleccionados para el ensayo.

### 2.5.2.4 Medio

Cuando para la realización de los ensayos de actividad se utiliza agua residual real (cruda o sedimentada), ésta se puede alimentar directamente al reactor de ensayo. Para condiciones normales o regulares, la etapa de alimentación tiene lugar al inicio del ensayo. En caso que se necesite, el residual crudo puede ser filtrado (empleando tamices con mallas de 1 o 2 mm), o sedimentarse (durante 1 a 3 h). Si se necesita realizar el ensayo de actividad a diferentes concentraciones de sólidos, (i) puede recolectarse efluente de la planta y utilizarse para dilución (asumiendo que la concentración de sólidos en el efluente sea considerablemente bajo, esto es, 20–30 mg SST L<sup>-1</sup>), o (ii) el lodo activado puede ser concentrado mediante decantación y descargando el sobrenadante en varias repeticiones hasta alcanzar la concentración de SSLM deseada.

Si se necesitan utilizar varias fuentes y concentraciones de carbono, el efluente de la planta puede ser utilizado también para preparar un medio semi-sintético (siempre y cuando no contenga compuestos tóxicos o inhibitorios). A éste se añadirá la concentración de DQORB de interés, de manera tal que después de una dilución 1:1 en el reactor, se obtenga la concentración inicial de DQO deseada. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y objetivo del ensayo, la concentración inicial de carbono del medio sintético puede variar y debe ser ajustada proporcionalmente a la duración del ensayo. Usualmente concentraciones de 400 mg DQO L<sup>-1</sup> pueden emplearse para lodos activados, tanto a escala de laboratorio como de una planta a escala real. Cuando se use un medio sintético, además de la fuente de carbono, el medio debe contener macro y micro-nutrientes. Para un agua residual que posea una concentración de DQO de 400 mg L<sup>-1</sup> aproximadamente, puede sugerirse la siguiente formulación de macro- y micro-elementos por litro de solución de medio (Smolders *et al.*, 1994a): 862 mg NaAc·3H<sub>2</sub>O (400 mg DQO); 107 mg NH<sub>4</sub>Cl (28 mg N); 40 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (8 mg P); 90 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 14 mg CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 36 mg KCl; 1 mg de extracto de levadura y 0.3 mL de una solución de elementos traza (que incluye por litro: 10 g EDTA; 1.5 g FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.15 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0.03 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0.12 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0.06 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0.12 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.18 g KI y 0.15 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O). Si se desea, el agua residual sintética concentrarse y tener una DQO mayor (para llevar a cabo potenciales diluciones posteriores), ser esterilizada en autoclave (durante 1 h a 110 °C) y utilizada como solución patrón o madre en caso

que se pretendan realizar varios ensayos. Sin embargo, la solución debe desecharse si se observa la formación de precipitados o si pierde transparencia.

Para los ensayos realizados con cultivos enriquecidos en el laboratorio, es preferible realizarlos con la misma agua residual sintética empleada en el cultivo con la concentración de carbono del ensayo, a menos que se requiera de otra forma. Alternativamente, y de manera similar para muestras de plantas a escala real, el efluente del reactor puede recolectarse, filtrarse mediante un medio (de poro amplio) para remover partículas gruesas, y ser utilizado para la preparación de medio.

### 2.5.2.5 Pruebas analíticas

La mayoría de las pruebas analíticas requeridas (para la determinación de DQO, P total, PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, SST, SSV, etc.) pueden realizarse siguiendo los métodos estandarizados y comúnmente aplicados, cuyos protocolos son detallados en el Standard Methods (APHA *et al.*, 2012). Para la determinación de parámetros solubles como DQO, PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>, las muestras deben ser filtradas, inmediatamente después de su recolección, a través de un filtro de 0.45 µm. De los dos métodos de determinación de la DQO más comúnmente utilizados, se recomienda el del dicromato, ya que con el permanganato no es posible oxidar todos los compuestos orgánicos (Henze y Comeau, 2008). La determinación de AGV (como el acetato, propionato y otros ácidos grasos volátiles) puede realizarse mediante cromatografía de gases. La glucosa y otros compuestos de carbono (incluyendo AGV) pueden determinarse por cromatografía líquida a alta presión (HPLC por sus siglas en inglés, *High Pressure Liquid Chromatography*).

### 2.5.2.6 Parámetros de interés

Para determinar y evaluar la actividad de los OHOs es posible estimar diferentes relaciones estequiométricas y velocidades del proceso, tal como se muestra en la Tabla 2.5.1.

Debe destacarse que un coeficiente de Arrhenius para la temperatura, de entre 1.060 y 1.123 (con un valor típico de 1.070), fue el sugerido para describir la velocidad de remoción aerobia de los compuestos orgánicos (Metcalf y Eddy, 2003).

**Tabla 2.5.1** Parámetros estequiométricos y cinéticos de interés, reportados por varios autores, para sistemas aerobios de lodos activados para la eliminación de compuestos orgánicos.

Parámetro	Observaciones y comentarios	Referencia
<b>Parámetros estequiométricos aerobios <math>Y_{OHO}</math> (g DQO-biomasa <math>g^{-1}</math> DQO-sustrato)</b>		
0.67	Relación teórica	Ekama y Wentzel (2008a)
0.72	Acetato como fuente de carbono	Dircks <i>et al.</i> (1999)
0.37	Metanol como fuente de carbono	McCarty (2007)
0.65	Ácido fórmico como fuente de carbono	McCarty (2007)
0.40-0.80; típicamente 0.60	g SSV g DBO <sup>-1</sup>	Metcalf y Eddy (2003)
0.30-0.60	g SSV g DQORB <sup>-1</sup>	Metcalf y Eddy (2003)
0.67-0.792*	Diversas fuentes de materia orgánica (DQORB)	Guisasola (2005)
0.91*	Glucosa como fuente de carbono	Dircks <i>et al.</i> (1999)
0.90*	Glucosa como fuente de carbono	Goel <i>et al.</i> (1999)
<b>Parámetro cinético aerobio <math>q_{OHO,COD,OX}</math> (g DQO-sustrato g DQO-biomasa<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)</b>		
6	Modelo ASM2d	Henze <i>et al.</i> (1999)
2-10, típicamente 5	g DQORB g SSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	Metcalf y Eddy (2003)
3 – 10		Kappeler y Gujer (1992)

\* Estos valores desvían considerablemente del rendimiento teórico (0.67 gDQO gDQO<sup>-1</sup>) debido a que ocurren procesos de almacenamiento de sustrato en la biomasa.

Como se aprecia en la Tabla 2.5.1, la estequiometría teórica de rendimiento de biomasa sobre los orgánicos degradables es 0.67 g DQO g DQO<sup>-1</sup> (Metcalf y Eddy, 2003; Ekama y Wentzel, 2008a). Sin embargo, es común observar valores mayores de esta relación estequiométrica que aparentemente alcanzan hasta 0.90-0.91 g DQO g DQO<sup>-1</sup> (Dircks *et al.*, 1999; Goel *et al.*, 1999). Si ese fuese el caso, es importante mencionar que que valores superiores a 0.67 g DQO g DQO<sup>-1</sup> pueden ser causados por la acumulación directa de los compuestos orgánicos biodegradables más que por un alto rendimiento de crecimiento de la biomasa. Tales procesos pueden ocurrir cuando la forma DQORB ( $S_B$ ) predomina en la materia orgánica de plantas diseñadas con selectores. Más detalles sobre esto pueden ser hallados en la literatura (Gujer *et al.*, 1993; Henze *et al.*, 2008). Con respecto a las tasas cinéticas aerobias relacionadas con la remoción de compuestos orgánicos, los valores reportados en la literatura pueden variar ampliamente desde 3 hasta 10 g DQO-sustrato g DQO-biomasa<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. La principal razón para que se presenten estas diferencias puede estar asociado a la concentración neta de biomasa activa presente en el sistema (con respecto a la concentración total de SSVLM). TRS pequeños (menores a 3 días) suelen producir una alta fracción de biomasa activa con respecto a los SSV presentes en el sistema, lo que puede verse reflejada en una alta velocidad de remoción de los compuestos orgánicos. Sin embargo, TRS muy altos (de más de 20 días como los usados en sistemas de aireación avanzada, por ejemplo) darán lugar a una mayor acumulación de

SSV no degradables procedentes del afluente o producidos por la respiración endógena de los OHOs (también medidos en los SSVLM). Los SSV no degradables se acumulan y contribuyen a la concentración de SSVLM del lodo, dando lugar a una menor velocidad específica de remoción de DQO,  $q_{OHO,COD,OX}$ . Los valores más altos de  $q_{OHO,COD,OX}$  (de hasta 10 g DQO-sustrato g DQO-biomasa<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) pueden observarse en sistemas con bajas edades de lodo, que tienden a contener relativamente altas concentraciones de biomasa OHO.

## 2.5.3 Ensayos de actividad aerobia de materia orgánica: preparativos

### 2.5.3.1 Equipos

Para la realización de ensayos de actividad aerobia de compuestos orgánicos en batch se necesita el siguiente equipamiento:

1. Reactor con sistema de agitación y mezcla, con puertos adecuados para tomar muestras (tal como se describe en la Sección 2.5.2.1).
2. Suministro de oxígeno (aire comprimido u oxígeno puro).
3. Electrodo de pH (si no está incluido entre las capacidades del reactor).
4. Controlador de pH de 2 vías para la adición de HCl y NaOH (como alternativa puede utilizarse un control



de una vía, generalmente para la adición de HCl o puede realizarse manualmente durante todo el ensayo, adicionando HCl y NaOH).

5. Termómetro (con un intervalo de temperatura entre 0 a 40 °C).
6. Sistema de control de temperatura (si no está incluido en las facilidades del reactor).
7. Medidor de oxígeno disuelto con electrodo (si no está incluido en las facilidades del reactor).
8. Controlador automático de 2 vías para suministrar nitrógeno y oxígeno (si no está incluido en las facilidades del reactor y el ensayo debe realizarse a una concentración definida de OD).
9. Centrífuga con capacidad de trabajo de al menos 250 mL para el lavado del lodo (de ser requerido el lavado)
10. Cronómetro

Compruebe que los electrodos y medidores (pH, temperatura y OD) han sido calibrados dentro de las 24 h anteriores a la realización del ensayo de actividad en batch, de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes y/o proveedores.

### 2.5.3.2 Materiales

1. Dos cilindros graduados (probetas) de 1 o 2 L (dependiendo del volumen de lodo empleado), para contener el lodo activado y lavarlo si fuese necesario.
2. Al menos 2 jeringas plásticas (preferiblemente de 20 mL o al menos de 10 mL) para la colección y determinación de compuestos solubles (después de filtrado).
3. Al menos 3 jeringas plásticas (preferiblemente de 20 mL) para recolectar sólidos, y para el análisis de fracciones particuladas o compuestos intracelulares (sin filtrar).
4. Filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Preferiblemente que no sea de acetato de celulosa debido a que ese material desprende ciertas trazas de celulosa o acetato que pudiesen ser transferidos a la muestra de agua. Considere tener doble cantidad de filtros en comparación con el número de muestras que requieren ser filtradas para la determinación de compuestos solubles.
5. Vasos de 10 o 20 mL en plástico transparente para recolectar muestras de líquido filtrado para la determinación de compuestos solubles (DQO, amonio, ortofosfato, por ejemplo).
6. Vasos en plástico transparente de 10 o 20 mL para recolectar muestras para la determinación de sólidos suspendidos en el licor mezclado y sólidos

suspendidos volátiles (SSLM y SSVLM, respectivamente). Estas muestras se toman por triplicado debido a la variabilidad en la técnica analítica.

7. Una hielera o caja de “hielo seco” llena de hielo con capacidad suficiente para almacenar temporalmente (durante 1-2 h después de concluir el ensayo de actividad) los vasos plásticos y tubos de centrifugación, una vez recolectadas las muestras.
8. Guantes de goma y espejuelos de seguridad.
9. Pipetas tipo Pasteur o pipetas plásticas para adición de HCl y/o NaOH (cuando se lleva a cabo el control manual de pH).
10. Presillas metálicas de laboratorio o abrazaderas, para cerrar las mangueras usadas como puertos de muestreo en el reactor cuando no se están tomando muestras.

### 2.5.3.3 Soluciones de trabajo

- **Agua residual real**

Si se utiliza un agua residual real para llevar a cabo el ensayo de actividad en batch, la muestra de agua residual debe recolectarse en el afluente de la planta de tratamiento y realizar el ensayo de actividad tan pronto como sea posible después de la recolección. Si debido a las condiciones del lugar o a la distancia, el ensayo no puede realizarse dentro de las 2 h posteriores a la toma de la muestra, entonces la misma debe conservarse en frío hasta que se ejecute el ensayo (por ejemplo, colocando la cubeta o garrafón que contiene la muestra en refrigeración a 4 °C). Sin embargo, antes del ensayo, debe ajustarse la temperatura del agua residual hasta la temperatura a la que se realizará el ensayo de actividad en batch (preferiblemente alcanzada en menos de 1 h). Para el propósito anterior, pueden utilizarse un baño de agua o un cuarto con control de temperatura.

- **Sustrato o medio sintético**

Si para realizar el ensayo se desea utilizar un medio sintético (agua residual sintética), entonces el medio debe contener una mezcla de carbono y macro/micro-nutrientes. Generalmente todos ellos pueden mezclarse en el mismo medio en la medida que no se observe precipitación. Usualmente la composición y concentración es:

- a. Solución fuente de carbono: esta debe estar compuesta por una fuente de DQORB como los AGV (tales como acetato y propionato), o glucosa, dependiendo de la naturaleza y objetivo del ensayo, y de la investigación de que se trate.

La concentración de DQO inicial recomendada es de alrededor de  $400 \text{ mg L}^{-1}$  tanto para muestras de lodo procedentes de laboratorio como de plantas a escala real.

- b. Solución de nutrientes: esta debe contener todos los macro-nutrientes requeridos (amonio, fósforo, magnesio, sulfato, calcio, potasio) y micro-nutrientes (hierro, boro, cobre, manganeso, molibdato, zinc, yodo, cobalto) para asegurar que las células no se vean limitadas por su ausencia y evitar obtener resultados erróneos, y en caso extremo, que falle el ensayo. Así, aunque sus concentraciones puedan parecer triviales, se recomienda asegurarse que todos los constituyentes sean añadidos en las cantidades necesarias. La siguiente composición de nutrientes es recomendada para afluentes con una DQO de hasta  $400 \text{ mg L}^{-1}$  (según Smolders *et al.*, 1994a) por litro: 107 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (28 mg N); 90 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 40 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (8 mg P); 14 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 36 mg KCl; 1 mg de extracto de levadura y 0.3 mL de solución de elementos traza (que incluye, por litro: 10 g EDTA; 1.5 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.15 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.03 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.12 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.06 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.12 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.18 g KI y 0.15 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Otras soluciones de nutrientes pueden ser empleadas en la medida que contengan todos los nutrientes y las cantidades mínimas necesarias.
- c. Medio para lavar: En el caso de que la muestra de lodo tenga que ser lavada para remover cualquier DQO residual o eliminar cualquier compuesto indeseable (que puede ser eventualmente tóxico o inhibitorio), debe prepararse una solución para ello. Para lavar el lodo puede utilizarse la siguiente solución de nutrientes (por litro) (Smolders *et al.*, 1994a): 107 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 40 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 90 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 14 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 36 mg KCl; 1 mg de extracto de levadura y 0.3 mL de solución de elementos traza (que incluye por litro: 10 g EDTA; 1.5 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.15 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0.03 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.12 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.06 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.12 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.18 g KI y 0.15 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). El proceso de lavado puede repetirse dos o tres veces.
- d. Solución de ATU: Para inhibir la nitrificación puede prepararse una solución de ATU para alcanzar una concentración inicial efectiva cercana a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  en el reactor. La solución de ATU se agrega antes que el lodo sea expuesto a

cualquier condición aerobia (incluyendo la preparación de la muestra de lodo o su adaptación).

- e. Soluciones de ácido y base: se preparan volúmenes de 100-250 mL de HCl 0.2 M y 100-250 mL de NaOH 0.2 M para control automático o manual del pH.

Finalmente, también deben prepararse las soluciones de trabajo para llevar a cabo la determinación de los parámetros de interés. Estas soluciones se deben preparar de acuerdo con los métodos estandarizados y sus correspondientes protocolos.

### 2.5.3.4 Preparación de materiales

1. Seleccione los materiales necesarios para ejecutar el ensayo de actividad en batch y defina el número de muestras que serán recolectadas siguiendo las etapas presentadas en la Sección 2.2.3.4.
2. Determine la frecuencia de la toma de muestras: para estimar la velocidad máxima de remoción de DQORB, las muestras deben ser recolectadas cada 5 min durante los primeros 30-40 min del ensayo de actividad.
3. Tome una primera serie de muestras antes de añadir cualquier medio, para mejorar la confiabilidad de los datos y establecer las condiciones iniciales del lodo.
4. Defina cuidadosamente los valores máximo y mínimo del volumen de trabajo del reactor, de acuerdo a las sugerencias dadas en la Sección 2.2.3.4.
5. Una vez definidos el número y frecuencia de las muestras, etiquete los vasos de plástico. Establezca la nomenclatura y abreviaturas para una rápida identificación y reconocimiento del ensayo, hora de la muestra y parámetros a determinar con esa muestra.
6. La Tabla 2.5.2 contiene un ejemplo de hoja de trabajo para ejecutar y dar seguimiento a la recolección o toma de muestra. Además puede utilizarse para guardar una base de datos de los diferentes ensayos en batch realizados.
7. Organice todo el material necesario en un área cercana donde está montado el reactor, de manera tal que se eviten demoras en el manejo y en la preparación de muestras.
8. Calibre todos los medidores (pH, OD y termómetro) dentro de las 24 h previas a la realización del ensayo. En periodo de espera, guardar las sondas en las soluciones apropiadas, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante o proveedor, hasta el

momento de realizar el ensayo. También confirme que las lecturas son confiables.

9. Almacene y preserve las muestras apropiadamente hasta que vayan a ser analizadas. La Tabla 2.2.2 brinda recomendaciones para la preservación, dependiendo de la determinación analítica a realizar.

### 2.5.3.5 Preparación del lodo activado

Estos procedimientos consideran que los ensayos de actividad en batch pueden realizarse tan pronto como sea posible, una vez recolectada la muestra de lodo de un sistema a escala de laboratorio o escala real, o en el peor de los casos, dentro de las 24 h posteriores a la recolección de la muestra. Idealmente, no se recomienda realizar el ensayo de actividad si han transcurrido 24 h después de la toma de muestra debido a los cambios potenciales y muerte de los microorganismos. Teniendo esto en cuenta, se recomienda el siguiente procedimiento para preparar la muestra de lodo activado para los ensayos de actividad en batch:

1. Si el ensayo de actividad puede iniciarse en menos de 1 h después de haber tomada la muestra de lodo y el lodo no necesita ser lavado:
  - a. Fijar la temperatura del reactor a la deseada para el estudio.
  - b. Tome la muestra de lodo al final de la etapa aerobia de la planta o del reactor madre.
  - c. Transfiera la muestra de lodo al reactor de ensayo.
  - d. Adicione solución de ATU para inhibir la nitrificación (particularmente si se va a realizar una prueba respirométrica) a una concentración final efectiva de 20 mg L<sup>-1</sup> en el reactor (ver la Sección 2.5.3.3).
  - e. Inicie la agitación (100-300 rpm) y monitoree los valores de temperatura y pH de la muestra, colocando un termómetro en el interior del reactor (si el reactor no tiene uno integrado al sistema), hasta que el lodo alcance los valores a los que se realizará el ensayo.
  - f. Inicie la aireación de la muestra de lodo manteniendo una concentración de OD mayor que 2 mg L<sup>-1</sup>.
  - g. Inicie el ensayo de actividad en batch una vez que el pH y el OD sean estables.
2. Si se hace necesario lavar la muestra de lodo, siga las etapas descritas en la Sección 2.2.3.5 (para ensayos iniciados ya sea dentro de menos de 1h o menos de 24 h después de haber tomada la muestra). Para el lavado, utilice el medio descrito en la Sección 2.5.3.3.

## 2.5.4 Ensayos de actividad aerobia de materia orgánica en batch: ejecución

De manera similar a los ensayos anteriores, previo a los ensayos, debe prepararse un plan de implementación del experimento similar al presentado en la Tabla 2.5.2. Esto facilita la ejecución, el seguimiento del ensayo, así como el registro y archivo de los datos del ensayo. Los ensayos de actividad aerobia de remoción de compuestos orgánicos se realizan para evaluar la remoción de DQORB en sistemas de lodo activado. Pueden ejecutarse con lodo procedente de sistemas de laboratorio o de plantas a escala real, empleando agua residual sintética o real. La muestra de lodo debe recolectarse al final de la etapa aerobia para que no exista DQORB residual en ella. Se proponen las siguientes etapas para la realización del ensayo:

### Ensayo OH0.AER.1. Ensayo aerobio sencillo de remoción de compuestos orgánicos

- a. Una vez que el lodo ha sido recolectado, preparado y transferido al reactor en el que se realizará el ensayo en batch (ver Sección 2.5.3.5), se mantiene la muestra aireada durante al menos 30 min, mientras se confirma que el pH y la temperatura alcanzaron de forma estable los niveles fijados para el ensayo. De otra manera, deben reajustarse los valores de ajuste o consigna (si existe control automático) o realizar una corrección manual, y se debe esperar hasta que se alcancen condiciones estables.
- b. Verifique que la concentración de OD sea mayor que 2 mg L<sup>-1</sup>.
- c. Haga el seguimiento de la ejecución y del tiempo de muestreo con el cronómetro.
- d. Una vez que se hayan establecido condiciones estables (alrededor de 20 min), prepárese a tomar las primeras muestras de lodo del reactor batch para determinar las concentraciones iniciales de los parámetros de interés: DQO, NH<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub>, SSLM y SSVLM. Para lo anterior, tome las muestras con la jeringa, conectándola al puerto de muestreo y abriendo la presilla metálica en su caso. Cargue y descargue la jeringa varias veces a través del puerto del reactor (usualmente 5 veces), para homogenizar el contenido, y luego tome la muestra. Cierre la presilla del puerto en su caso y retire la jeringa llena.
- e. Filtre inmediatamente las sub-muestras que se utilizarán para determinar la concentración de parámetros solubles: DQO, NH<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub> (a través de filtros de 0.45 µm). Las otras sub-muestras para análisis de sólidos (SSLM y SSVLM, por ejemplo)

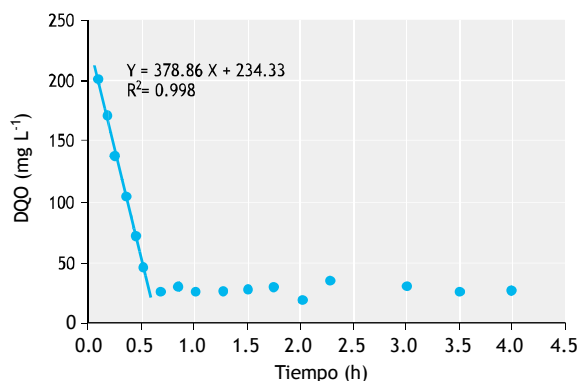
necesitan ser preparadas de acuerdo a los protocolos correspondientes.

- f. Guarde las muestras temporalmente a 4 °C antes y durante la ejecución de los ensayos.
- g. Inicie la realización del ensayo aerobio en el tiempo “cero”, con la adición del agua residual (sintética o real) que contenga la fuente de carbono.
- h. Adicione el agua residual afluyente (sintética o real), hasta alcanzar una relación inicial DQORB/SSVLM en el reactor de alrededor de 0.10 mg DQO mg SSV<sup>-1</sup>. Por ejemplo, las concentraciones iniciales de DQORB y SSVLM después de mezclar pueden estar alrededor de 400 mg DQO L<sup>-1</sup> para el sustrato y 4000 mg SSV L<sup>-1</sup> de biomasa. Relaciones menores o mayores también son aceptables, en la medida que haya suficiente tiempo de muestreo.
- i. Verifique que después de la adición del agua residual la lectura de OD de la suspensión sea superior a 2 mg L<sup>-1</sup> y que no existan variaciones considerables de temperatura y pH (no mayor de 1 °C o ± 0.1 respectivamente).
- j. Duración y muestreo:
  - (i) Normalmente el ensayo puede durar entre 2-4 h para una concentración inicial de DQO soluble de hasta 400 mgL<sup>-1</sup> (a pH 7 y 20°C).
  - (ii) Para determinar los parámetros cinéticos aerobios, las muestras de DQO soluble deben recolectarse cada 5 min durante los primeros 30-40 min de ejecución del ensayo. Después de este período la frecuencia de muestreo se reduce a 10 o 15 min durante la primera hora y más tarde cada 15-30 min hasta que el ensayo termine.
- k. Concluya el ensayo aerobio con la toma de muestras para la determinación de las concentraciones finales de los parámetros solubles (DQO, NH<sub>4</sub> y PO<sub>4</sub>) y las de SSM y SSVLM.
- l. Organice las muestras y asegure que están completas y adecuadamente etiquetadas, para de esa manera evitar errores.
- m. Preserve y guarde las muestras, de acuerdo a las recomendaciones de los procedimientos analíticos, hasta que vayan a ser analizadas.
- n. Limpie todo el material y equipamiento utilizado y que los sensores queden debidamente protegidos.
- o. Preserve parte del lodo empleado en el ensayo para alguna comprobación posterior o identificación de microorganismos que pueda requerirse (ver Capítulos 7 y 8).

## 2.5.5 Análisis de datos

El rendimiento de crecimiento aerobio ( $Y_{OHO}$ ) de la biomasa sobre la DQO es el principal parámetro estequiométrico de interés para los OHOs (Tabla 2.5.1). Sin embargo, el ensayo de actividad en batch presentado en esta sección no puede ser usado en la determinación de  $Y_{OHO}$ . Eso se debe a que en general, para determinar  $Y_{OHO}$ , es necesario realizar ensayos respirométricos en paralelo al ensayo aerobio para estimar la cantidad de DQO que está siendo utilizada para la generación de energía. Ejemplos de tal determinación pueden encontrarse en otras fuentes (Wentzel *et al.*, 1995; Dircks *et al.*, 1999; Goel *et al.*, 1999; Guisasola *et al.*, 2005).

Por el contrario, el ensayo aerobio de actividad en batch presentado en este sub-capítulo permite hallar la velocidad máxima específica de remoción de DQORB ( $q_{OHO,COD,OX}$ ). Este parámetro se obtiene al graficar los datos experimentales de DQO (eje Y) en función del tiempo (eje X) y ajustando el perfil obtenido mediante regresión lineal. Debido a que el parámetro de interés es el valor máximo de la velocidad, el ajuste lineal se hace con los primeros 4-5 datos experimentales, siendo aceptable cuando el coeficiente de determinación  $R^2$  es superior a 0.90-0.95. Esta es la razón por la que la frecuencia de muestreo propuesta es de 5 min durante los primeros 30-40 min del ensayo. De la pendiente de la ecuación de regresión, se obtiene la velocidad volumétrica máxima, usualmente reportada en mg DQO L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> o bien en g DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. En la Figura 2.5.1 se ilustra la estimación de la velocidad de remoción aerobia máxima para un cultivo de OHO. La tasa cinética del proceso puede expresarse como velocidad específica máxima, dividiendo la velocidad volumétrica máxima (o valor de la pendiente), por la concentración de SSV del lodo activado. Es importante resaltar que la velocidad específica máxima de crecimiento de la biomasa no puede calcularse de manera directa a través de un seguimiento de los datos de incremento de la concentración de biomasa en el reactor batch; en este tipo de ensayo, dicho incremento es prácticamente despreciable, siendo del mismo orden de magnitud que el error estándar de la determinación de los SSVLM. Para ello, se necesitan ensayos batch de una mayor duración, o combinar el ensayo con pruebas respirométricas (Capítulo 3) (Kappeler y Gujer, 1992; Wentzel *et al.*, 1995).



**Figura 2.5.1** Ejemplo de determinación de la velocidad volumétrica máxima de remoción aerobia de materia orgánica (expresada en mg DQO L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) a partir de un ensayo aerobio de actividad en batch.

## 2.5.6 Ejemplo

### 2.5.6.1 Descripción

Como ejemplo, en esta sección se presentan los datos obtenidos de un ensayo aerobio de actividad en batch de OHOs, mismo que fue realizado a 15 °C con un lodo extraído de una planta a escala real. El Ensayo OHO.AER.1 fue llevado a cabo para determinar la velocidad de remoción aerobia de DQORB por los OHOs. El ensayo de actividad en batch fue realizado usando un reactor de 3.0 L. Todo el equipamiento, así como los materiales y aparatos fueron preparados tal como se describe en la Sección 2.5.3. Los sensores de pH y de OD fueron calibrados dentro de las 24 h anteriores al ensayo. El ensayo de actividad duró 4 h. Antes del ensayo se tomaron 1.25 L de lodo activado fresco al final del tanque de aireación de una planta a escala real, que fue transferido al reactor batch y adaptado durante 1 h a 15 °C con agitación lenta (100 rpm) a pH 7.0, siguiendo las recomendaciones descritas en la Sección 2.5.3.5. La preparación del lodo activado para el ensayo se realizó dentro de la primera hora de haber tomado la muestra. Posteriormente, 20 min antes de empezar el ensayo, la agitación fue incrementada a 300 rpm y se tomaron muestras para la determinación de parámetros iniciales de interés (de acuerdo con el protocolo de ejecución del Ensayo OHO.AER.1). El ensayo se inició con la adición de 1.25 L de medio sintético conteniendo 400 mg DQO L<sup>-1</sup> (como acetato). En el medio sintético fueron incluidos macro y micro-nutrientes, además de 20 mg L<sup>-1</sup> ATU, según lo descrito en la Sección 2.5.3.3. Como el ensayo se realizó a 15 °C, fue necesario ajustar la temperatura del medio sintético a ese mismo valor, antes de su adición al reactor. Se recolectaron muestras cada 5 min durante los primeros 30 min de la prueba. Inmediatamente

después de la recolección de cada muestra, cada una de ellas fue preparada y preservada como se describe en la Sección 2.5.3.4. Todas las muestras recolectadas se analizaron según fue expuesto en la Sección 2.5.2.4. La Tabla 2.5.2 muestra el plan de implementación del ensayo.

### 2.5.6.2 Análisis de datos

De acuerdo con los resultados del ensayo de actividad en batch resumidos en la Tabla 2.5.2, en la Figura 2.5.2 se muestra la estimación de la tasa cinética (velocidad) volumétrica máxima de remoción de materia orgánica de OHO, aplicando regresión lineal.

Basado en la velocidad volumétrica máxima de remoción de DQO mostrada en la Figura 2.5.2, y teniendo en cuenta que la concentración de SSVLM fue de 1 890 mg L<sup>-1</sup> (como valor promedio de las muestras tomadas al inicio y al final del ensayo), se puede estimar la velocidad específica máxima de remoción de DQORB, resultando en 0.20 g DQO g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, la que es equivalente a 4.81 g DQORB g SSV<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Suponiendo que la relación DQO/SSV para la biomasa es 1.42 g DQO g SSV<sup>-1</sup> (equivalente de oxígeno de la biomasa) (Metcalf y Eddy, 2003), se tiene que  $q_{\text{OHO,COD,OX}}$  tiene un valor de 3.39 g DQORB g DQO-biomasa<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Por otra parte, como el ensayo fue realizado a 15 °C y no a 20 °C, usando el coeficiente típico de Arrhenius de 1.07 para la actividad de OHO (Metcalf y Eddy, 2003), el valor corregido de  $q_{\text{OHO,COD,OX}}$  a 20 °C resulta en 4.75 g DQORB g DQO-biomasa<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (3.39 g DQORB g DQO<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> / 1.07<sup>(15-20)</sup>). Este valor está dentro de los rangos de velocidades específicas máximas reportadas para el proceso aerobio de remoción de materia orgánica. Es importante notar que el efluente sintético contenía 400 mg DQO L<sup>-1</sup>, y que la concentración resultante de DQO soluble medida en el reactor fue de 203 mg COD L<sup>-1</sup> al inicio (Tabla 2.5.2, valor a 5 min). Lo anterior se debe a la dilución de 1.25 L de afluente sintético con 1.25 L de lodo activado (que no contenía DQORB). Además, también debe notarse que: (i) la concentración inicial de DQO en el lodo activado antes de la adición del agua residual era de aproximadamente 56 mg L<sup>-1</sup> (valor no diluido) y, (ii) la concentración de DQO al finalizar el ensayo está alrededor de 30 mg DQO L<sup>-1</sup> (valor diluido). La masa de DQO representada por estas concentraciones corresponde a la DQO soluble no biodegradable presente en la muestra de lodo activado, que no puede ser removida por métodos biológicos (como fue explicado anteriormente al inicio de este capítulo).



**Tabla 2.5.2** Ejemplo de un plan de implementación experimental para la conducción de un ensayo de actividad en batch (Tipo OHO.AER.1) ejecutado a 15 °C y pH 7.0 con un afluente sintético utilizando un lodo activado procedente de una planta a escala real.

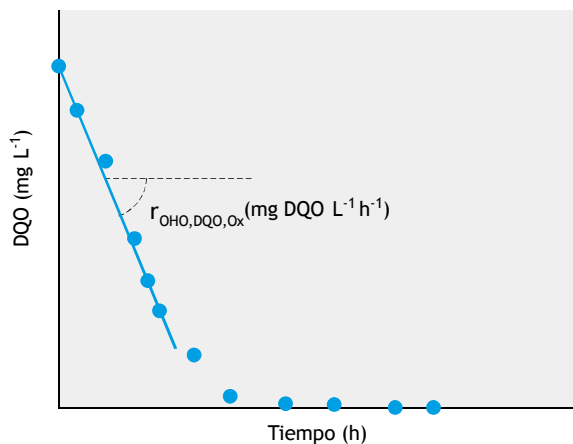
Ensayo batch de remoción aeróbica de DQO										Código: OHO.AER.1		
<b>Fecha:</b>	Jueves	09.10.2015	10:00 h	<b>Procedimiento experimental (simplificado)</b>						<b>Tiempo (h:min)</b>		
<b>Descripción:</b>	Ensayo a 25 °C, pH 7, substrato sintético, lodo activado			1. Confirmar disponibilidad de equipos y materiales.						08:00		
<b>Ensayo No.:</b>	1 de 6			2. Confirmar funcionalidad y calibración de sistema, medidores y sensores.						08:10		
<b>Duración:</b>	4,0 h (240 min)			3. Transferir 1.25 L de lodo activado al reactor de ensayo.						08:30		
<b>Substrato:</b>	Sintético: Acetato (350 mg L <sup>-1</sup> ) + solución mineral con N y P			4. Iniciar las condiciones aeróbicas con una mezcla lenta y suministro de aire al pH y temperatura seleccionados.						08:40		
<b>Punto de muestreo:</b>	Altura media en el reactor de ensayo			5. 20 min antes del inicio recolecte muestra preliminar (OHO.AER.1.1).						09:40		
<b>Muestras No.:</b>	OHO.AER.1 (1-22)			6. Inicie el ensayo: agregue 1.25 L de medio sintético (minuto cero).						10:00		
<b>Volumen muestras:</b>	222 mL (10 mL para MLVSS, 6 mL para otros análisis)			7. Min 5, continúe con el programa o plan de muestreo.						10:05		
<b>Volumen del reactor:</b>	2.5 L			8. Min 240, detenga la aireación y agitación.						14:00		
				9. Organice las muestras y limpie el sistema.						14:15		
				10. Verifique que el sistema ha sido apagado.						14:20		
<b>Plan de muestreo y recolección de muestras</b>												
Tiempo (min)	-20	0	5	10	15	20	25	30	40	50	60	75
Tiempo (h)	-0:33	0:00	0:08	0:17	0:25	0:33	0:42	0:50	0:67	0:83	1:00	1:25
Muestra No.	1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
FASE AERÓBICA												
HAc (mg DQO L <sup>-1</sup> )	56 <sup>1</sup>		203	195.5	184	173	158.5	143.5	135.5	129	119.5	83
PO <sub>4</sub> -P (mg L <sup>-1</sup> )	1.2 <sup>1</sup>											
NH <sub>4</sub> -N (mg L <sup>-1</sup> )	5.3 <sup>1</sup>											
MLSS y MLVSS (mg L <sup>-1</sup> )	Ver tabla											Ver tabla
<sup>1</sup> Valores promedio de las concentraciones iniciales al inicio del ensayo.												
<b>Plan de muestreo y recolección de muestras (continuación)</b>												
Tiempo (min)	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	
Tiempo (h)	1:50	1:75	2:00	2:25	2:50	2:75	3:00	3:25	3:50	3:75	4:00	
Muestra No.	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
FASE AERÓBICA												
HAc (mg DQO L <sup>-1</sup> )	73	63	43	38	28	30.5	33	25.5	28	26.5	30	
PO <sub>4</sub> -P (mg L <sup>-1</sup> )												1.8
NH <sub>4</sub> -N (mg L <sup>-1</sup> )												8.3
MLSS y MLVSS (mg L <sup>-1</sup> )												Ver tabla
<b>Determinación de las concentraciones de SSLM &amp; SSVLM</b>												
Punto de muestreo	Muestra No.	W1	W2	W3	W2-W1	W2-W3	SSLM	SSVLM	Razón SSV/SS			
Inicio de la fase aeróbica <sup>2</sup>	1	0.08835	0.10741	0.08849	0.01906	0.01892	1,906	1,892	0.99			
	2	0.08835	0.10759	0.09018	0.01924	0.01742	1,924	1,742	0.91			
	3	0.08834	0.10683	0.08940	0.01849	0.01742	1,849	1,742	0.94			
							Average	1,893	1,792	0.95		
Fin fase aeróbica	4	0.08868	0.10758	0.08934	0.01890	0.01824	1,890	1,824	0.97			
	5	0.08764	0.10617	0.08874	0.01853	0.01742	1,853	1,742	0.94			
	6	0.08722	0.10648	0.08973	0.01926	0.01675	1,926	1,675	0.87			
							Promedio	1,890	1,747	0.93		
<sup>2</sup> Muestra recolectada antes de agregar el medio sintético.												
<b>Composición de la biomasa</b>												
Punto de muestreo	Inicio Aer.	Final Aer.										
SSLM (mg L <sup>-1</sup> )	1,893	1,890										
SSVLM (mg L <sup>-1</sup> )	1,792	1,747										
Razón SSVLM/SSLM	0.95	0.93										
Sólidos fijos (mg L <sup>-1</sup> )	101	142										

La presencia de nitrógeno (como amonio) y de fósforo (como ortofosfato), al inicio (5.3 y 1.2 mg L<sup>-1</sup> en el lodo activado, respectivamente) y al finalizar el ensayo (8.3 y 1.8 mg L<sup>-1</sup>), indica que estos nutrientes no fueron limitantes. De hecho, las concentraciones al finalizar el ensayo son mayores que al inicio debido a que el afluente sintético utilizado contenía una concentración aproximada de 28 mg N-NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> y de 8 mg P-PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup>. Entonces, debido a la dilución y al consumo de nutrientes para la síntesis de biomasa, quedan como remanentes 8.3 mg N-NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> y 1.8 mg P-PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> al finalizar el ensayo de actividad aerobia. Para cuando se quiere conocer los requerimientos

reales de nitrógeno (N<sub>req</sub>) y fósforo (P<sub>req</sub>), estos pueden ser estimados mediante las siguientes expresiones:

$$N_{req} = \frac{Y_{DQO} \cdot DQORB_{removida} \cdot N_s}{f_{CV}} \quad \text{Ec. 2.5.2}$$

$$P_{req} = \frac{Y_{DQO} \cdot DQORB_{removida} \cdot P_s}{f_{CV}} \quad \text{Ec. 2.5.3}$$



**Figura 2.5.2** Representación gráfica de los datos obtenidos en el ejemplo de la implementación del plan experimental para la ejecución del ensayo de actividad en batch (Tipo OHO.AER.1) realizado con un lodo activado procedente de una planta completa a 15 °C usando afluente sintético a pH 7.0. La línea de tendencia general muestra la velocidad de conversión de DQORB para la posterior estimación de la velocidad específica máxima.

Donde,  $Y_{DQO}$  es el rendimiento de crecimiento de la biomasa (con base en la demanda química de oxígeno, es decir en DQO-biomasa DQO-sustrato<sup>-1</sup>),  $DQORB_{removida}$  es la concentración de DQORB removida en el ensayo (teniendo en cuenta la DQO inicial y el efecto potencial de la dilución),  $N_S$  es el requerimiento de nitrógeno para el crecimiento de biomasa, asumiendo que es alrededor de 0.10 g N g SSV<sup>-1</sup>,  $P_S$  es el requerimiento de fósforo para el crecimiento de biomasa, asumiendo que es alrededor de 0.03 g P g SSV<sup>-1</sup>,  $f_{CV}$  es la relación DQO/SSV de la biomasa, asumido como 1.42 o 1.48 g DQO g SSV<sup>-1</sup> (Metcalf y Eddy, 2003; Ekama y Wentzel, 2008a).

## 2.5.7 Consideraciones adicionales y recomendaciones

### 2.5.7.1 Almacenamiento y crecimiento simultáneo de microorganismos

Varios estudios realizados en sistemas, tanto a escala de laboratorio como a escala real, han documentado la ocurrencia simultánea de los procesos de almacenamiento de DQORB y crecimiento microbiano, bajo condiciones aerobias (van Loosdrecht *et al.*, 1997; Beun *et al.*, 2000; Dircks *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2003; Sin *et al.*, 2005). Bajo tales condiciones, y cuando los OHOs son expuestos a altos gradientes de concentraciones de sustrato (como los observados en

reactores de flujo pistón y en selectores de sistemas de lodo activado), una fracción de la DQORB presente en el seno del líquido es transportada a través de la membrana celular y almacenada como polímero intracelular en forma de PHA, para su posterior empleo para el crecimiento microbiano, cuando la concentración de sustrato es baja o ha sido consumida (van Loosdrecht *et al.*, 1997; Beun *et al.*, 2000, Dircks *et al.*, 2001). La fracción remanente de DQORB que no es almacenada intracelularmente se emplea directamente para el crecimiento (Sin *et al.*, 2005). Tal combinación de procesos dará lugar a altos valores aparentes de  $Y_{OHO}$ , debido a que al parecer el proceso de almacenamiento de DQORB requiere menos oxígeno que lo que se necesita para el crecimiento directo a partir de la DQORB (al menos cuando tiene lugar el almacenamiento). La importancia y el papel del proceso de almacenamiento en el lodo activado ha sido reconocido en tal medida, que han sido desarrollados y debatidos diferentes modelos en la búsqueda de una mejor descripción de lo que ocurre en sistemas de plantas a escala real cuando los procesos de crecimiento y almacenamiento ocurren simultáneamente (Gujer *et al.*, 1999; Sin *et al.*, 2005; Guisasola *et al.*, 2005, van Loosdrecht *et al.*, 2015). Con respecto a los ensayos aerobios realizados con el objetivo de determinar la velocidad de remoción de materia orgánica, la aparición simultánea de estos procesos no debería tener implicaciones prácticas directas. Sin embargo, el lector debe ser consciente de que influirá en los perfiles de tasa de consumo de oxígeno y conducirá a ciertas desviaciones en los valores de  $Y_{OHO}$  medidos, como se describe detalladamente en la literatura (Gujer *et al.*, 1999).

### 2.5.7.2 Insuficiencia de nutrientes

Aunque puede parecer trivial, la presencia de macro y micronutrientes en las concentraciones adecuadas es esencial para el funcionamiento exitoso de un sistema de lodo activado. Estos suelen estar presentes en cantidades suficientes en la mayoría de las aguas residuales municipales, pero su presencia debe comprobarse y confirmarse especialmente si la planta de aguas residuales recibe periódicamente efluentes industriales. Para ello, se puede realizar una simple estimación de los requerimientos de nutrientes de la biomasa en función de la concentración de DQO a eliminar (tal como es sugerido en este capítulo) y compararlos con las concentraciones de nutrientes presentes en el afluente. Lo anterior permite determinar si hay suficientes nutrientes disponibles para satisfacer las necesidades del crecimiento biológico. La falta de estos nutrientes puede

conducir a graves problemas, como la dispersión de los flóculos y la formación de lodos filamentosos esponjosos (Eikelboom, 2000; Martins, 2004), que afectan la calidad del efluente y, en casos extremos, pueden conducir al fallo del sistema de lodos activados.

### 2.5.7.3 Toxicidad o inhibición

La abundancia de los OHOs en los sistemas de lodos activados es tan amplia y diversa que pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales y de operación, e incluso resistir la presencia de compuestos potencialmente inhibitorios y tóxicos, provenientes principalmente de actividades industriales. Aunque los OHOs pueden adaptarse, el efecto inhibitorio puede dar

lugar a que la actividad microbológica ocurra de forma sub-óptima. Para evaluar los potenciales efectos inhibitorios y tóxicos, se pueden realizar dos ensayos batch: el primero con el lodo original, y el segundo, con el mismo lodo, pero lavado en solución mineral para remover cualquier compuesto indeseable (como se explicó en la Sección 2.5.3.5.). Para la comparación de los resultados obtenidos en los ensayos, sería muy útil investigar también el efecto inhibitorio relacionado con la presencia de algunos compuestos específicos sobre los OHOs. Sin embargo, es importante saber que este procedimiento puede ser exitoso solamente si el efecto inhibitorio es (rápidamente) reversible.



Figura 2.5.3 Bioreactor de alta tecnología para la realización de ensayos batch o continuos de cultivos microbianos (foto: Applikon Biotechnology B.V., 2016).

**Anexo I: Coeficientes de conversión de unidades**

**Tabla A1** Factores de conversión (FC) para conversiones netas, parámetros estequiométricos y cinéticos para carbono (C), fósforo (P), nitrógeno (N) y azufre (S).

Relación o Parámetro	Unidades (base mg)	Unidades (base molar)	FC	Unidades (base DQO)	FC
<b>RELACIONES PARA CONDICIONES ANAEROBIAS</b>					
Fosfato liberado/HAc consumido	mg PO <sub>4</sub> mg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.32	mg PO <sub>4</sub> mg DQO <sup>-1</sup>	0.95
Glucógeno utilizado/HAc consumido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> mg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.11	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	1.12
PHB formado/HAc consumido	mg (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.40	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	1.57
PHV formado/HAc consumido	mg (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.50	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	1.82
PH <sub>2</sub> MV formado/HAc consumido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.58	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	2.01
Fosfato liberado/HPr consumido	mg PO <sub>4</sub> mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.80	mg PO <sub>4</sub> mg DQO <sup>-1</sup>	0.65
Glucógeno utilizado/HPr consumido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.92	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	0.77
PHB formado/HPr consumido	mg (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.15	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	1.08
PHV formado/HPr consumido	mg (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.23	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	1.25
PH <sub>2</sub> MV formado/HPr consumido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.30	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	1.39
PHV formado/PHB formado	mg (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.08	mg DQO mg DQO <sup>-1</sup>	1.16
Sulfato reducido/HAc consumido	mg SO <sub>4</sub> mg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	S-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.31	mg SO <sub>4</sub> mg DQO <sup>-1</sup>	0.95
Sulfato reducido/HPr consumido	mg SO <sub>4</sub> mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	S-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.26	mg SO <sub>4</sub> mg COD <sup>-1</sup>	0.65
Biomasa activa formada/sulfato reducido	mg CH <sub>2.09</sub> O <sub>0.54</sub> N <sub>0.20</sub> P <sub>0.02</sub> mg SO <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	C-mol S-mol <sup>-1</sup>	3.70	mg DQO mg SO <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	1.52
<b>RELACIONES PARA CONDICIONES ANÓXICAS</b>					
PHB degradado/nitrato removido	mg (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.88	mg DQO mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	1.66
PHV degradado/nitrato removido	mg (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	3.10	mg DQO mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	1.92
PH <sub>2</sub> MV degradado/nitrato removido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	3.26	mg DQO mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	2.12
Glucógeno formado/nitrato removido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.30	mg DQO mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	1.18
Poli-P formado/nitrato removido	mg (PO <sub>3</sub> Mg <sub>0.33</sub> K <sub>0.33</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	P-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.62	-	-
Biomasa activa formada/nitrato removido	mg (CH <sub>2.09</sub> O <sub>0.54</sub> N <sub>0.20</sub> P <sub>0.02</sub> ) mg NO <sub>3</sub>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.38	mg DQO mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	1.52
Metanol degradado/nitrato removido	mg CH <sub>4</sub> O mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	1.92	mg DQO mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	1.98
Etanol degradado/nitrato removido	mg C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.70	mg DQO mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	2.06
Acetato degradado/nitrato removido	mg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.08	mg DQO mg NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	1.06
PHB degradado/nitrito removido	mg (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.14	mg DQO mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.66
PHV degradado/nitrito removido	mg (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.30	mg DQO mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.92
PH <sub>2</sub> MV degradado/nitrito removido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.42	mg DQO mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	2.12
Glucógeno formado/nitrito removido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	1.71	mg DQO mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.18
Poli-P formado/nitrito removido	mg (PO <sub>3</sub> Mg <sub>0.33</sub> K <sub>0.33</sub> ) <sub>n</sub> mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	P-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.46	-	-
Biomasa activa formada/nitrito removido	mg (CH <sub>2.09</sub> O <sub>0.54</sub> N <sub>0.20</sub> P <sub>0.02</sub> ) mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	1.77	mg DQO mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.52
Metanol degradado/nitrito removido	mg CH <sub>4</sub> O mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	1.43	mg DQO mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.98
Etanol degradado/nitrito removido	mg C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	2.00	mg COD mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	2.06
Acetato degradado/nitrito removido	mg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	1.54	mg DQO mg NO <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.06
Nitrito removido/amonio removido	mg NO <sub>2</sub> mg NH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	N-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.39	mg NO <sub>2</sub> mg NH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	-
Nitrato removido/amonio removido	mg NO <sub>3</sub> /mg NH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	N-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.29	mg NO <sub>3</sub> mg NH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	-
Biomasa activa formada/amonio consumido	mg (CH <sub>2.09</sub> O <sub>0.54</sub> N <sub>0.20</sub> P <sub>0.02</sub> ) mg NH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.69	mg DQO mg NH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	-
<b>RELACIONES PARA CONDICIONES AEROBIAS</b>					
PHB degradado/oxígeno consumido	mg (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	0.37	mg DQO mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.66
PHV degradado/oxígeno consumido	mg (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	0.40	mg DQO mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.92
PH <sub>2</sub> MV degradado/oxígeno consumido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	0.42	mg DQO mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	2.12
Glucógeno formado/oxígeno consumido	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	0.29	mg DQO mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.18
Poli-P formado/oxígeno consumido	mg (PO <sub>3</sub> Mg <sub>0.33</sub> K <sub>0.33</sub> ) <sub>n</sub> mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	P-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	0.08	mg (PO <sub>3</sub> Mg <sub>0.33</sub> K <sub>0.33</sub> ) <sub>n</sub> mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	-
Biomasa activa formada/oxígeno consumido	mg (CH <sub>2.09</sub> O <sub>0.54</sub> N <sub>0.20</sub> P <sub>0.02</sub> ) mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol mol O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	0.31	mg DQO mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	1.52
Biomasa activa formada/amonio consumido	mg (CH <sub>2.09</sub> O <sub>0.54</sub> N <sub>0.20</sub> P <sub>0.02</sub> ) mg NH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.69	mg DQO mg NH <sub>4</sub> <sup>-1</sup>	1.52

PARÁMETROS GENERALES					
NA	mg P mg C <sup>-1</sup>	P-mol C-mol <sup>-1</sup>	0.39	-	-
NA	mg C mg C <sup>-1</sup>	C-mol C-mol <sup>-1</sup>	1.00	-	-
NA	mg C mg N <sup>-1</sup>	C-mol N-mol <sup>-1</sup>	1.16	-	-
NA	mg P mg N <sup>-1</sup>	P-mol N-mol <sup>-1</sup>	0.45	-	-
NA	mg C mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	C-mol O <sub>2</sub> -mol <sup>-1</sup>	1.33	-	-
NA	mg P mg O <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	P-mol O <sub>2</sub> -mol <sup>-1</sup>	1.04	-	-
MASAS MOLECULARES					
HF	mg CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C-mol	0.022	mg DQO	0.35
HAc	mg C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	C-mol	0.033	mg DQO	1.06
HPr	mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C-mol	0.041	mg DQO	1.53
HBr	mg C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	C-mol	0.045	mg DQO	1.80
Lactato	mg C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C-mol	0.033	mg DQO	1.06
Metanol	mg CH <sub>4</sub> O	C-mol	0.031	mg DQO	1.98
Etanol	mg C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	C-mol	0.043	mg DQO	2.06
Glucosa	mg C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	C-mol	0.033	mg DQO	1.06
Sulfuro	mg S <sup>2-</sup>	S-mol	0.031	mg DQO	2.00
Dióxido de carbono	mg CO <sub>2</sub>	C-mol	0.023	-	-
Fosfato	mg PO <sub>4</sub>	P-mol	0.011	-	-
Nitrógeno	mg N <sub>2</sub>	N-mol	0.071	-	-
Amonio	mg NH <sub>4</sub>	N-mol	0.055	-	-
Nitrato	mg NO <sub>3</sub>	N-mol	0.048	-	-
Nitrito	mg NO <sub>2</sub>	N-mol	0.065	-	-
Oxígeno	mg O <sub>2</sub>	mol O <sub>2</sub>	0.031	-	-
Sulfato	mg SO <sub>4</sub>	S-mol	0.010	-	-
PHB	mg (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	C-mol	0.046	mg DQO	1.66
PHV	mg (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	C-mol	0.050	mg DQO	1.92
PH2MV	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	C-mol	0.053	mg DQO	2.12
Glucógeno	mg (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	C-mol	0.037	mg DQO	1.18
Poli-P	mg (PO <sub>3</sub> Mg <sub>0.33</sub> K <sub>0.33</sub> ) <sub>n</sub>	P-mol	0.010	-	-
Biomasa activa	mg (CH <sub>2.09</sub> O <sub>0.54</sub> N <sub>0.20</sub> P <sub>0.02</sub> )	C-mol	0.038	mg DQO	1.52
FACTORES ADICIONALES					
Fración común de biomasa activa de los SSV en cultivos EBPR enriquecidos <sup>a</sup>	mg SSV	mg biomasa activa	0.80	-	-

<sup>a</sup> El contenido de glucógeno en los lodos varía dependiendo del contenido de poli-P (Welles *et al.*, 2015b).

## Referencias

- Abdeen, S., Di, W., Hui, L., Chen, G.-H. and van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Fecal coliform removal in a sulfate reducing autotrophic denitrification and nitrification integrated (SANI) process for saline sewage treatment. *Water Science and Technology*, 62(11): 2564-2570.
- Acevedo, B., Oehmen, A., Carvalho, G., Seco, A., Borrás, L. and Barat, R. (2012). Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of polyphosphate storage. *Water Research*, 46(6): 1889-1900.
- Acevedo, B., Borrás, L., Oehmen, A. and Barat, R. (2014). Modelling the metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms. *Water Research*, 65: 235-244.
- Al Abbas, F.M., Williamson, C., Bholá, S.M., Spear, J.R., Olson, D.L., Mishra, B. and Kakpovbia, A.E. (2013). Influence of sulfate reducing bacterial biofilm on corrosion behavior of low-alloy, high-strength steel (API-5L X80). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78: 34-42.
- Ahn, J., Schroeder, S., Beer, M., McIlroy, S., Bayly, R.C., May, J.W., Vasiliadis, G. and Seviour, R.J. (2007). Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(7): 2257-2270.
- Almeida, P.F., Almeida, R.C.C., Carvalho, E.B., Souza, E.R., Carvalho, A.S., Silva, C.H.T.P. and Taft, C.A. (2006). Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. In: *Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry*, Taft, C.A. (Ed.). Research Signpost, Trivandrum, India.
- American Public Health Association (APHA). American Water Works Association (AWWA), and Water Environment



- Federation (WEF). (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22<sup>nd</sup> edition, ISBN: 0875530133, Washington, D.C.
- Arden, E. and Lockett, W.T. (1914). Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 33(10): 523-539.
- Artiga, P., Gonzalez, F., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Garrido, J.M., Ficara, E. and Méndez, R. (2005). Multiple analyses reprogrammable titration analyser for the kinetic characterisation of nitrifying and autotrophic denitrifying biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 26: 176-183.
- Baetens, D., Aurola, A.M., Foglia, A., Dionisi, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2002). Gas chromatographic analysis of polyhydroxybutyrate in activated sludge: a round-robin test. *Water Science and Technology*, 46(1-2): 357-361.
- Bale, C.W., Chartrand, P., Degrov, S.A., Eriksson, G., Hack, K., Ben Mahfoud, R., Melançon, J., Pelton, A.D. and Petersen, S. (2002). FactSage thermochemical software and databases. *Calphad*, 26: 189-228.
- Balk, M., Altınbaş, M., Rijpstra, W.I.C., Sinninghe Damsté, J.S. and Stams, A.J.M. (2008). *Desulfatirhabdium butyrativorans* gen. nov., sp. nov., a butyrate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 110-115.
- Barañano, P.A. and Hall, E.R. (2004). Modelling carbon oxidation in CTMP pulp mill activated sludge systems: calibration of ASM3. *Water Science and Technology*, 50(3): 1-10.
- Barat, R., Montoya, T., Borrás, L., Ferrer, J. and Seco, A. (2008). Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism. *Water Research*, 42(13): 3415-3424.
- Barker, P.S. and Dold, P.L. (1995). COD and nitrogen mass balances in activated-sludge systems. *Water Research*, 29(2): 633-643.
- Bettazzi, E., Caffaz, S., Vannini, C. and Lubello, C. (2010). Nitrite inhibition and intermediates effects on Anammox bacteria: a batch-scale experimental study. *Process Biochemistry*, 45(4): 573-580.
- Beun, J.J., Paletta, F., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (2000). Stoichiometry and kinetics of Poly-B-hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 67: 379-389.
- Bi, Z., Qiao, S., Zhou, J., Tang, X. and Zhang, J. (2014). Fast start-up of Anammox process with appropriate ferrous iron concentration. *Bioresource Technology*, 170: 506-512.
- Bilanovic, D., Battistoni, P., Cecchi, F., Pavan, P. and Mata-Alvarez, J. (1999). Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. *Water Research*, 33(15): 3311-3320.
- Bjerrum, J., Schwarzenbach, G. and Sillén, L.G. (1958). Stability Constants. Chemical Society, London.
- Blackburne, R., Vadivelu, V.M., Yuan, Z. and Keller, J. (2007). Determination of growth rate and yield of nitrifying bacteria by measuring carbon dioxide uptake rate. *Water Environment Research*, 79(12): 2437-2445.
- Bock, E., Schmidt, I., Stuvén, R. and Zart, D. (1995). Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Archives of Microbiology*, 163: 16-20.
- Bogaert, H., Vanderhasselt, H., Gernaey, K., Yuan, Z., Thoeye, C. and Verstraete, W. (1997). A new sensor based on pH-effect of the denitrification process. *Journal of Environmental Engineering*, 123: 884-891.
- Boyles, S. (1997). The Science of Chemical Oxygen Demand. Technical Information Series, Booklet No. 9, HACH Company, USA, pp: 1-23.
- Brdjanovic, D., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J. (1996). The dynamic effects of potassium limitation on biological phosphorus removal. *Water Research*, 30(10): 2323-2328.
- Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G. J. and Heijnen, J. J. (1997). Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal systems. *ASCE Journal of Environmental Engineering*, 123: 144-154.
- Brdjanovic, D. (1998a). *Modelling biological phosphorus removal in activated sludge systems. PhD Thesis*. Delft University of Technology, ISBN: 9054104155, Balkema Publishers, Rotterdam, the Netherlands.
- Brdjanovic, D., Logemann, S., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J. (1998b). Influence of temperature on biological phosphorus removal: process and molecular ecological studies. *Water Research*, 32(4): 1035-1048.
- Brdjanovic, D., Slamet, A., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J. (1998c). Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Research*, 32(1): 200-208.
- Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M., Veersteeg, P., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J. and Heijnen, J.J. (2000). Modelling COD, N and P removal in a full-scale WWTP Haarlem Waarderpolder. *Water Research*, 34: 846-858.
- Burow, L.C., Kong, Y., Nielsen, J.L., Blackall, L.L. and Nielsen, P.H. (2007). Abundance and ecophysiology of *Defluviococcus* spp., glycogen-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, 153(1): 178-185.
- Butlin, K.R., Selwyn, S.C. and Wakerley, D.S. (1956). Sulfide production from sulphate-enriched sewage sludges. *Journal of Applied Bacteriology*, 19(1): 3-15.
- Caccavo, F.Jr., Frolund, B., van Ommen Kloeke, F. and Nielsen, P.H. (1996). Deflocculation of activated sludge by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1487-1490.
- Carvajal-Arroyo, J.M., Sun, W., Sierra-Alvarez, R. and Field, J.A. (2013). Inhibition of anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) enrichment cultures by substrates, metabolites and common wastewater constituents. *Chemosphere*, 91: 22-27.
- Carvalho, G., Lemos, P.C., Oehmen, A. and Reis, M.A. (2007). Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Research*, 41(19): 4383-4396.
- Carvalho, M., Oehmen, A., Carvalho, G., Eusébio, M. and Reis, M.A. (2014). The impact of aeration on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Research*, 66: 296-307.
- Cao, Y., Ang, C., Chua, K., Woo, F., Chi, H., Bhawna, B., Chong, C.T., Ganesan, N., Ooi, K.E. and Wah, Y. (2009). Enhanced biological phosphorus removal in the retrofitting from an anoxic selector to an anaerobic selector in a full-scale activated sludge process in Singapore. *Water Science and Technology*, 59(5): 857-865.
- Cech, J.S. and Hartman, P. (1993). Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems. *Water Research*, 27(7): 1219-1225.
- Chen, G.-H., Brdjanovic, D., Ekama, G.A. and van Loosdrecht, M.C.M. (2010). Seawater as alternative water resource. In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> IWA Leading Edge Technology Conference on Water and Wastewater Treatment, Arizona, USA, June 2-4.
- Chen, H., Yu, J.-J., Jia, X.-Y., and Jin, R.-C. (2014). Enhancement of Anammox performance by Cu(II), Ni(II) and Fe(III) supplementation. *Chemosphere*, 117 (1): 610-616.
- Comeau, Y., Hall, K.J., Hancock, R.E.W. and Oldham, W.K. (1986). Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*, 20(12): 1511-1521.

- Comeau, Y., Rabionwitz, B., Hall, K.J. and Oldham, W.K. (1987). Phosphate release and uptake in enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 59(7): 707-715.
- Comeau Y. (2008). Microbial metabolism. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A., Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing. London, UK.
- Corominas, L., Rieger, L., Takács, I., Ekama, A.G., Hauduc, H., Vanrolleghem, P., Oehmen, A., Gernaey, K., van Loosdrecht M.C.M. and Comeau, Y. (2010). New framework for standardized notation in wastewater treatment modelling. *Water Science and Technology*, 61(4): 841-857.
- Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Joulain, C., Cayol, J.-L. and Hirschler-Réa, A. (2004). *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel nalkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1639-1642.
- Cypionka. (1987). Uptake of sulfate, sulfite and thiosulfate by proton-anion symport in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Archives of Microbiology*, 148(2): 144-149.
- Cypionka, H. (2000). Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annual Reviews of Microbiology*, 54: 827-848.
- Dai, Y., Yuan, Z., Wang, X., Oehmen, A. and Keller, J. (2007). Anaerobic metabolism of *Deffluviococcus vanus* related glycogen accumulating organisms (GAOs) with acetate and propionate as carbon sources. *Water Research*, 41(9): 1885-1896.
- Daigger, G.T., Hodgkinson, A., Aquilina, S. and Fries, M.K. (2015). Development and implementation of a novel sulfur removal process from H<sub>2</sub>S containing wastewaters. *Water Environment Research*, 87(7): 618-625.
- Dapena-Mora, A., Fernandez, I., Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Mendez, R. and Jetten M.S.M. (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4): 859-865.
- de Graaff, M.S., Temmink, H., Zeeman, G., van Loosdrecht, M.C.M. and Buisman C.J.N. (2011). Autotrophic nitrogen removal from black water: calcium addition as a requirement for settleability. *Water Research*, 45: 63-74.
- Dircks, K., Beun, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. and Henze, M. (2001). Glycogen metabolism in aerobic mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(2): 85-94.
- Dircks, K., Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Mosbaek, H. and Aspegren, H. (2001). Storage and degradation of poly-B-hydroxybutyrate in activated sludge under aerobic conditions. *Water Research*, 35: 2277-2285.
- Dircks, K., Pind, P.F., Mosbaek, H. and Henze, M. (1999). Yield determination by respirometry - The possible influence of storage under aerobic conditions in activated sludge: *Water SA*, 25: 69-74.
- Dosta, J., Fernandez, I., Vazquez-Padin, J. R., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Mata-Alvarez, J. and Mendez, R. (2008). Short- and long-term effects of temperature on the Anammox process. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1): 688-693.
- Eckenfelder, W. (1986). Operation control and management of activated sludge plants treating industrial wastewaters. *Proceedings of a seminar sponsored by Vanderbilt University*. Tennessee.
- Eikelboom, D.H. (2000). Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. ISBN-13: 9781780406831, IWA Publishing, London, UK.
- Ekama, G.A. and Wentzel, M.C. (2008a). Organic matter removal. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883. IWA Publishing, London, UK.
- Ekama, G.A. and Wentzel, M.C. (2008b). Nitrogen removal. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing. London, UK.
- Ekama, G.A., Wilsenach, J.A. and Chen, G.-H. (2010). Some opportunities and challenges for urban wastewater treatment. In: 7<sup>th</sup> IWA LET conference, Arizona, USA, June 2-4 (keynote presentation), Retrieved in September 2015 from <http://repository.ust.hk/ir/Record/1783.1-16616>
- Ettwig, K.F., Butler, M.L., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J.C.T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op den Camp, H.J.M., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M. and Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464, 543-548.
- Ficara, E. and Canziani, R. (2007). Monitoring denitrification by pH-static titration. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(2): 368-377.
- Ficara, E. and Rozzi, A. (2004). Coupling pH-static and DO-stat titration to monitor degradation of organic substrates. *Water Science and Technology*, 49(1): 69-77.
- Ficara, E., Cortelezzi, P. and Rozzi, A. (2003). Theory of pH-stat titration. *Biotechnology and Bioengineering*, 82: 28-37.
- Ficara, E., Musumeci, A. and Rozzi, A. (2000). Comparison and combination of titrimetric and respirometric techniques to estimate nitrification kinetics parameters. *Water SA*, 26(2): 217-224.
- Ficara, E., Sambusiti, C. and Canziani, R. (2009). Manometric monitoring of biological denitrification. In: Proceeding of the 2<sup>nd</sup> IWA Specialized Conference in Nutrients Management in Wastewater Treatment Processes, Krakow, Poland, 6-9 September, 2009. Lemtech Konsulting (Ed.), Krakow. pp: 61-68.
- Filipe, C.D., Daigger, G.T. and Grady, Jr, C.P. (2001a). A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: stoichiometry, kinetics, and the effect of pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 76(1): 17-31.
- Filipe, C.D., Daigger, G.T. and Grady, Jr, C.L. (2001b). pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms. *Water Environment Research*, 73(2): 223-232.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Mayer, C., Korstgens, V. and Borchard, W. (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers. In: Community structure and cooperation of biofilms, Allison, D., Gilbert, P., Lappin-Scott, H.M. and Wilson, M. (Eds.), SGM Symposium Series, 59, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 87-105.
- Flowers, J.J., He, S., Carvalho, G., Brook, Peterson, S., López, C., Yilmaz, S., Zilles, J.L., Morgenroth, E., Lemos, P., Reis, M.A.M., Crespo, M.T.B., Noguera, D.R. and McMahon, K.D. (2008). Ecological differentiation of *Accumulibacter* in EBPR reactors. In: Proceedings of the Water Environment Federation, WEFTEC 2008, pp: 31-42.
- Foxon, K.M., Brouckaert, C.J., Buckley, C.A. and Rozzi, A. (2002). Denitrifying activity measurements using an anoxic titration (pHstat) bioassay. *Water Science and Technology*, 46(9): 211-218.
- Gayon, U. and Dupetit, G. (1883). La fermentation des nitrates. *Mem. Soc. Sci. Phys. Nat.*, Bordeaux 2(5): 35-36.
- Gernaey, K., Bogaert, H., Massone, A., Vanrolleghem, P. and Verstraete, W. (1997). On-line nitrification monitoring in

- activated sludge with a titrimetric sensor. *Environmental Science and Technology*, 31: 2350-2355.
- Gernaey, K., Bogaert, H., van Rollegem, P., Massone, A., Rozzi, A. and Verstraete, W. (1998). A titration technique for online nitrification monitoring in activated sludge. *Water Science and Technology*, 37(12): 103-110.
- Gibson, G.R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(6): 769-797.
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H. and Matsuo, T. (1999). Modelling hydrolysis processes considering intracellular storage: *Water Science and Technology*, 39: 97-105.
- Grady, Jr, L.C.P., Daigger, G.T., Love, N.G., and Filipe, C.D.M. (2011). Biological wastewater treatment. 3<sup>rd</sup> edition, ISBN 9780849396793, IWA Publishing, CRC Press, London, UK.
- Grein, F., Ramos, A.R., Venceslau, S.S. and Pereira, I.A.C. (2013). Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(2): 145-160.
- Guisasola, A., Qurie, M., Vargas, M., Casas, C. and Baeza, J.A. (2009). Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as an electron acceptor. *Process Biochemistry*, 44: 689-695.
- Guisasola, G., Pijuan, M., Baeza, J.A., Carrera, J., Casas, C. and Lafuente, J. (2004). Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake in bio-P sludge: process modelling using oxygen uptake rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 85: 721-733.
- Guisasola, A., Sin, G., Baeza, J.A., Carrera, J. and Vanrollegem, P.A. (2005). Limitations of ASM 1 and ASM 3: a comparison based on batch oxygen uptake rate profiles from different full-scale wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 52(10): 69-77.
- Gujer, W., Henze, M., Mino, T. and van Loosdrecht, M.C.M. (1999). Activated sludge model No. 3. *Water Science and Technology*, 39(1): 183-193.
- Hallin, S., Throback, I.N., Dickved, J. and Pell, M. (2006). Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. *American Society for Microbiology*, 72(8): 5445-5452.
- Hansen, T.A. (1993). Carbon metabolism of sulfate-reducing bacteria. In: *The sulfate-reducing bacteria: contemporary perspectives*, Odom, J.M., Singleton, Jr, R. (Eds.), ISBN 978-1-4613-9263-7, Brock/Springer Book Series in Contemporary Bioscience, Springer-Verlag, New York Inc.
- Hansen, T.A. (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1-3): 165-185.
- Henze, M. (1991). Capabilities of biological nitrogen removal processes from wastewater. *Water Science and Technology*, 23(4-6): 669-679.
- Henze, M. (1992). Characterization of wastewater for modeling of activated sludge processes. *Water Science and Technology*, 25(6): 1-15.
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J.L.C. and Arvin, E. (1997). Wastewater treatment: biological and chemical processes. ISBN 978-3-540-42228-0, Springer, Berlin.
- Henze, M. and Comeau, Y. (2008). Wastewater characterization. In: *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing, London, UK.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., Matsuo, T., Wentzel, M.C., Marais, G.v.R. and van Loosdrecht, M.C.M. (1999). Activated sludge model no. 2d, ASM2d. *Water Science and Technology*, 39(1): 165-182.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T. and van Loosdrecht, M.C.M. (2000). Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3. IWA Scientific and Technical Report No. 9, IWA Publishing, London, UK.
- Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (2008). Biological wastewater treatment: principles, modelling and design. ISBN: 9781843391883, IWA Publishing, London, UK.
- Hoover, S.R. and Porges, N. (1952). Assimilation of dairy wastes by activated sludge II: The equation of synthesis and oxygen utilization. *Sewage and Industrial wastes*, 24(3): 306-312.
- Hu, Z., Lotti, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Kartal, B. (2013). Nitrogen removal with the anaerobic ammonium oxidation process. *Biotechnology Letters*, 35(8):1145-1154.
- Hu, J.Y., Ong, S.L., Ng, W.J., Lu, F. and Fan, X.J. (2003). A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Research*, 37(14): 3463-3471.
- Hu, Z.R., Wentzel, M.C. and Ekama, G.A. (2002). Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. *Water Research*, 36(19): 4927-4937.
- Hulsbeek, J.J.W., Kruit, J., Roeleveld, P.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2002). A practical protocol for dynamic modelling of activated sludge systems. *Water Science and Technology*, 45(6): 127-136.
- Hulshoff Pol, L.W., Lens, P.N.L., Stams, A.J.M. and Lettinga, G. (1998). Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*, 9(3-4): 213-224.
- Isaksen, M.F. and Jørgensen, B.B. (1996). Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanent cold marine environments. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 408-414.
- Jobbagy, A., Literathy, B., Wong, M., Tardy, G. and Liu, W. (2006). Proliferation of glycogen accumulating organisms induced by Fe (III) dosing in a domestic wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 54(1): 101-109.
- Jones, R., Dold, P., Takács, I., Chapman, K., Wett, B., Murthy, S. and Shaughnessy, M. (2007). Simulation for operation and control of reject water treatment processes. In: *Proceedings of the Water Environment Federation WEFTEC 2007*, pp: 4357-4372.
- Jørgensen, B.B. (2006). Bacteria and marine biogeochemistry. In: *Marine geochemistry*, 2<sup>nd</sup> edition, Schulz, H.D. and Zabel, M. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 169-206.
- Jubany, I., Carrera, J., Lafuente, J. and Baeza, J.A. (2008). Start-up of a nitrification system with automatic control to treat highly concentrated ammonium wastewater: Experimental results and modeling. *Chemical Engineering Journal*, 144(3): 407-419.
- Kampschreur, M.J., Picioreanu, C., Tan, N.C.G., Kleerebezem, R., Jetten, M.S.M. and van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Unraveling the source of nitric oxide emission during nitrification. *Water Environment Research*, 79: 2499-2509.
- Kamysny, Jr., A., Zilberbrand, M., Ekelchik, I., Voitsekovski, T., Gun, J. and Lev, O. (2008). Speciation of polysulfides and zero-valent sulfur in sulfide-rich water wells in southern and central Israel. *Aquatic Geochemistry*, 14: 171-192.
- Kappeler, J. and Gujer, W. (1992). Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Science and Technology*, 25(6): 125-139.
- Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., den Camp, H.J.M.O., Harhangi, H.R., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H.G., Keltjens J.T., Jetten, M.S.M. and Stroums, M. (2011). Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature*, 479: 127-130.
- Kern-Jespersen, J.P. and Henze, M. (1993). Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Research*, 27: 617-624



- Khanal, S.K. (2008). *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*, Wiley-Blackwell, ISBN: 978-0-8138-2346-1, Iowa, USA.
- Kjeldsen, K.U., Joulain, C. and Ingvorsen, K. (2004). Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. *Environmental Science & Technology*, 38(7): 2038-2043.
- Kjeldsen, K.U., Loy, A., Jakobsen, T.F., Thomsen, T.R., Wagner, M. and Ingvorsen, K. (2007). Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS Microbiology Ecology*, 60: 287-298.
- Koch, G., Egli, K., van der Meer, J.R. and Siegrist, H. (2000). Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor. *Water Science and Technology*, 41(4-5): 191-198.
- Koch G., Kuhni M., Gujer W. and Siegrist H. (2000). Calibration and validation of activated sludge model No. 3 for Swiss municipal wastewater. *Water Research*, 34: 3580-3590.
- Kong, Y., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H. (2005). Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 4076-4085.
- Kong, Y., Xia, Y., Nielsen, J.L. and Nielsen, P.H., (2006). Ecophysiology of a group of uncultured Gammaproteobacterial glycogen-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology*, 8(3): 479-489.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B. and Stahl, D.A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058): 543-6.
- Kuba, T., Smolders, G., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1993). Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 27(5-6): 241-252.
- Kuba, T., Murnleitner, E., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1996). A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 52: 685-695.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Brandse, F.A. and Heijnen, J.J. (1997a). Occurrence of denitrifying phosphorus removing bacteria in modified UCT-type wastewater treatment plants. *Water Research*, 31(4): 777-786.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Murnleitner, E. and Heijnen, J.J. (1997b). Kinetics and stoichiometry in the biological phosphorus removal process with short cycle times. *Water Research*, 31(4): 918-928.
- Kujawa, K. and Klapwijk, B. (1999). A method to estimate denitrification potential for pre-denitrification systems using NUR batch tests. *Water Research*, 33: 2291-2300.
- Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B.M., Amann, R., Jørgensen, B.B. and Jetten, M.S.M. (2005). Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 6478-6483.
- Lackner, S., Gilbert, E.M., Vlaeminck, S.E., Joss, A., Horn, H. and van Loosdrecht, M.C.M. (2014). Full-scale partial Nitrification/Anammox experiences - an application survey. *Water Research*, 55: 292-303.
- Langergraber, G., Rieger, L., Winkler, S., Alex, J., Wiese, J., Owerdieck, C., Ahnert, M., Simon, J. and Maurer, M. (2004). A guideline for simulation studies of wastewater treatment plants. *Water Science and Technology*, 50(7): 131-138.
- Lanham, A.N., Ricardo, A.R., Coma, M., Fradinho, J., Carvalho, M., Oehmen, A., Carvalho, G. and Reis, M.A.M. (2012). Optimisation of glycogen quantification in mixed microbial cultures. *Bioresource Technology*, 118: 518-525.
- Lanham, A.B., Oehmen, A., Saunders, A.M., Carvalho, G., Nielsen, P.H. and Reis, M.A. (2014). Metabolic modelling of full-scale enhanced biological phosphorus removal sludge. *Water Research*, 66: 283-295.
- Lau, G.N., Sharma, K.R., Chen, G.-H. and van Loosdrecht, M.C.M. (2006). Integration of sulfate reduction autotrophic denitrification and nitrification to achieve low-cost sludge minimization for Hong Kong sewage. *Water Science and Technology*, 53(3): 227-235.
- Lens, P.N., De Poorter, M.-P., Cronenberg, C.C. and Verstraete, W.H. (1995). Sulfate reducing and methane producing bacteria in aerobic wastewater treatment systems. *Water Research*, 29(3): 871-880.
- Lens, P.N.L., Visser, A., Janssen, A.J.H., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1998). Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 28(1): 41-88.
- Li, L., Han, Y., Yan, X. and Liu, J. (2013). H<sub>2</sub>S removal and bacterial structure along a full-scale biofilter bed packed with polyurethane foam in a landfill site. *Bioresource Technology*, 147: 52-58.
- Liamleam, W. and Annachhatre, A.P. (2007). Electron donors for biological sulfate reduction. *Biotechnology Advances*, 25(5): 452-463.
- Lin, Y.M., Bassin, J.P. and van Loosdrecht, M.C.M. (2012). The contribution of exopolysaccharides induced struvites accumulation to ammonium adsorption in aerobic granular sludge. *Water Research*, 46(4): 986-992.
- Little, B.J. and Lee, J.S. (2007). *Microbiologically influenced corrosion*. ISBN 978-0-471-77276-7, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Liu, M.C. and Peck, Jr., H.D. (1981). The isolation of a hexaheme cytochrome from *Desulfovibrio desulfuricans* and its identification as a new type of nitrite reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 256(24): 13159-13164.
- Lochtman, S.F.W. (1995). *Proceskeuze en -optimalisatie van het SHARON proces voor slibverwerkingsbedrijf Sluisjesdijk (Process choice and optimisation of the SHARON process for the sludge treatment plant Sluisjesdijk)*. BODL report: TU Delft.
- Lopez, C., Pons, M.N. and Morgenroth, E. (2006). Endogenous processes during long-term starvation in activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*, 40(8): 1519-1530.
- Lopez-Vazquez, C.M., Song, Y.I., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Moussa, M.S., Gijzen, H.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2007). Short term temperature effects on the anaerobic metabolism of glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(3): 483-495.
- Lopez-Vazquez, C.M., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2008a). Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands. *Water Research*, 42(10): 2349-2360.
- Lopez-Vazquez, C.M., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2008b). Comment on "Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)?" by Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Lu, H. and Yuan. *Z. Water Research* (2008). doi: 10.1016/j.watres. 2008.01.003, *Water Research*, 42(13): 3561-3562.
- Lopez-Vazquez, C.M. (2009). *The competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms: temperature effects and modelling*. *PhD Thesis*. ISBN 9780415558969, Delft University of Technology, CRC Press/Balkema, Leiden, the Netherlands.
- Lopez-Vazquez, C.M., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2009a). Temperature effects

- on glycogen accumulating organisms. *Water Research*, 43(11): 2852-2864.
- Lopez-Vazquez, C.M., Oehmen, A., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J., Yuan, Z. and van Loosdrecht, M.C.M. (2009b). Modeling the PAO—GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature. *Water Research*, 43(2): 450-462.
- Lopez-Vazquez, C.M., Kubare, M., Saroj, D.P., Chikamba, C., Schwarz, J., Daims, H. and Brdjanovic, D. (2014). Thermophilic biological nitrogen removal in industrial wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2): 945-956.
- Lotti, T., van der Star, W.R., Kleerebezem, R., Lubello, C. and van Loosdrecht, M.C.M. (2012). The effect of nitrite inhibition on the anammox process. *Water Research*, 46(8): 2559-2269.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Lubello, C. and van Loosdrecht, M.C.M. (2014). Physiological and kinetic characterization of a suspended cell Anammox culture. *Water Research*, 60(14): 1-14.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Hu, Z., Kartal, B., de Kreuk, M.K., van Erp Taalman Kip, C., Kruit, J., Hendrickx, T.L.G. and van Loosdrecht, M.C.M. (2015a). Pilot-scale evaluation of anammox based main-stream nitrogen removal from municipal wastewater. *Environmental Technology*, 36(9): 1167-1177.
- Lotti, T., Kleerebezem, R., Abelleira-Pereira, J.M., Abbas, B. and van Loosdrecht M.C.M. (2015b). Faster through training: the Anammox case. *Water Research*, 81: 261-268.
- Lotti, T., Kleerebezem, R. and van Loosdrecht, M.C.M. (2015c). Effect of temperature change on Anammox activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(1): 98-103.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. (2009). Brock biology of microorganisms, 12<sup>th</sup> edition, ISBN 0-13-232460-1, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- Mañas, A., Biscans, B. and Spérandio, M. (2011). Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process. *Water Research*, 45(12): 3776-3786.
- Marais, G.v.R. and Ekama, G.A. (1976). The activated sludge process part 1 - Steady state behaviour. *Water SA*, 2(4): 163-200.
- Martins, A.M.P. (2004). *Bulking sludge control: kinetics, substrate storage, and process design aspects*. PhD Thesis. ISBN 972-9098-07-7, Delft University of Technology, Delft, The Netherlands.
- Martins, A.M.P., Heijnen, J.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2003). Effect of feeding pattern and storage on sludge settleability under aerobic conditions. *Water Research*, 37(11): 2555-2570.
- Massone, A., Antonelli, M. and Rozzi, A. (1996). The DENICON: a novel biosensor to control denitrification in biological wastewater treatment plants. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige, University of Gent, 1709-1714.
- Massone, A.G., Gernaey, K., Rozzi, A. and Verstraete, W. (1998). Measurement of ammonium concentration and nitrification rate by a new titrimetric biosensor. *WEF Research Journal*, 70(3): 343-350.
- Mateju, V., Cizinska, S., Krejci, J. and Janoch, T. (1992). Biological water denitrification - a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 170-183.
- McCarty, P.L. (2007). Thermodynamic electron equivalents model for bacterial yield prediction: Modifications and comparative evaluations. *Biotechnology and Bioengineering*, 97: 377-388.
- Meijer, S.C.F. (2004). *Theoretical and practical aspects of modelling activated sludge processes*. PhD Thesis. ISBN 90-9018027-3, Delft University of Technology, Delft, the Netherlands.
- Meinhold, J., Arnold, E. and Isaacs, S. (1999). Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Research*, 33(8): 1871-1883.
- Mesquita D.P., Amaral A.L., Ferreira E.C. (2013) Activated sludge characterization through microscopy: a review on quantitative image analysis and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*, 802: 14-28.
- Metcalf and Eddy (2003). Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse. 4<sup>th</sup> edition, ISBN-13:978-0070418783, McGraw-Hill, Boston, USA.
- Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1998). Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Research*, 32(11): 3193-3207.
- Mino, T., Arun, V., Tsuzuki, Y. and Matsuo, T. (1987). Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process. In: biological phosphate removal from wastewaters, Ramadori, R. (Ed.), Pergamon Press, Oxford, United Kingdom. pp: 27-38.
- Mohan, S.V., Rao, N.C., Prasad, K.K. and Sarma, P.N. (2005). Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. *Process Biochemistry*, 40(8): 2849-2857.
- Mokhayeri, Y., Nichols, A., Murthy, S., Riffat, R., Dold, P. and Takács, I. (2006). Examining the influence of substrates and temperature on maximum specific growth rate of denitrifiers. *Water Science and Technology*, 54(8): 155-162.
- Mokhayeri, Y., Riffat, R., Takács, I., Dold, P., Bott, C., Hinojosa, Bailey, W. and Murthy S. (2008). Characterizing denitrification kinetics at cold temperature using various carbon sources in lab-scale sequencing batch reactors. *Water Science and Technology*, 58(1): 233-238.
- Mori, K., Kim, H., Kakegawa, T. and Hanada, S. (2003). A novel lineage of sulfate-reducing microorganisms: *Thermodesulfobiaceae* fam. nov., *Thermodesulfobium narugense*, gen. nov., sp. nov., a new thermophilic isolate from a hot spring. *Extremophiles*, 7: 283-290.
- Moussa, M.S., Fuentes, O.G., Lubberding, H.J., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Gijzen, H.J. (2006). Nitrification activities in full-scale treatment plants with varying salt loads. *Environmental Technology*, 27(6): 635-643.
- Moussa, M.S., Rojas, A.R., Hooijmans, C.M., Gijzen, H.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Model-based evaluation of nitrogen removal in a tannery wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 50(6): 251-60.
- Moussard, H., L'Haridon, S., Tindall, B.J., Banta, A., Schumann, P., Stackebrandt, E., Reysenbach, A.-L., and Jeanthon, C. (2004). *Thermodesulfator indicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 227-233.
- Mulder, A. (2003). The quest for sustainable nitrogen removal technologies. *Water Science and Technology*, 48(1): 67-75.
- Munro, J.H.M. (1886). The formation and destruction of nitrates and nitrites in artificial solutions and in river and well waters. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49: 632-681.
- Murnleitner, E., Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1997). An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(5): 434-450.
- Muyzer, G. and Stams, A.J.M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 6:441-455.
- Naidoo, V., Urbain, V. and Buckley, C.A. (1998). Characterisation of wastewater and activated sludge from European municipal wastewater treatment plants using the NUR test. *Water Science and Technology*, 38(1): 303-310.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005). Lehninger principles of biochemistry. ISBN-10: 1-4292-33414-8, W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Nielsen, P.H. and Keiding K. (1998). Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide. *Water Research*, 32(2): 313-320.



- Nielsen, P.H., Mielczarek, A.T., Kragelund, C., Nielsen, J.L., Saunders, A.M., Kong, Y., Hansen, A.A. and Vollertsen, J. (2010). A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Research*, 44(17): 5070-5088.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L.L. and Keller, J. (2004). Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Science and Technology*, 50(10): 139-144.
- Oehmen, A., Vives, M.T., Lu, H., Yuan, Z. and Keller, J. (2005a). The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Research*, 39(15): 3727-3737.
- Oehmen, A., Keller-Lehmann, B., Zeng, R.J., Yuan, Z. and Keller, J. (2005b). Optimisation of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. *Journal of Chromatography A*, 1070(1-2): 131-136.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L.L. and Keller, J. (2005c). Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(2): 162-168.
- Oehmen, A., Saunders, A.M., Vives, M.T., Yuan, Z. and Keller, J. (2006). Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 123(1): 22-32.
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L. and Reis, M.A. (2007). Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Research*, 41(11): 2271-2300.
- Ong, Y.H., Chua, A.S.M., Fukushima, T., Ngoh, G.C., Shoji, T. and Michinaka A. (2014). High-temperature EBPR process: The performance, analysis of PAOs and GAOs and the fine-scale population study of *Candidatus "Accumulibacter phosphatis"*. *Water Research*, 64: 102-112.
- Orhon, D., Sözen, S. and Artan, N. (1996). The effect of heterotrophic yield on the assessment of the correction factor for anoxic growth. *Water Science and Technology*, 34(5): 67-74.
- Oshiki, M., Shimokawa, M., Fujii, N., Satoh, H. and Okabe, S. (2011). Physiological characteristics of the anaerobic ammonium-oxidizing bacterium '*Candidatus Brocadia sinica*'. *Microbiology*, 157: 1706-1713.
- Oude Elferink, S.J.W.H., Visser, A., Hulshoff Pol, L.W. and Stams, A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 119-136.
- Parrou, J.L. and François, J. (1997). A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Analytical Biochemistry*, 248(1): 186-188.
- Pasteur, L. (1859). Note sur la fermentation nitreuse. *Bulletin de la Société de chimie de Paris* (séance du 11 mars): 22-23.
- Payne, W.J. (1986). 1986: Centenary of the isolation of denitrifying bacteria. *ASM News* 52(12): 627-629.
- Petersen, B., Gernaey, K. and Vanrolleghem, P.A. (2002). Anoxic activated sludge monitoring with combined nitrate and titrimetric measurements. *Water Science and Technology*, 45(4-5): 181-190.
- Pijuan, M., Guisasola, A., Baeza, J.A., Carrera, J., Casas, C. and Lafuente, J. (2006). Net P-removal deterioration in enriched PAO sludge subjected to permanent aerobic conditions. *Journal of Biotechnology*, 123: 117-126.
- Pijuan, M., Ye, L., and Yuan, Z. (2010). Free nitrous acid inhibition on the aerobic metabolism of poly-phosphate accumulating organisms. *Water Research*, 44(20): 6063-6072.
- Pijuan, M., Ye, L. and Yuan, Z. (2011). Could nitrite/free nitrous acid favour GAOs over PAOs in enhanced biological phosphorus removal systems? *Water Science and Technology*, 63(2): 345-351.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. and Laurinavichius, K. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6): 2109-2117.
- Piña-Ochoa, E., Hogslund, S., Geslin, E. and Risgaard-Petersen, N. (2010). Survival and life strategy of the foraminiferan *Globobulimina turgida* through nitrate storage and denitrification. *Marine Ecology Progress Series*, 417: 39-49.
- Poinapen, J., Ekama, G.A. and Wentzel, M.C. (2009). Biological sulphate reduction with primary sewage sludge in an upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor - Part 2: Modification of simple wet chemistry analytical procedures to achieve COD and S mass balances. *Water SA*, 35(5): 535-542.
- Postgate, J.R. (1965). Recent advances in the study of the sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological Reviews*, 29(4): 425-441.
- Postgate, J.R. (1984). *The Sulfate-Reducing Bacteria*. 2<sup>nd</sup> Edition, ISBN: 9780521257916, Cambridge University Press, UK.
- Puyol, D., Carvajal-Arroyo, J.M., Garcia, B., Sierra-Alvarez, R. and Field, J.A. (2013). Kinetic characterization of *Brocadia* spp.-dominated Anammox cultures. *Bioresource Technology*, 139: 94-100.
- Puyol, D., Carvajal-Arroyo, J.M., Sierra-Alvarez, R. and Field, J.A. (2014). Nitrite (not free nitrous acid) is the main inhibitor of the anammox process at common pH conditions. *Biotechnology Letters*, 36(3): 547-551.
- Rabus, R., Hansen, T.A. and Widdel, F. (2006). Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In: *The prokaryotes*, Vol. 2, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E. (Eds.), New York: Springer, pp: 659-768.
- Ramdani, A., Dold, P., Gadbois, A., Deleris, S., Houweling D. and Comeau, Y. (2012). Characterization of the heterotrophic biomass and the endogenous residue of activated sludge. *Water Research*, 46(3): 653-668.
- Rebac, S., Visser, A., Gerbens, S., van Lier, J.B., Stams, A.J.M. and Lettinga, G. (1996). The effect of sulphate on propionate and butyrate degradation in a psychrophilic anaerobic expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Environmental Technology*, 17(9): 997-1005.
- Reichenbecher, W. and Schink, B. (1997). *Desulfovibrio inopinatus* sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium that degrades hydroxyhydroquinone (1,2,4-trihydroxybenzene). *Archives of Microbiology*, 168: 338-344.
- Reiset, J. (1856). Experiences sur la putrefaction et sur la formation des fumiers. *Comptes rendus des séances hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 42: 177-180.
- Rikmann, E., Zekker, I., Tomingas, M., Tenno, T., Menert, A., Loorits, L. and Tenno, T. (2012). Sulfate-reducing anaerobic ammonium oxidation as a potential treatment method for high nitrogen-content wastewater. *Biodegradation*, 23: 509-524.
- Rintala, J.A. and Puhakka, J.A. (1994). Anaerobic treatment in pulp and paper-mill waste management: A review. *Bioresource Technology*, 47(1): 1-18.
- Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A.M., Ingvarsdén, S., Schmid, M. C., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H.J.M., Derksen, J.W.M., Piña-Ochoa, E., Eriksson, S.P., Nielsen, L.P., Revsbech, N.P., Cedhagen, T. and van der Zwaan, G. J. (2006). Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature*, 443(7107): 93-96.
- Robertson, L.A., Dalsgaard, T., Revsbech, N.P. and Kuenen, J.G. (1995). Confirmation of aerobic denitrification in batch cultures, using gas-chromatography and N-15 mass-spectrometry. *FEMS Microbiology Ecology*, 18(2): 113-119.

- Roeleveld, P.J. and van Loosdrecht, M.C.M. (2002). Experience with guidelines for wastewater characterisation in The Netherlands. *Water Science and Technology*, 45(6): 77-87.
- Rozzi, A., Castellazzi, L. and Speece, R.E. (2002). Acetoclastic methanogenic activity measurements by a titration biosensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1): 20-26.
- Rozzi, A., Castellazzi, L. and Speece, R.E. (2002). Acetoclastic methanogenic activity measurements by a titration biosensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1): 20-26.
- Rozzi, A., Ficara, E. and Rocco, A. (2003). DO-stat titration respirometry: principle of operation and validation. *ASCE-Journal of Environmental Engineering*, 129(7): 602-609.
- Rozzi, A., Massone, A. and Antonelli, M. (1997). A VFA measuring biosensor based on nitrate reduction. *Water Science and Technology*, 36(6-7): 183-189.
- Rubio-Rincon, F., Welles, L., López-Vázquez, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2017). Sulfide effects on the metabolism of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade I. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(4):1661-1672.
- Saad, S.A., Welles, L., López-Vázquez, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2013). Sulfide effects on the anaerobic kinetics of phosphorus-accumulating organisms. In: Proceedings of 13<sup>th</sup> World Congress on Anaerobic Digestion, 25-28<sup>th</sup> June, Santiago de Compostela, Spain.
- Saad, S.A., Welles, L., Abbas, B., López-Vázquez, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2016). Denitrification of nitrate and nitrite by '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' clade IC. *Water Research*, 105(15):97-109.
- Saito, T., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Research*, 38(17): 3760-3768.
- Sánchez, M., Mosquera-Corral, A., Mendez, R. and Lema, J.M. (2000). Simple methods for the determination of the denitrifying activity of sludges. *Bioresource Technology*, 75(1-6): 1-6.
- Saunders, A.M., Oehmen, A., Blackall, L.L., Yuan, Z. and Keller, J. (2003). The effect of GAOs on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR plants. *Water Science and Technology*, 47(11): 37-43.
- Scaglione, D., Buttiglieri, G., Ficara, E., Caffaz, S., Lubello, C. and Malpei, F. (2009). Microcalorimetric and manometric tests to assess anammox activity. *Water Science and Technology*, 60(10): 2705-2711.
- Schuler, A.J. and Jenkins, D. (2003). Enhanced biological phosphorus removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, part I: experimental results and comparison with metabolic models. *Water Environment Research*, 75(6): 485-498.
- Schlösing, T. and Müntz, A. (1877). Sur la nitrification par les ferments organiques. *Comptes rendus des séances hebdomadaires de l'Académie des Sciences*, 85: 301-303.
- Sin, G., Guisasola, A., De Pauw, D.J.W., Baeza, J.A., Carrera, J. and Vanrolleghem, P.A. (2003). A new approach for modelling simultaneous storage and growth processes for activated sludge systems under aerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(5): 600-613.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1994a). Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(6): 461-470.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1994b). Stoichiometric model of the aerobic metabolism of the biological phosphorus removal process. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(7): 837-848.
- Smolders, G.J.F., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1995). A metabolic model for the biological phosphorus removal process. *Water Science and Technology*, 31(2): 79-93.
- Strous, M., Heijnen, J.J., Kuenen, J.G. and Jetten, M.S.M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 589-596.
- Tang, K., Baskaran, V. and Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1): 73-94.
- Tang, C.-J., Zheng, P., Chen, T.-T., Zhang, J.-Q., Mahmood, Q., Ding, S., Chen, X.-G., Chen, J.-W., and Wu D.-T. (2011). Enhanced nitrogen removal from pharmaceutical wastewater using SBA-ANAMMOX process. *Water Research*, 45: 201-210.
- Thauer, R.K., Jungermann, K. and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41: 100-180.
- Thomas, M., Wright, P., Blackall, L.L., Urbain, V. and Keller, J. (2003). Optimisation of Noosa BNR plant to improve performance and reduce operating costs. *Water Science and Technology*, 47(12): 141-148.
- Udert, K.M., Kind, E., Teunissen, M., Jenni, S. and Larsen, T.A. (2008). Effect of heterotrophic growth on nitrification/anammox in a single sequencing batch reactor. *Water Science and Technology*, 58: 277-284.
- van de Graaf, A., De Bruijn, P., Robertson, L.A., Jetten, M.S.M. and Kuenen, J.G. (1996). Autotrophic growth of anaerobic ammonium oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 142(8): 2187-2196.
- van den Brand, T.P.H., Roest, K., Brdjanovic, D., Chen, G.-H. and van Loosdrecht, M.C.M. (2014a). Influence of acetate and propionate on sulphate-reducing bacteria activity. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6): 1839-1847.
- van den Brand, T.P.H., Roest, K., Chen, G.-H., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2014b). Temperature effect on acetate and propionate consumption by sulphate reducing bacteria in saline wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(9): 4245-4255.
- van den Brand, T.P.H., Roest, K., Chen, G.-H., Brdjanovic, D. and van Loosdrecht, M.C.M. (2015). Occurrence and activity of sulphate reducing bacteria in aerobic activated sludge systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3): 507-516.
- van Houten, R.T., van der Spoel, H., van Aelst, A.C., Hulshoff Pol, L.W. and Lettinga, G. (1996). Biological sulfate reduction using synthesis gas as energy and carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(2): 136-144.
- van Loosdrecht, M.C.M., Lopez-Vazquez, C.M., Meijer, S.C.F., Hooijmans, C.M., and Brdjanovic, D. (2015) Twenty-five years of ASM1: past, present and future of wastewater treatment modelling. *Journal of Hydroinformatics*, 17(5):697-718.
- van Loosdrecht, M.C.M., Pot, M.A. and Heijnen, J.J. (1997). Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Water Science and Technology*, 35(1): 41-47.
- van Niel, E.W.J., Arts, P.A.M., Wesselink, B.J., Robertson L.A. and Kuenen, J.G. (1993). Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, 102: 109-118.
- Vanrolleghem, P.A., Insel, G., Petersen, B., Sin, G., De Pauw, D., Nopens, I., Doverman, H., Weijers, S. and Gernaey, K. (2003). A comprehensive model calibration procedure for activated sludge models. In: Proceedings of the 76<sup>th</sup> Annual WEF Conference and Exposition, October 11-15, Los Angeles.
- Villa-Gomez, D., Ababneh, H., Papirio, S., Rousseau, D.P.L. and Lens, P.N.L. (2011). Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inverted fluidized bed reactors. *Journal of Hazardous Materials*, 192(1): 200-207.

- Villegas, J.D., de Laclós, H.F., Dovat, J., Membrez, Y. and Holliger, C. (2011). Nitrogen removal from digested manure in a simple one-stage process. *Water Science and Technology*, 63: 1991-1996.
- Vishniac, W. and Santer, M. (1957). *Thiobacilli. Bacteriological Reviews*, 21: 195-213.
- Vlekke, G.J.F.M., Comeau, Y. and Oldham W.K. (1988). Biological phosphate removal from wastewater with oxygen or nitrate in sequencing batch reactors. *Environmental Technology Letters*, 9: 791-796.
- Wachtmeister, A., Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M. and Heijnen, J.J. (1997). A sludge characterization assay for aerobic and denitrifying phosphorus removing sludge. *Water Research*, 31(3): 471-478.
- Wang, J., Lu, H., Chen, G.H., Lau, G.N., Tsang, W.L. and van Loosdrecht, M.C.M. (2009). A novel sulfate reduction, autotrophic denitrification, nitrification integrated (SANI) process for saline wastewater treatment. *Water Research*, 43(9): 2363-2372.
- Welles, L., López-Vázquez, C.M., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2014). Impact of salinity on the anaerobic metabolism of phosphate-accumulating organisms (PAO) and glycogen-accumulating organisms (GAO). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17): 7609-7622.
- Welles, L., López-Vázquez, C.M., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2015a). Impact of salinity on the aerobic metabolism of phosphate-accumulating organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8): 3659-3672.
- Welles, L., Tian, W.D., Saad, S., Abbas, B., López-Vázquez, C.M., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2015b). *Accumulibacter* clades Type I and II performing kinetically different glycogen-accumulating organisms metabolisms for anaerobic substrate uptake. *Water Research*, 15(83): 354-366.
- Welles, L., Abbas, B., López-Vázquez, C.M., Hooijmans, C.M., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2016). Metabolic response of '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' clade II to changes in P/C ratio in their environment. (submitted).
- Wentzel, M.C., Dold, P.L., Loewenthal, R.E., Ekama, G.A. and Marais, G.v.R. (1987). Experiments towards establishing the kinetics of biological excess phosphorus removal. In: Biological phosphate removal from wastewaters: Proceedings of an IAWPRC Specialized Conference, Rome, Italy, 28-30 September 28-30, 1987 (Pergamon Press, Vol. 4, p. 79).
- Wentzel, M.C., Comeau, Y., Ekama, G.A., van Loosdrecht, M.C.M. and Brdjanovic, D. (2008). Enhanced biological phosphorus removal. In: Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A. and Brdjanovic, D. (Eds.), ISBN: 9781843391883, IWA Publishing, London, UK.
- Wentzel, M.C., Lötter, L.H., Loewenthal, R.E. and Marais, G.v.R. (1986). Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal- a biochemical model. *Water SA*, 12(4): 209-224.
- Wentzel, M.C., Mbewe, A. and Ekama, G.A. (1995). Batch tests for measurement of readily biodegradable COD and active organism concentrations in municipal waste waters. *Water SA*, 21(2): 117-124.
- WERF. (2003). Methods for wastewater characterization in activated sludge modeling. - Water Environment Research Foundation report 99-WWF-3, ISBN13: 9781843396628. WERF (Alexandria) and IWA Publishing (London), pp. 575
- Wett, B. (2007). Development and implementation of a robust deammonification process. *Water Science and Technology*, 56(7): 81-88.
- Widdel, F. (2006). The genus *Desulfotomaculum*. In: The prokaryotes, Vol. 2, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds.), New York: Springer, pp: 787-794.
- Wiesmann, U. (1994). Biological nitrogen removal from wastewater. In: Advances in biochemical engineering/biotechnology, Fiechter, A. (Ed.), ISBN-13: 978-1843396628, Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 113-154.
- Wik, T. and Breitholtz, C. (1996). Steady-state solution of a two-species biofilm problem. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(6): 675-686.
- Winogradsky, M.S. (1890). Reserches sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'institut Pasteur*, 4: 213-231.
- Winogradsky, M.S. (1892). Contribution à la morphologie des organismes de la nitrification. *Archives of Biological Sciences*, 1: 87-137.
- Wu, D., Ekama, G.A., Wang, H.G., Wei, L., Lu, H., Chui, H.K., Liu, W.T., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M. and Chen, G.H. (2014). Simultaneous nitrogen and phosphorus removal in the sulphur cycle-associated Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) process. *Water Research*, 49: 251-264.
- Yamamoto, R.I., Komori, T. and Matsui, S. (1991). Filamentous bulking and hindrance of phosphate removal due to sulfate reduction in activated sludge. *Water Science and Technology*, 23(4-6): 927-935.
- Yang, Z., Zhou, S. and Sun, Y. (2009). Start-up of simultaneous removal of ammonium and sulfate from an anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in an anaerobic up-flow bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 113-118.
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Saito, T. and Tanaka, K. (2006). The effect of nitrite on aerobic phosphate uptake and denitrifying activity of phosphate-accumulating organisms. *Water Science and Technology*, 53(6): 21-27.
- Zeng, R.J., van Loosdrecht, M.C.M., Yuan, Z. and Keller, J. (2003a). Metabolic model for glycogen-accumulating organisms in anaerobic/aerobic activated sludge systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(1): 92-105.
- Zeng, R.J., Saunders, A.M., Yuan, Z., Blackall, L.L. and Keller, J. (2003b). Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2): 140-148.
- Zeng, W., Li, B., Yang, Y., Wang, X., Li, L. and Peng, Y. (2014). Impact of nitrite on aerobic phosphorus uptake by polyphosphate accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal sludges. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(2): 277-287.
- Zhou, Y., Pijuan, M. and Yuan, Z. (2007). Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by polyphosphate accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4): 903-912.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Lu, H. and Yuan, Z. (2008). Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)? *Water Research*, 42(10): 2361-2368.
- Zhou, Y., Ganda, L., Lim, M., Yuan, Z. and Ng, W.J. (2012). Response of poly-phosphate accumulating organisms to free nitrous acid inhibition under anoxic and aerobic conditions. *Bioresource Technology*, 116: 340-347.
- Zietz, U. (1995). The formation of sludge bulking in the activated sludge process. *European Water Pollution Control*, 5: 21-27.
- Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 533-616.

# RESPIROMETRÍA

Autores:

Henri Spanjers

Peter A. Vanrolleghem

Revisores:

George A. Ekama

Mathieu Spérandio

## 3.1 INTRODUCCIÓN

El objetivo de este capítulo es proporcionar una guía práctica para el estudio de la velocidad (o tasa cinética) de respiración de biomasa. El capítulo tendrá un enfoque práctico dirigido hacia la presentación de métodos para la ejecución de pruebas respirométricas, aunque al inicio es necesario presentar algunos fundamentos bioquímicos que permiten una mejor comprensión de la relación entre respiración, consumo de sustrato y crecimiento de biomasa. Quedará en evidencia cómo la respiración puede ser evaluada en términos de la velocidad de consumo del último aceptor de electrones, tales como oxígeno molecular o nitrato, o en el caso de la respiración anaerobia, en términos de la velocidad de producción de metano o de sulfuro. La medición de las velocidades de consumo o producción (que es la respirometría) se explicará siguiendo varios principios de medición, y serán proporcionadas algunas recomendaciones prácticas. Así mismo se hará hincapié en las pruebas de laboratorio utilizando muestras de biomasa y de aguas residuales. La mayoría de los principios de medición pueden ser automatizados; además es posible utilizar respirómetros comerciales ya automatizados, capaces de medir la tasa de respiración de forma automática o incluso en línea en plantas de tratamiento de agua residual (PTARs). Sin embargo, la

medición en línea de tasas de respiración está fuera del alcance de este libro. Hay un método específico, basado en el análisis de corrientes de gases de salida, que proporciona una manera adecuada para evaluar las velocidades de respiración en plantas de tratamiento de agua residual a escala piloto o a escala real. Este método es descrito en el Capítulo 4.

La información que es posible extraer de las mediciones respirométricas puede dividirse en dos tipos: directa e indirecta (Spanjers *et al.*, 1998). La información directa, como es la velocidad de respiración aerobia o la actividad metanogénica específica, proporciona información sobre la actividad real de la biomasa y puede obtenerse, por ejemplo, al registrar los respirogramas (series temporales de las velocidades de respiración) en el laboratorio. La información indirecta se refiere a las variables que pueden ser deducidas de las mediciones respirométricas, como la concentración de microorganismos, la concentración del sustrato y los parámetros cinéticos. En este caso, las mediciones respirométricas se utilizan como datos de entrada para cálculos aritméticos simples, o frecuentemente para el ajuste de modelos. El Capítulo 5 describe la manera en la que los datos



respirométricos pueden utilizarse para el ajuste de modelos para evaluar variables y parámetros.

Debido a que el objetivo de este capítulo es proporcionar sólo guías prácticas para la evaluación de las tasas de respiración, sólo se brindará una explicación básica del antecedente bioquímico. El lector puede acudir a la bibliografía sobre bioquímica para mayor información (Alberts *et al.*, 2002; Nelson y Cox, 2008). Dado que las guías prácticas se centran en los métodos respirométricos que pueden llevarse a cabo fácilmente en la mayoría de los laboratorios, no se presenta una discusión rigurosa de todos los principios de la medición respirométrica. Puede acudir a Spanjers *et al.* (1998) para una descripción más completa de los conceptos relacionados. Para una discusión del uso de la información respirométrica directa e indirecta en el control de procesos de lodo activado, el lector puede consultar el artículo publicado por Copp *et al.* (2002).

### 3.1.1 Aspectos básicos de la respiración

En términos bioquímicos, la respiración microbiana es el proceso metabólico generador de trifosfato de adenosina (ATP o adenosín trifosfato) en el que compuestos orgánicos o inorgánicos sirven como donantes de electrones mientras que compuestos inorgánicos sirven como el último aceptor o aceptor final de electrones (por ejemplo, oxígeno, nitrato, sulfato). El ATP, el portador universal de energía, se genera cuando los electrones extraídos del donante son transferidos a través de la cadena de transporte de electrones, de un portador metabólico al siguiente y eventualmente, al aceptor final de electrones. De esta manera, los microorganismos transforman la energía de los enlaces intramoleculares del donante de electrones a enlaces de fosfato de alta energía contenidos en el ATP (catabolismo). La energía se utiliza entonces para sintetizar los diversos componentes moleculares necesarios para el crecimiento celular (anabolismo), el mantenimiento y la reproducción.

Durante el proceso de respiración el donante de electrones se convierte en su forma oxidada y el aceptor de electrones se convierte en su forma reducida. En el caso de un donante carbonoso (compuestos orgánicos), su forma oxidada es dióxido de carbono. Si el aceptor de electrones es oxígeno molecular, entonces su forma reducida es el agua. La conversión de un donante

carbonoso mediante oxígeno como aceptor de electrones, es llevada a cabo por bacterias heterótrofas.

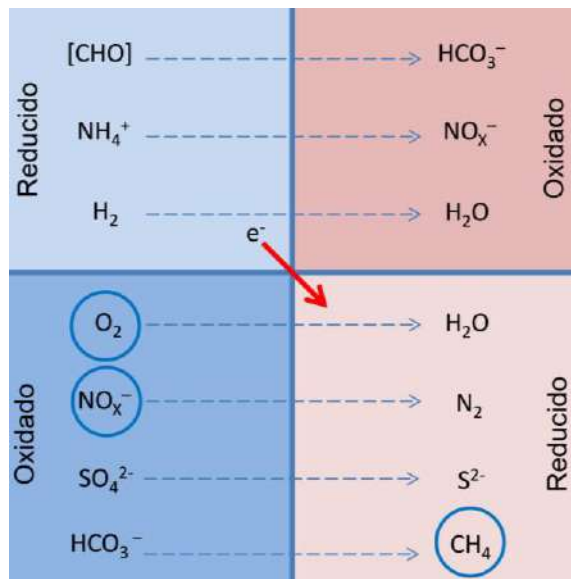
Los donantes inorgánicos que se convierten en su forma oxidada por microorganismos aerobios, donde el oxígeno sirve como aceptor último de electrones, incluyen el amonio y el nitrito, hierro divalente y sulfuro. Las conversiones son llevadas a cabo por organismos nitrificantes (bacterias oxidantes del amonio y del nitrito), organismos oxidantes del hierro y organismos oxidantes de sulfuros, respectivamente. En estos casos el CO<sub>2</sub> constituye la fuente de carbono, y los organismos se llaman autótrofos. Los microorganismos no aerobios usan como último aceptor de electrones compuestos inorgánicos diferentes del oxígeno como el nitrito, el nitrato, el sulfato y el dióxido de carbono. En estos casos se habla de procesos anóxicos (nitrito, nitrato) y anaerobios (CO<sub>2</sub>, sulfato). Observe que en el tratamiento de aguas residuales varios procesos de respiración pueden ocurrir simultáneamente, cuando diferentes microorganismos utilizan diversos sustratos y diferentes últimos aceptores de electrones, o compiten por los mismos sustratos y aceptores finales de electrones.

La Figura 3.1 muestra una descripción esquemática de algunos ejemplos de conversiones metabólicas. Observe que tanto el donante de electrones como el último aceptor, pueden ser considerados como sustratos, al igual que muchos otros componentes que entran en las rutas metabólicas. En respirometría, la respiración se considera generalmente como el consumo de O<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o (en respirometría anaeróbica) la producción de CH<sub>4</sub>. En términos generales, las conversiones metabólicas implicadas en la respiración son reacciones catabólicas, y varios compuestos gaseosos consumidos o producidos durante estas reacciones pueden usarse para evaluar las conversiones metabólicas claves. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en principio, también pueden considerarse otras sustancias, como el consumo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, HS<sup>-</sup>, S<sub>2</sub><sup>-</sup> o SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, o la producción de N<sub>2</sub>. Otros productos que no aparecen incluidos en la figura, pero que también están relacionados con la respiración, incluyen H<sup>+</sup> y el calor, y los métodos asociados son la titrimetría y la calorimetría, respectivamente. Sin embargo, estos últimos están fuera del alcance de este capítulo.

Debido a que la energía generada durante el proceso de respiración microbiana se utiliza para el crecimiento



celular y las funciones de mantenimiento (tales como la reproducción, la movilidad celular, la actividad osmótica, etc.), la velocidad de respiración está relacionada con la velocidad de estos procesos. Sin embargo, es difícil diferenciar entre ellos. Por ejemplo, considere la respiración aeróbica de microorganismos heterótrofos que usan sustrato carbonoso (orgánico) como donante de electrones y oxígeno como último receptor. Solamente una parte (1-Y) del sustrato orgánico consumido se oxida para proporcionar energía para el crecimiento y mantenimiento de las células. El resto Y (rendimiento de crecimiento de biomasa), típicamente la mitad (en peso / peso) de las moléculas de sustrato se convierte en nueva masa celular. Por lo tanto, la velocidad de consumo de oxígeno está relacionada con el crecimiento de la biomasa a través del rendimiento. En la respiración anaeróbica de metanógenos hidrogenotróficos, donde el sustrato  $H_2$  se utiliza como donante de electrones y el  $CO_2$  como receptor, sólo una pequeña porción de (Y) del sustrato se convierte en biomasa, mientras que la mayor parte se oxida para producir  $CH_4$ .

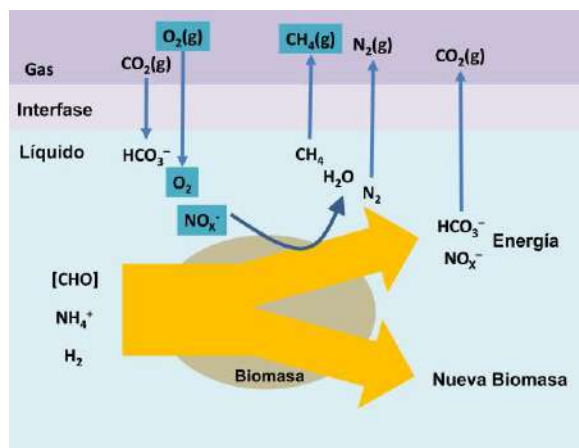


**Figura 3.1** Vista esquemática de algunos ejemplos de conversiones metabólicas. La notación  $e^-$  indica el electrón que se transfiere desde el donante al último receptor de electrones.  $[CHO]$  indica cualquier carbohidrato. Las sustancias marcadas con círculos se utilizan generalmente como variables medidas en respirometría.

biomasa heterótrofa, existen otros procesos biológicos que pueden contribuir a la respiración de los lodos activados, como la oxidación de compuestos inorgánicos por organismos nitrificantes y otras bacterias, y reacciones de oxidación microbiana específicas catalizadas por oxidasas y mono-oxigenasas. Las bacterias nitrificantes incorporan sólo una pequeña parte del sustrato amonio en la nueva biomasa, mientras que la mayor parte del sustrato (amonio) se oxida para la producción de energía. Estas bacterias autótrofas usan dióxido de carbono disuelto como fuente de carbono para la nueva biomasa. En comparación con la biomasa heterótrofa, las nitrificantes necesitan más oxígeno para su crecimiento. La nitrificación se produce en dos etapas: la oxidación del amonio a nitrito y la oxidación del nitrito a nitrato. Al igual que las nitrificantes, las bacterias autótrofas oxidantes del azufre y las bacterias oxidantes del hierro utilizan compuestos inorgánicos en lugar de compuestos orgánicos para obtener energía y utilizan dióxido de carbono o carbonato como fuente de carbono. Las bacterias oxidantes del azufre son capaces de oxidar el sulfuro de hidrógeno (u otros compuestos de azufre reducido) en ácido sulfúrico. Las bacterias oxidantes del hierro oxidan el hierro ferroso inorgánico a la forma férrica para obtener energía. Además de las bacterias, los protozoos y otros organismos superiores están presentes en el lodo activado, y también consumen oxígeno. Finalmente, algunos donantes de electrones inorgánicos tales como el hierro ferroso y el sulfuro pueden oxidarse químicamente, utilizando (consumiendo) también oxígeno.

Todos los procesos de consumo de oxígeno mencionados anteriormente contribuyen a la velocidad de respiración total del lodo activado. La respirometría suele estar destinada a medir sólo el consumo biológico de oxígeno y a veces se intenta distinguir entre diferentes procesos biológicos como la oxidación heterótrofa y la nitrificación. Sin embargo, en muchos casos es difícil distinguir entre procesos microbianos específicos e identificar el consumo químico de oxígeno.

En el sistema de lodos activados, la eliminación del sustrato carbonoso no es el único proceso que consume oxígeno. Además del consumo de oxígeno por la



**Figura 3.2** Relación entre respiración, utilización de sustrato y crecimiento para tres tipos de sustrato ( $[CHO]$ ,  $NH_4^+$  e  $H_2$ ) y aceptor de electrón relacionado ( $O_2$ ,  $NO_3^-$  e  $HCO_3^-$ ) (Spanjers *et al.*, 1998).

### 3.1.2 Aspectos básicos de la respirometría

La respirometría se define generalmente como la medición e interpretación de la velocidad de consumo biológico de un aceptor de electrones inorgánico bajo condiciones experimentales bien definidas. En principio, todas las sustancias representadas como formas oxidadas de sustrato en la Figura 3.1, y más particularmente las destacadas con círculos, pueden servir como variable de respuesta medible. Una excepción es la respirometría anaerobia en la que generalmente se mide la velocidad de producción del producto final reducido (metano). Esto se debe a que durante la degradación anaerobia están implicados varios pasos intermedios y no resulta práctico medir la velocidad de consumo de los sustratos intermedios. Además, la metanogénesis generalmente no es la etapa limitante de la velocidad del proceso; la velocidad de generación de metano es un reflejo del proceso limitante (el cual, en el caso de un sustrato complejo, es comúnmente la hidrólisis).

En principio también se puede medir la velocidad de consumo del donante de electrones, tal como  $[CHO]$ ,  $NH_4^+$  y  $H_2$ . Sin embargo, esto generalmente no se considera como respirometría, porque las sustancias donantes de electrones como  $CHO$  y  $NH_4^+$  también pueden ser consumidas por procesos no relacionados directamente con la generación de energía. Por ejemplo, la absorción en la biomasa que no está claramente relacionada con la generación de energía. Por último, la medición de la producción de  $CO_2$  puede considerarse respirometría porque si está relacionada con la

generación de energía (Figura 3.2). Sin embargo, debido a que el  $CO_2$  en la fase gaseosa está asociado con el sistema del carbonato, se necesitarán mediciones adicionales para conocer el pH y la concentración de bicarbonato en la fase líquida.

La respirometría siempre implica alguna técnica para evaluar la velocidad a la que la biomasa consume el aceptor de electrones del líquido (como  $O_2$  y  $NO_3^-$ ) o produce su forma reducida (tal como  $CH_4$ ) (ver la Figura 3.2). Para aceptores de electrones tales como  $O_2$  y  $NO_3^-$  esto se basa generalmente en medir la concentración del aceptor de electrones en la fase líquida y resolver su balance de masa para obtener la velocidad de respiración. Si se mide el consumo de oxígeno y existe una fase gaseosa, entonces también se tiene que considerar el balance de masas de oxígeno en la fase gaseosa. De manera similar, si se mide la velocidad de producción de metano, se tiene que considerar el balance de masas del metano tanto en la fase líquida como en la fase gaseosa.

Para la respirometría aerobia donde se trata de medir el consumo de  $O_2$  de las bacterias, Spanjers *et al.* (1998) presentaron una clasificación de principios respirométricos basándose en dos criterios simples: el primero es la ubicación de la medición de oxígeno: en el medio líquido o en el medio gaseoso; y el segundo es el estado de las fases gaseosa y líquida: ya sea con el líquido fluyendo (dinámico) o el líquido estático. Se encontró que la mayoría de los dispositivos respirométricos propuestos podían clasificarse en alguna de las ocho clases creadas por esta estructura. Además, en la literatura se encontraron varios ejemplos de implementación para cada una de las clases.

## 3.2 METODOLOGÍA GENERAL DE LA RESPIROMETRÍA

### 3.2.1 Fundamentos de la metodología respirométrica

La velocidad de respiración se mide generalmente con un respirómetro. Los respirómetros pueden ser desde un simple frasco equipado con un sensor, hasta instrumentos más sofisticados que funcionan de forma totalmente automática. En algunos casos, el bioreactor de la propia planta de tratamiento puede servir como un

respirómetro. A excepción de este último, una característica común de todos los respirómetros es que cuentan con un recipiente de reacción (diferente al bioreactor de la planta), en el que entran en contacto los diferentes componentes del proceso biológico (biomasa, sustrato, etc.). El funcionamiento de todos los respirómetros involucra algún procedimiento para evaluar la velocidad a la cual la biomasa remueve o produce un componente del líquido (Figura 3.2). Se han desarrollado varios procedimientos en el pasado. Sin embargo, Spanjers *et al.* (1998) encontraron que todos los procedimientos de medición de la velocidad de respiración pueden clasificarse en sólo ocho principios básicos de acuerdo con dos criterios: (1) la fase donde se mide la concentración (gas o líquido, G y L, respectivamente) y (2) si existe o no alguna entrada y/o salida de líquido y gas (fluyendo o estático, F y E, respectivamente). El funcionamiento de todos los respirómetros existentes se puede explicar en función de estos criterios. La Figura 3.3 muestra un esquema genérico de un respirómetro. Tenga en cuenta que la noción de fase gaseosa también incluye burbujas dispersas en una fase líquida. En las secciones siguientes, los principios se discutirán de acuerdo con los criterios anteriores. Considerando que todos los procedimientos tienen sus méritos dependiendo de la aplicación específica, siempre que se cumplan las condiciones de medición correctas, no se discutirá de manera particular la utilidad de alguno de ellos.

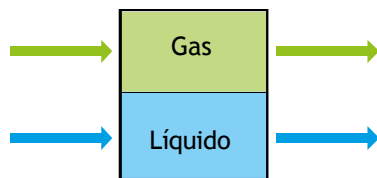


Figura 3.3 Esquema genérico de un respirómetro.

## 3.2.2 Principios generales: más allá del oxígeno

### 3.2.2.1 Principios de respirómetros basados en mediciones realizadas en la fase líquida

La mayoría de los procedimientos basados en mediciones realizadas en la fase líquida utilizan un electrodo o sensor específico. Una medición confiable de la velocidad (tasa cinética) de respiración sólo es posible si el sensor está calibrado correctamente y si se

tienen en cuenta diversas variables ambientales, como la temperatura y la presión. Los sensores o electrodos también tienen un tiempo de respuesta que debe tomarse en cuenta en algunas configuraciones respirométricas.

Los respirómetros que se basan en la medición de la concentración de oxígeno disuelto (OD) en la fase líquida usan el balance de masas de OD en la fase líquida. Considere un sistema que consiste en una fase líquida, que contiene biomasa, y una fase gaseosa, ambas perfectamente mezcladas y teniendo una entrada y una salida para cada fase (Figura 3.4). Se supone que se puede medir la concentración de OD en la fase líquida. El balance de masas de OD sobre la fase líquida es por consiguiente:

$$\frac{d(V_L \cdot S_{O_2})}{dt} = Q_{in} \cdot S_{O_{2,in}} - Q_{out} \cdot S_{O_2} + V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - V_L \cdot r_{O_2} \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde,  $S_{O_2}$  es la concentración de OD en la fase líquida ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $S_{O_2}^*$  es la concentración de saturación de OD en la fase líquida ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $S_{O_{2,in}}$  es la concentración de OD en la fase líquida que ingresa al sistema ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $kLa$  es el coeficiente de transferencia de oxígeno basado en el volumen de líquido ( $\text{h}^{-1}$ ),  $Q_{in}$  es el flujo volumétrico del líquido que ingresa al sistema ( $\text{L h}^{-1}$ ),  $Q_{out}$  es el flujo volumétrico del líquido que sale del sistema ( $\text{L h}^{-1}$ ),  $r_{O_2}$  es la velocidad de respiración de la biomasa en el líquido ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), y  $V_L$  es el volumen de la fase líquida (L).

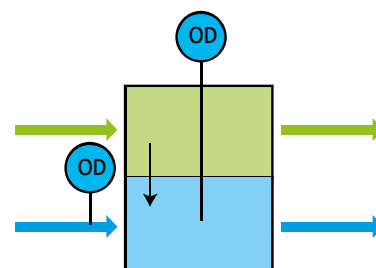


Figura 3.4 Principio de medición en fase líquida, con flujos continuos tanto del gas como del líquido (LFF).

Observe que, puesto que es un balance de masa sobre la fase líquida, la Ec. 3.1 no contiene términos de los flujos de gas entrante y saliente. El primer y segundo término en el lado derecho de la expresión representan los flujos advectivos de OD en las corrientes de entrada y salida de líquido. En la mayoría de los sistemas, los flujos de entrada y salida del líquido son iguales,

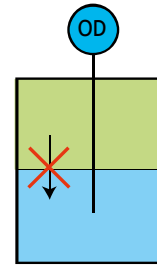
haciendo que el volumen de líquido en el reactor sea constante. El tercer término describe la transferencia de masa de oxígeno desde la fase gaseosa hacia la fase líquida. El último término ( $O_2$  consumido) contiene la velocidad de respiración que se obtiene del balance de masas. Por lo tanto, debe medirse  $S_O$  y los restantes coeficientes deben ser conocidos o despreciados (cuando no tienen ninguna influencia). En la práctica, la determinación de  $r_{O_2}$  puede simplificarse de varias maneras. Además, se supone que el volumen de líquido es constante, de modo que los términos de la Ec. 3.1 pueden dividirse por  $V_L$ .

- **Gas estático, líquido estático (LEE)**

Una estrategia consiste en usar un método sin flujo de líquido y sin transferencia de oxígeno (Figura 3.5). Entonces los tres primeros términos en el lado derecho de la Ec. 3.1 se eliminan y el balance de masa se reduce a:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = -r_{O_2} \quad \text{Ec. 3.2}$$

Entonces, para obtener la velocidad de respiración solamente debe determinarse el término diferencial. Esto puede hacerse midiendo el decrecimiento de la concentración de OD en función del tiempo debido a la respiración, lo que es equivalente a la aproximación del término de diferencia finita:  $\Delta S_{O_2}/\Delta t = -r_{O_2}$ . Típico de este proceder es que el OD puede llegar a agotarse después de algún tiempo, de manera tal que para continuar la lectura de  $r_{O_2}$  es necesario re-airear para llevar la concentración de OD de nuevo a un nivel más alto. Los niveles de OD y de sustrato limitan la respiración cuando sus concentraciones se vuelven demasiado bajas, causando una disminución no lineal de OD que complica la evaluación del término diferencial. Observe que en la Figura 3.5 hay una fase gaseosa. Sin embargo, se supone que no hay transferencia de masa desde la fase gaseosa hacia la fase líquida. En la práctica, para evitar la entrada de oxígeno en el líquido, la fase gaseosa puede estar ausente. El procedimiento para la determinación de  $r_{O_2}$  de acuerdo con los métodos estandarizados ("Standard Methods") (APHA *et al.*, 2012) se basa en este principio.



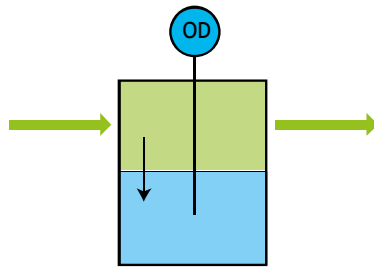
**Figura 3.5** Principio de medición en fase Líquida, con gas Estático (sin flujo durante la medición en la fase gaseosa) y líquido Estático (LEE).

- **Gas fluyendo, líquido estático (LFE)**

La desventaja de la necesidad de acudir a re-aireaciones puede eliminarse si la biomasa se airea continuamente (Figura 3.6). En este caso, el término de transferencia de masa de oxígeno  $kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2})$  debe incluirse en el balance de masas (Ec. 3.3):

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Para obtener  $r_{O_2}$ , deben determinarse tanto el término diferencial como el término de transferencia de masa. Para calcular este último, se debe conocer el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $kLa$ ) y la concentración de saturación de OD ( $S_{O_2}^*$ ). Estos coeficientes tienen que ser determinados regularmente porque dependen de condiciones ambientales tales como temperatura, presión barométrica y las propiedades del líquido (viscosidad, salinidad, etc.). El enfoque más sencillo consiste en determinar éstos mediante pruebas de aireación y consulta de tablas de referencia. Otro enfoque es estimar los coeficientes de transferencia de OD mediante la aplicación de técnicas de estimación de parámetros, utilizando como datos los perfiles dinámicos (OD-tiempo) durante la fase de aireación. La ventaja de este último método es que los valores de los coeficientes de aireación se pueden actualizar con relativa facilidad. Una variante de este procedimiento respirométrico para la medición de  $r_{O_2}$  consiste en mantener la concentración de OD a un nivel casi constante, eliminando así la dependencia de  $r_{O_2}$  en la concentración de OD (siempre con  $OD \gg 0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Observe que, mientras que en la Figura 3.6 se aprecia una entrada y una salida en la fase gaseosa, no hay término de flujo advectivo de gas en la Ec. 3.3 (balance en el líquido).

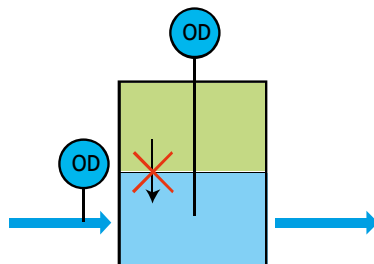


**Figura 3.6** Principio de medición en fase Líquida, con gas Fluyendo y líquido Estático (LFE).

- **Gas estático, líquido fluyendo, (LEF)**

La necesidad de re-aireaciones y las estimaciones repetitivas de los coeficientes de transferencia pueden evitarse cuando el líquido con una alta concentración de OD fluye continuamente a través de una celda respirométrica cerrada y completamente mezclada, en ausencia de fase gaseosa libre (Figura 3.7). Ahora el término correspondiente al líquido fluyendo tiene que ser incluido en el balance de masas (Ec. 3.4):

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = \frac{Q_{in}}{V_L} \cdot S_{O_{2,in}} - \frac{Q_{out}}{V_L} \cdot S_{O_2} - r_{O_2} \quad \text{Ec. 3.4}$$



**Figura 3.7** Principio de medición en fase Líquida, con gas Estático (sin suministro de gas) y líquido Fluyendo (LEF).

Ambas concentraciones de OD ( $S_{O_{2,in}}$  y  $S_{O_2}$ ) deben ser medidas para poder calcular  $r_{O_2}$ . En un determinado respirómetro,  $Q_{in}$  y  $V_L$  son características constantes con valores supuestamente conocidos o calibrados. De hecho, el principio de este método es la contrapartida de otro explicado anteriormente con la Ec. 3.2 y por tanto también sensible al efecto de las condiciones limitantes del sustrato y OD. Sin embargo, el efecto de las limitaciones puede eliminarse a través del suministro constante de sustrato (agua residual) y OD al respirómetro.

- **Gas fluyendo, líquido fluyendo, (LFF)**

Conforme al esquema de la Figura 3.4, la ecuación aplicable para este principio es el balance de masas

completo (Ec. 3.1) sin las simplificaciones anteriores. Para poder medir la velocidad de respiración bajo este principio, se hace necesario combinar un conjunto de requerimientos mencionados en los métodos simplificados anteriores. Por ejemplo, deben medirse la velocidad de flujo y la concentración de oxígeno que ingresan, mientras que los parámetros  $kLa$  y  $S_{O_2}^*$  deben ser evaluados, estimándolos por ejemplo a partir de la dinámica de la concentración de OD.

### 3.2.2.2 Principios de respirómetros basados en mediciones realizadas en la fase gaseosa

Las técnicas respirométricas basadas en la medición del oxígeno en la fase gaseosa siempre prestan atención a las dos fases: la fase líquida que contiene la biomasa cuya velocidad de respiración se desea medir, y la fase gaseosa donde tiene lugar la medición del oxígeno. La principal razón para medir el oxígeno en la fase gaseosa es para superar las dificultades asociadas con componentes comúnmente presentes en la fase líquida que producen interferencia en las mediciones (por ejemplo, la formación de biopelículas de la biomasa o de aceite en el sensor, o la presencia de agua residual con muy alta conductividad). El oxígeno gaseoso se mide mediante métodos físicos tales como el método paramagnético o los métodos gasométricos.

Los métodos gasométricos miden los cambios en la concentración de oxígeno en el medio gaseoso. La concentración de  $O_2$  puede estimarse con base en la ley de gases ideales  $P \cdot V = n \cdot R \cdot T$ , a partir de los cambios medidos en la presión (si el volumen se mantiene constante, método manométrico) o de cambios en el volumen (si la presión se mantiene constante, método volumétrico). Estos métodos se aplican típicamente a sistemas de medición cerrados (sin flujos de entrada ni de salida), lo que puede provocar la necesidad de re-aireación y, por tanto, interrupción temporal de las mediciones. Esto limita la posibilidad de un seguimiento continuo de la velocidad de respiración. Sin embargo, si el oxígeno consumido se repone a una velocidad conocida, (suminiendo oxígeno puro desde un depósito o utilizando electrólisis), no requiere interrumpir la operación para llevar a cabo la re-aireación. La velocidad a la que se suministra el oxígeno es entonces equivalente a la velocidad de respiración biológica (suponiendo una transferencia de masa infinitamente rápida al líquido). Debido a que el dióxido de carbono se libera de la fase líquida como resultado de la actividad biológica, este gas tiene que ser retirado de



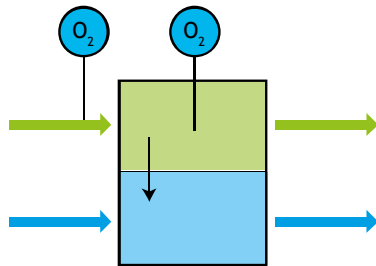
la fase gaseosa para evitar interferencias con la medición de oxígeno. En la práctica, esto se hace usando un álcali para absorber químicamente el dióxido de carbono producido.

Los principios respirométricos basados en la medición de oxígeno en la fase gaseosa también usan balances de masas para obtener la velocidad de respiración. Sin embargo, además del balance de masas en la fase líquida (Ec. 3.1), también debe considerarse el balance en la fase gaseosa (mezclada idealmente) (Figura 3.8):

$$\frac{d}{dt}(V_G \cdot C_{O_2}) = F_{in} \cdot C_{O_2,in} - F_{out} \cdot C_{O_2} - V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2})$$

Ec. 3.5

Donde,  $C_{O_2}$  es la concentración de  $O_2$  en la fase gaseosa ( $mg L^{-1}$ ),  $C_{O_2,in}$  es la concentración de  $O_2$  en el gas que entra al sistema ( $mg L^{-1}$ ),  $F_{in}$  es el flujo de aire ( $L h^{-1}$ ) que entra al sistema,  $F_{out}$  es el flujo de aire ( $L h^{-1}$ ) que sale del sistema, y  $V_G$  es el volumen de la fase gaseosa (L).



**Figura 3.8** Principio de medición en fase Gaseosa, con el gas y el líquido fluyendo (GFF).

El término  $V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2})$  representa la velocidad de transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase líquida y es el vínculo entre las dos fases. De los balances de masas (Ec. 3.1 y Ec. 3.5) se desprende que, para poder calcular el valor de  $r_{O_2}$ , debe medirse el  $C_{O_2}$  (directamente o aplicando la ley de gases ideales) y también es necesario conocer la concentración de  $S_{O_2}$ . Sin embargo, el  $S_{O_2}$  no se mide cuando se utiliza este esquema de respirometro. En este caso se asume que las concentraciones de oxígeno en la fase gaseosa y fase líquida están en equilibrio, esto es, que la transferencia de masas es lo suficientemente rápida ( $kLa \rightarrow \infty$ ), para que  $S_{O_2} \approx S_{O_2}^*$ .

Como por definición, la concentración de saturación de OD en el líquido es proporcional a la concentración de  $O_2$  en la fase gaseosa, se puede asumir que:

$$S_{O_2}^* = H \cdot C_{O_2}$$

Ec. 3.6

resultando razonable afirmar que:

$$S_{O_2} = H \cdot C_{O_2}$$

Ec. 3.7

y que:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = H \cdot \frac{dC_{O_2}}{dt}$$

Ec. 3.8

Entonces, la medición en la fase gaseosa es una buena representación de las condiciones en la fase líquida, siempre y cuando la constante de proporcionalidad  $H$  (constante de la ley de Henry) es conocida (por calibración o de tablas), y que el coeficiente de transferencia de masa sea suficientemente alto. La validez de esta suposición de equilibrio debe ser evaluada críticamente.

- **Gas estático, líquido estático (GEE)**

La técnica más sencilla de medición de la tasa de respiración vía la fase gaseosa se basa en un esquema de gas y líquido estáticos (GEE), es decir no hay entrada ni salida de gas, ni de líquido (Figura 3.9). En esta variante, además del balance de OD en la fase líquida debe considerarse el balance en la fase gaseosa.

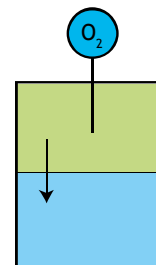
$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2}$$

Ec. 3.9

$$\frac{d(V_G \cdot C_{O_2})}{dt} = -V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2})$$

Ec. 3.10

Entonces, para calcular la tasa  $r_{O_2}$ , debe medirse la variación de la concentración de oxígeno en la fase gaseosa,  $dC_{O_2}/dt$ , además de que se requiere conocer  $dS_{O_2}/dt$  de la fase líquida (Ec. 3.9). Es posible medir  $dC_{O_2}/dt$  utilizando un sensor de oxígeno. Si se emplea el método gasométrico, el valor de  $dC_{O_2}/dt$  se relaciona con un cambio de volumen o de presión (Ec. 3.10).



**Figura 3.9** Principio de medición en fase Gaseosa, con gas y líquido Estáticos para ambos (GEE).

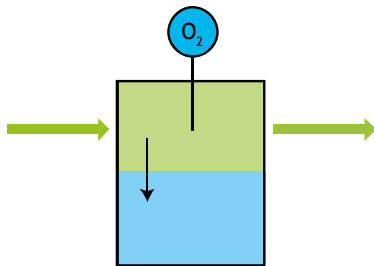
Este principio de medición, presenta la misma restricción que el más sencillo de los esquemas basados en el principio de medición del OD en el líquido: cuando el oxígeno disuelto se agota, debe ser renovado nuevamente para poder continuar con la medición de  $r_{O_2}$ .

- **Gas fluyendo, líquido estático (GFE)**

Otro procedimiento se basa en mantener la fase gaseosa fluyendo. Esto es, la biomasa es continuamente aireada (con aire u oxígeno puro), de manera tal que se garantiza la presencia de suficiente oxígeno para ella (Figura 3.10). En comparación con la Ec. 3.10, deben incluirse dos términos de transporte en el balance de masas de la fase gaseosa (Ec. 3.12):

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2} \quad \text{Ec. 3.11}$$

$$\frac{d(V_G \cdot C_{O_2})}{dt} = F_{in} \cdot C_{O_2,in} - F_{out} \cdot C_{O_2} - V_L \cdot kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) \quad \text{Ec. 3.12}$$

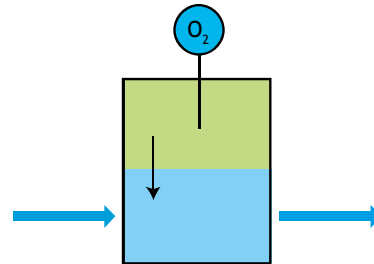


**Figura 3.10** Principio de medición en fase Gaseosa, con gas Fluyendo y líquido Estático (GFE).

Para permitir el cálculo de  $r_{O_2}$ , deben conocerse la velocidad de flujo de gas,  $F_{in}$  y  $F_{out}$ , y la concentración de oxígeno de las corrientes de entrada y salida, además de las mismas variables que en la técnica anterior. De éstos, usualmente  $C_O$  es medido, y los otros están fijos (constantes) o son conocidos. Aquí el método gasométrico no es evidente, y la medición de  $C_O$  se realiza, por ejemplo, utilizando el método paramagnético.

- **Gas estático, líquido fluyendo (GEF)**

La implementación de este principio que considera mantener el gas estático y el líquido fluyendo (Figura 3.11) no ha sido reportado en la literatura ni como referencia en alguna experiencia práctica.



**Figura 3.11** Principio de medición en fase Gaseosa, con gas Estático y líquido Fluyendo (GEF).

- **Gas fluyendo, líquido fluyendo (GFF)**

El principio de medición en fase gaseosa puede aplicarse también a bioreactores de plantas a escala real. En este caso existe una corriente de líquido que entra y sale del reactor, por lo que deben considerarse términos de transporte al balance de masas en la fase líquida (Ec.3.1). La suposición de proporcionalidad que existe entre  $C_{O_2}$  y  $S_{O_2}$  (Ec. 3.7) se hace más crítica debido a que, además, el término de flujo de salida de líquido también depende de ello. Medir el OD adicionalmente (fase líquida, L) podría ser útil para lograr una correcta estimación de la velocidad de respiración. Entonces la técnica ya no sería un procedimiento puramente de medición en la fase gaseosa (G). Sin embargo, hay que notar que en general, la combinación de los principios L y G puede llevar a mediciones más confiables para la determinación de la tasa de respiración.

La Tabla 3.1 resume los ocho principios de mediciones respirométricas. La primera columna contiene los nombres de los términos del balance de masas y la segunda columna el equivalente matemático. Las columnas sucesivas dan un listado de los principios, las cuatro primeras de mediciones en la fase líquida y las restantes en la fase gaseosa. El balance de masas para cada principio de medición se define multiplicando los términos matemáticos con los coeficientes de la columna del esquema apropiado y sumándolos.

**Tabla 3.1** Resumen de los diferentes principios de medición de velocidades de respiración.

Principio respirométrico →	Ecuación	Mediciones en la fase LÍQUIDA				Mediciones en la fase GASEOSA			
		LEE	LFE	LEF	LFF	GEE	GFE	GEF	GFF
		Figura No. →	3.5	3.6	3.7	3.4	3.9	3.10	3.11
Respiración	$V_L \cdot r_{O_2}$	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Acumulación de oxígeno disuelto	$\frac{d}{dt}(V_L \cdot S_{O_2})$	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Flujo de líquido	$Q_{in} \cdot S_{O_2, in} - Q_{out} \cdot S_{O_2}$			1	1			1	1
Intercambio de gas	$V_L \cdot k_L a (S_{O_2}^* - S_{O_2})$		1		1	1	1	1	1
Acumulación de oxígeno en la fase gaseosa	$\frac{d}{dt}(V_G \cdot C_{O_2})$					-1	-1	-1	-1
Flujo de gas	$F_{in} \cdot C_{O_2, in} - F_{out} \cdot C_{O_2}$						1		1
Intercambio de gas	$V_L \cdot k_L a (S_{O_2}^* - S_{O_2})$					-1	-1	-1	-1

## 3.3 EQUIPOS

### 3.3.1 Equipos para respirometría anaerobia

Hay dos requerimientos para realizar los ensayos de respirometría anaerobia. Primero, se requiere un sistema para llevar a cabo la respiración anaerobia. Este puede ser un frasco pequeño o un reactor de mayor volumen. En este frasco o recipiente el sustrato (por ejemplo, lodo primario o una solución de almidón) se mezcla con un inóculo que posea el consorcio de microorganismos adecuados para la respiración anaerobia. Segundo, hay que disponer de un sistema que permita medir la producción de metano. Para cuantificar la velocidad de respiración debe determinarse el “flujo de electrones”. Teniendo en cuenta que en la respirometría anaerobia no puede medirse directamente el consumo de sustrato ni el de electrones, entonces la mejor opción es la medición de los productos finales de la respiración anaerobia, como son la generación de H<sub>2</sub> y metano.

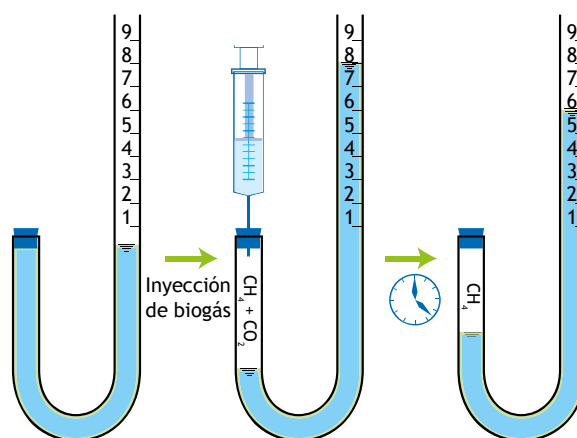
#### 3.3.1.1 Composición del biogás

El metano escapa del frasco o reactor como biogás. Además de metano, el biogás contiene CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S y trazas de otros compuestos. Entonces, para cuantificar el metano se necesita conocer tanto el flujo de biogás como su composición. Con este objetivo, la composición del biogás puede ser medida directamente o después de pre-tratar el biogás. Durante los procesos

de pretratamiento se remueven los otros componentes que no sean metano, antes de llevar a cabo la cuantificación del flujo de gas.

- **Medición de la composición de biogás y corrección del flujo medido**

La medición de la composición del biogás puede hacerse mediante cromatografía gaseosa. Sin embargo, también hay otros métodos más simples y económicos de medición, como, por ejemplo, el mostrado en la Figura 3.12.

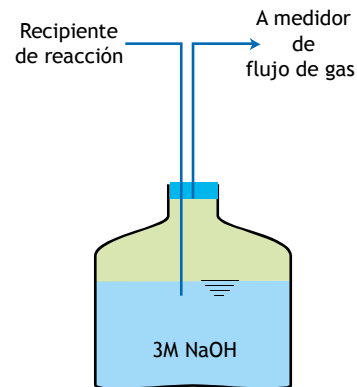


**Figura 3.12** Una manera simple y económica para determinar la composición de metano en el biogás.

Este tubo se llena con una solución alcalina (típicamente 3M NaOH) para remover  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{CO}_2$ , los cuales se disuelven en la solución, dejando en la fase gaseosa solamente metano. Primeramente se inyecta el biogás por el extremo izquierdo ( $t = 0$ ). Posteriormente, el  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  son capturados progresivamente en la solución alcalina (naranja), de forma tal que al final del tiempo necesario ( $t = \text{final}$ ) solamente quede metano en la fase gaseosa. El contenido de metano en el biogás se calcula por la diferencia de volúmenes entre  $t = 0$  y  $t = \text{final}$ . En este ejemplo (Fig. 3.12), se inyectan 10 mL de biogás en el tubo que contiene la solución alcalina al tiempo  $t = 0$ . Al final del tiempo necesario ( $t = \text{final}$ ), el volumen final es 6 mL. Así, 4 mL reaccionaron con la solución alcalina, por lo que el contenido de metano de la muestra es 60 % (considerando que el volumen total inicial era de 10 mL). El tiempo necesario para que el  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  sean absorbidos en la solución alcalina debe ser determinado experimentalmente. Esto puede hacerse evaluando el tiempo que transcurre hasta que no cambie más el nivel alcanzado por el líquido en el lado derecho del tubo (alcance estado estacionario). Para estimar la velocidad de flujo de metano que sale del frasco o reactor, debe rectificarse el volumen calculado usando la ley de los gases ideales teniendo en cuenta la temperatura y presión real.

- **Remoción de otros gases del biogás**

Cuando el  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  son removidos, el gas restante generalmente contiene 100% de metano (con pequeñas cantidades de  $\text{H}_2$  y  $\text{N}_2$  posiblemente). Esto significa que la remoción *in situ* de otros compuestos que no sean el metano, combinada con la medición del flujo del gas tratado, permite estimar el flujo de metano generado. En la práctica, esto implica que el gas que sale del reactor sea descargado sobre una amplia superficie de solución alcalina (típicamente 3 M de NaOH) (Figura 3.13). Debe destacarse que, contrariamente a lo mostrado en la Figura 3.13, no siempre la entrada del gas en la botella tiene que estar sumergida en la solución de NaOH; esto evita que se cree un flujo inverso (o contraflujo) de la solución alcalina hacia la jeringa de inyección. Por ejemplo, en caso de existir una baja presión en el espacio superior del reactor en el que se realiza el ensayo, la solución alcalina podría ser succionada desde la botella de absorción hacia el reactor y comprometer no solamente los resultados del experimento, sino también la estabilidad del reactor. La baja presión puede ocurrir cuando disminuye la temperatura en el espacio superior del reactor (por ejemplo, cuando el baño termostático falla o la puerta de la incubadora que contiene el recipiente queda abierta por cierto tiempo).



**Figura 3.13** Representación esquemática de una botella de absorción de gases.

### 3.3.1.2 Medición del flujo de gas

Hay varias maneras de medir la producción de gas, pero en la respirometría anaerobia a escala de laboratorio los métodos se limitan usualmente a los manométricos y los volumétricos.

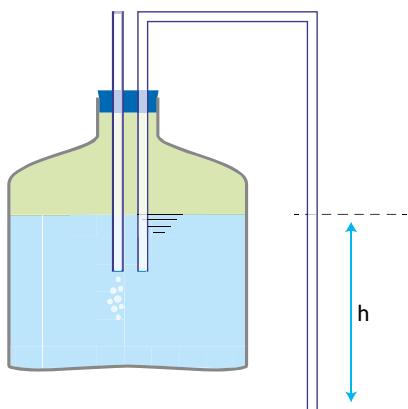
- **Métodos manométricos**

Los métodos manométricos se basan en la medición del aumento de la presión en el recipiente de reacción. A medida que se produce el biogás, la presión en el espacio superior aumenta. Sin embargo, ese aumento de presión puede conducir a un incremento en la solubilidad del  $\text{CO}_2$ , que a su vez puede perturbar de manera considerable la actividad microbiana (Theodorou *et al.*, 1994). Por lo tanto, es necesario liberar la presión periódicamente para evitar que la misma alcance valores demasiado altos. Generalmente se admite un límite máximo de presión de hasta 1.4 bar. Hay que cerciorarse también de que el recipiente de reacción esté diseñado de manera que tolere esa presión. Cuando la presión no se libera de manera automática, este método requiere una atención considerable de parte del operador. En casos extremos, una operación inapropiada puede conducir a que el recipiente de reacción explote debido al exceso de presión. Se recomienda insistentemente el uso de espejuelos de seguridad cuando se trabaja con el método manométrico. Adicionalmente, el efecto de la temperatura debe ser tomada en cuenta antes de realizar las mediciones de presión inicial y presión después de la liberación. Debido a que la temperatura afecta la presión total de gas y la presión de vapor del agua, debe tomarse en cuenta que el sistema haya alcanzado condiciones de equilibrio en el recipiente de reacción antes de llevar a

cabo las mediciones de presión correspondientes. Para calcular la producción de gas se suman los incrementos de presión entre dos liberaciones de gases, y con la ley de los gases ideales se estima la cantidad de moles de biogás a partir del aumento total de la presión. En caso que no se hayan sido absorbidos o removidos el  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$ , es necesario determinar también la composición del biogás.

#### • Métodos volumétricos

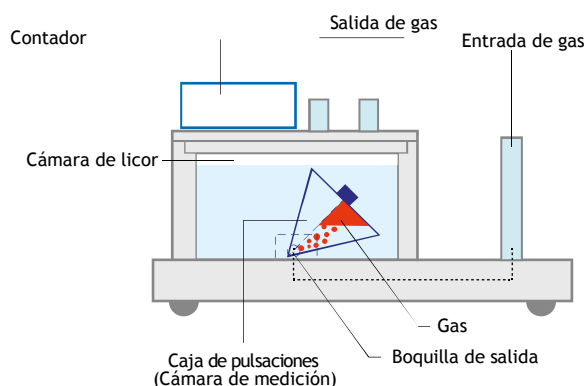
Un método volumétrico clásico muy robusto consiste en el uso del frasco de Mariotte (McCarthy, 1934), en el que el gas se introduce en el frasco, que tiene una salida para el líquido que se desplaza (Figura 3.14). La masa o volumen del líquido desplazado indica el volumen de biogás producido. Cuando además el líquido utilizado es alcalino, el burbujeo *in situ* del biogás remueve el  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$ , por lo que el líquido desplazado corresponde solamente al volumen de metano. Una desventaja es que el frasco necesita ser rellenado periódicamente, con las interrupciones en el control de la presión que ello implica. Si la medición del líquido desplazado es conectada de alguna manera a una balanza o un sistema automatizado de adquisición de datos, puede medirse la producción de gas en tiempo real.



**Figura 3.14** Frasco de Mariotte para medición de volumen de gas producido.

Otro ejemplo del principio de medición volumétrico está dado por el método de pulsaciones o pulsos (Figura 3.15). La ventaja de este principio de medición viene dada por el hecho de que el operador no requiere reinicializar el llenado de la caja en cada pulsación. El medidor de flujo funciona de manera continua sin requerir alguna atención, en contraste con el frasco de Mariotte. Hay varios sistemas comerciales que emplean este principio de medición basado en una caja

sumergida en aceite o agua, que produce una pulsación cuando se llena de gas por el fondo. El gas se acumula adentro de la parte baja de dicha cámara y en determinado punto ocasiona suficiente empuje de flotación, produciendo una pulsación en la caja, momento en que se libera el gas acumulado, quedando listas las condiciones nuevamente para que se repita el proceso. Cada pulsación (clic) de la caja queda registrado y de ahí se calcula el volumen correspondiente de gas producido. La desventaja del método es que puede ser costoso y que está limitado a un rango de valores de flujo (de hasta  $4 \text{ L h}^{-1}$ ).



**Figura 3.15** Sección transversal de un respirómetro anaerobio basado en un mecanismo de caja de pulsaciones. La caja alterna entre reclinaciones de derecha a izquierda a medida que el gas se introduce. Se cuenta y registra la cantidad de pulsaciones o clics ([www.ritter.de](http://www.ritter.de)).

### 3.3.2 Equipos para respirometría aerobia y anóxica

De manera similar a la respirometría anaerobia, también se requiere un recipiente en el que tendrá lugar la respirometría aerobia o anóxica. Este consiste básicamente en una botella o reactor agitado donde se mezclan la biomasa, en condiciones aerobias o anóxicas y un agua residual u otro sustrato específico. Se requiere además un sistema para medir y registrar el consumo del aceptor final de electrones, ya sea oxígeno, nitrato o nitrito. La manipulación de los datos puede ser manual, como ocurre en las mediciones de DBO, o automatizada, por ejemplo, cuando varios datos generados por una alta frecuencia de muestreo necesitan ser convertidos en velocidades de respiración. En el caso de ciertos respirómetros (incluyendo los comerciales), el equipamiento es tan sofisticado que su



operación requiere de un sistema de control totalmente automatizado.

### 3.3.2.1 Reactor

El reactor es usualmente un recipiente con un volumen comprendido en el intervalo entre unos 100 mL y varios litros. Según el tipo de aplicación, laboratorio o campo, el material puede ser de vidrio o plástico, frecuentemente transparente para facilitar la observación de su contenido. Dependiendo del principio de medición (Sección 3.3.1.2), el recipiente puede ser completamente cerrado para prevenir el intercambio de oxígeno con la fase gaseosa, o abierto para permitir la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa. Los recipientes abiertos pueden estar equipados con aditamentos para aireación (p.e. dispersador de burbujas y difusores) para mejorar la transferencia de oxígeno. Hay casos en los que el recipiente puede ser operado de ambas maneras: modalidad abierta (para aireación), y modalidad cerrada (para medir consumo de oxígeno). En todos los casos el recipiente opera totalmente mezclado, con agitador magnético, impelente, bombeo o mediante aireación. En el laboratorio el recipiente puede estar termostatzado, muy frecuentemente utilizando una doble pared para permitir el enfriamiento/calentamiento, o simplemente un elemento de calentamiento cuando la temperatura se mantiene a un valor superior al del ambiente. Dependiendo del principio de medición empleado (por ejemplo, líquido fluyendo, gas fluyendo), el reactor puede tener varios puertos de entrada y salida y una o más aberturas para sensores.

El equipamiento complementario puede incluir válvulas, bombas (para agua residual, biomasa, sustrato, aire y gas), tanque de mezclado, recipiente para contener el sustrato, cilindro de oxígeno, recipiente para el  $\text{NO}_3$ , unidad de pre-tratamiento de muestras (malla, filtro), generador de oxígeno, etc.

### 3.3.2.2 Medidor

En muchos casos el conjunto de medición consiste en un sensor (un electrodo asociado a un medidor, conectado o no a un sistema de adquisición de datos) para determinar la concentración del aceptor de electrones (oxígeno, nitrito o nitrato). El oxígeno puede ser medido directamente en la fase líquida, utilizando una sonda de OD polarográfica, galvánica u óptica. En pruebas sencillas de laboratorio, más especialmente de DBO, el oxígeno disuelto puede ser medido mediante el

método de titulación o fotométrico (Sección 3.4.2). La concentración de oxígeno en la fase gaseosa puede ser medida directamente con un analizador paramagnético. Sin embargo, los cambios en la concentración de oxígeno pueden medirse a través de un sensor de presión o de desplazamiento de volumen. Las concentraciones de nitrato y nitrito en la fase líquida pueden medirse mediante sensores selectivos de iones o por espectrofotometría UV (Rieger *et al.*, 2008).

Los sensores pueden tener lentos tiempos de respuesta, por lo que es necesario asegurar que la respuesta sea suficientemente rápida y adecuada en comparación con la velocidad del proceso biológico. Como regla general, el sensor debe ser 10 veces más rápido que la velocidad de la reacción a medir.

### 3.3.2.3 Aplicación práctica

En la literatura se describen diversas aplicaciones prácticas de las técnicas de respirometría, y algunas de ellas ya han sido introducidas en el mercado. Como fue explicado en la Sección 3.3.1, todas las técnicas de determinación de velocidad de respiración pueden clasificarse dentro de ocho principios básicos de medición. Todos los respirómetros existentes pueden explicarse en términos de esa clasificación, y sus correspondientes balances de masas. Sin embargo, solamente un número limitado de tipos de respirómetros, casi siempre los mismos, han sido los empleados en numerosas investigaciones y aplicaciones prácticas, y menos aún son los que han sido objeto de producción comercial. En lo que sigue se describen algunos respirómetros en términos de sus principios básicos y aplicación técnica. Sin embargo, esto no debe interpretarse como que se recomienda su uso por sobre otros métodos. La selección de algún principio de medición, su aplicación técnica o manifestación comercial, dependerá de los propósitos de la medición, de la habilidad y experiencia del usuario, y del presupuesto disponible.

- **Principio de medición LEE (en fase líquida, con gas Estático - líquido Estático)**

El esquema LEE puede considerarse el más simple, debido a que, sin flujo de gas ni de líquido, no hay necesidad de equipos suplementarios como bombas o sistemas de aireación. El análisis de la DBO (Sección 3.3.2) es un ejemplo de la aplicación de este principio (LEE). La Figura 3.16 muestra un ejemplo de botella utilizada para conocer la DBO, donde el OD es medido solamente al inicio y al final del análisis, y otro ejemplo de botella de DBO en el que el consumo de OD se mide

de manera continua mediante un sensor de presión. Este último de los ejemplos permite la evaluación de la DBO

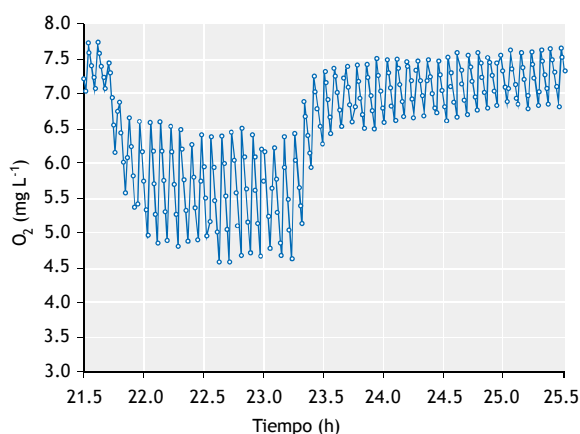
última y el coeficiente de primer orden de consumo de oxígeno (Sección 3.4.2).



**Figura 3.16** Botella de DBO para el análisis clásico de la DBO (a la izquierda) y frascos manométricos para la medición continua del consumo de oxígeno (a la derecha) (fotos: de Wheaton y de VELP Scientifica).

Sin embargo, el principio LEE también ha sido implementado para medir la velocidad de respiración de biomasa de manera semi-continua tanto a escala de laboratorio como de campo. En este caso, debido a que la concentración de biomasa es mucho mayor que la utilizada en el análisis típico de DBO, la concentración de OD disminuye rápidamente en pocos minutos, desde valores cercanos a la saturación hasta concentraciones limitantes. La velocidad de respiración se calcula a partir de la pendiente de la curva de decrecimiento del OD. Para poder seguir repitiendo la medición de la tasa de respiración ( $rO_2$ ) para diferentes momentos, es necesario re-airear la biomasa después de cada serie de lectura y adquisición de datos, obteniéndose un perfil de OD parecido a dientes de sierra (Figura 3.17). En este ejemplo los períodos con aireación y sin aireación (encendido/apagado) tienen la misma duración. Otros respirómetros regulan el encendido y apagado de la aireación en función de la concentración de OD existente, manteniendo el valor entre 4 y 6  $mg O_2 L^{-1}$ , por ejemplo. Estos límites (superior de apagado e inferior de encendido) deben definirse cuidadosamente. Esto último porque los límites determinan la precisión de los datos, así como la frecuencia con la que es posible repetir las mediciones y obtener diferentes valores de  $rO_2$  en el tiempo. Así, cuando la velocidad de

respiración es baja, puede tomar mucho tiempo para que disminuya la concentración de OD del valor máximo al mínimo, mientras que tiempos muy cortos dificultan el cálculo de la velocidad de respiración al hacerla más sensible a los errores de medición, ya que habrá muy pocos datos recolectados disponibles (número de puntos).



**Figura 3.17** Perfil de la concentración de OD de un respirómetro LEE con re-aireaciones a frecuencia constante.

La dificultad potencial de esta técnica de medición es que durante la etapa de disminución de la concentración de OD debe evitarse la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la líquida (lo cual es especialmente crítico cuando la velocidad de respiración es baja), y no siempre es evidente la identificación de una clara tendencia lineal en la disminución del OD. Esto último es un reto, particularmente cuando la medición es automatizada. De hecho, la transición entre la fase de aireación y la de disminución de OD puede tomar algún tiempo (decenas de segundos) y es afectada por la remoción de las burbujas de gas del líquido y por el tiempo de respuesta del electrodo de OD. La respirometría basada en este procedimiento permite la medición de la velocidad de respiración en intervalos que van desde típicamente unos minutos hasta, en algunos casos, diez minutos. También permite, especialmente en el laboratorio, la generación de respirogramas ( $rO_2$  vs tiempo) después de la adición de un agua residual o de sustratos específicos. La Figura 3.18 ilustra un ejemplo de respirómetro basado en este principio de medición. Se trata de un respirómetro de “pelota flotante”, diseñado para muestreo y descarga automatizada de lodo activado, donde la aireación se repite varias veces y permite el cálculo y visualización en pantalla del valor de la velocidad de respiración.

La Figura 3.19 es otro ejemplo de implementación práctica de la respirometría siguiendo el principio de medición LEE, con el uso de una celda de respiración cerrada (recipiente de la derecha) que se llena con lodo activado procedente de un tanque de aireación (recipiente de la izquierda). La disminución del OD de la celda es medida hasta alcanzar un cierto valor mínimo de concentración (o hasta transcurrir cierto tiempo, o después de una determinada variación del OD), después de lo cual, el contenido de la celda se cambia por lodo activado fresco del tanque de aireación y se inicia un nuevo ciclo de medición.

- **Principio de medición LFE (en fase Líquida, con gas Fluyendo y líquido Estático)**

La desventaja de la necesidad de acudir a re-aireaciones puede ser evitada con airear la biomasa continuamente. El suministro continuo de oxígeno brinda la garantía que la concentración de OD nunca será limitante aún en el caso de altas velocidades de respiración, por ejemplo, para altas concentraciones de biomasa y elevadas dosis de sustratos. Además, la aireación continua permite tener el recipiente abierto, lo que facilita la adición de agua residual y sustrato.



A)



B)

**Figura 3.18** Ejemplo de implementación de respirometría siguiendo el principio de medición LEE. (A), electrodo de OD y (B), uso *in situ* del respirómetro, en este ejemplo flotando sobre el lodo activado de un tanque de aireación (fotos: Strathkelvin Instruments Ltd.).



**Figura 3.19** Ejemplo de otra implementación práctica siguiendo el principio de medición LEE (foto: P.A. Vanrolleghem).

Para obtener la velocidad de respiración, ambos, el término de transferencia de masas (en las condiciones del proceso) y el término diferencial en el balance de OD (Ec. 3.3) deben ser conocidos. El término de transferencia de masas se calcula a partir de la concentración de OD, el coeficiente de transferencia de masa  $kLa$ , y la concentración de saturación de oxígeno  $S_{O_2}^*$ . Estos dos parámetros tienen que ser determinados regularmente, porque dependen de las condiciones ambientales, tales como temperatura, presión barométrica, y las propiedades del fluido (contenido de sales y posible presencia de compuestos orgánicos). La manera más sencilla de proceder es determinar éstos a través de ensayos de aireación y el apoyo de tablas de consulta. Existen procedimientos estándar para estos ensayos, bajo determinadas condiciones de procesos, que se basan en crear alteraciones en el equilibrio de la concentración de OD mediante la interrupción de la aireación, adicionando peróxido de hidrógeno, o adicionando un sustrato fácilmente biodegradable. La curva de re-aireación obtenida puede ser usada para calcular el coeficiente  $kLa$  y la concentración de saturación de OD,  $S_{O_2}^*$ . Para la obtención de valores confiables, se recomienda el uso de técnicas de estimación de parámetros por regresión no lineal, como es presentado en el Capítulo 5. La ventaja del método que se base en alterar el equilibrio de la concentración de OD debido a variaciones en la respiración (causada por la adición de un sustrato muy degradable) es que los valores de los coeficientes de aireación pueden actualizarse frecuentemente con relativa facilidad. Sin embargo, cuando la alteración de OD es moderada, la precisión en la determinación de  $kLa$  es baja. También debe asumirse que la velocidad de respiración ha disminuido hasta un valor constante (endógeno), durante la parte de re-aireación de la curva.

Si el interés está limitado al conocimiento de la velocidad de respiración inducida por el sustrato (o sea la respiración exógena  $r_{O_2,exo}$ ), no es necesaria la estimación de  $S_{O_2}^*$ . La respiración total es la suma de la respiración endógena  $r_{O_2,endo}$  y la respiración exógena  $r_{O_2,exo}$ . Considerando constantes los valores de  $r_{O_2,endo}$ ,  $kLa$  y  $S_{O_2}^*$  en un intervalo pequeño de tiempo, puede demostrarse que la concentración de OD de equilibrio alcanzada bajo condiciones endógenas  $S_{O_2,endo}^*$  es un reflejo de la respiración endógena (Kong *et al.*, 1996). Así, el balance de masa para el oxígeno puede entonces ser reformulado como:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2} = kLa \cdot (S_{O_2}^* - S_{O_2}) - r_{O_2,endo} - r_{O_2,exo} \quad \text{Ec. 3.13}$$

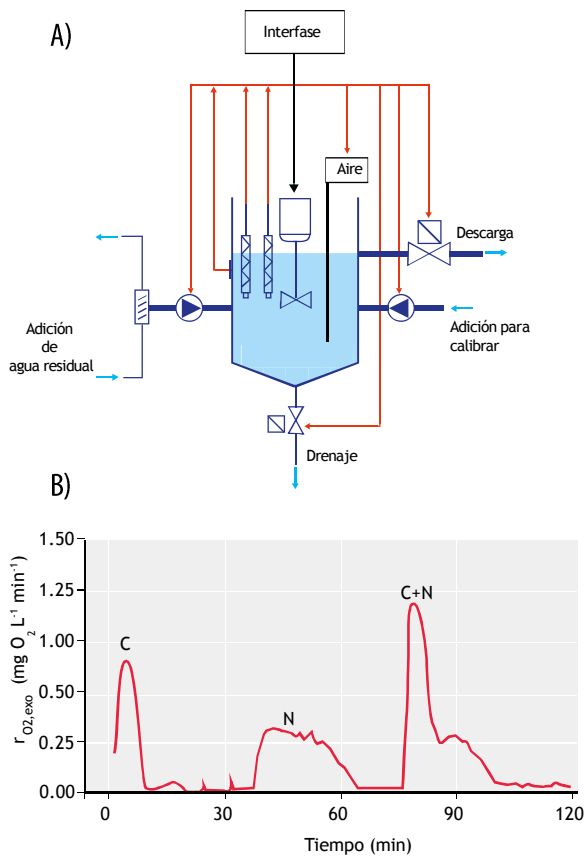
Considerando que  $r_{O_2,endo} = kLa (S_{O_2,endo}^* - S_{O_2})$  y sustituyendo  $r_{O_2,endo}$  en las ecuaciones anteriores, se tiene:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = kLa \cdot (S_{O_2,endo}^* - S_{O_2}) - r_{O_2,exo} \quad \text{Ec. 3.14}$$

Para estimar la velocidad de respiración endógena  $r_{O_2,exo}$  a partir de este balance de masas solamente es necesario conocer la concentración de equilibrio de OD  $S_{O_2,endo}^*$  (directamente de los datos, Figura 3.20) y el  $kLa$  se obtiene de la parte de la re-aireación de la curva de OD cuando la alteración fue originada por la adición de sustrato de muy fácil degradación. Otra ventaja de este esquema LFE de respirometría es que permite medir la tasa de respiración  $r_{O_2}$  al mantener la concentración de OD a valores casi constantes, eliminando así la dependencia que tiene la velocidad de respiración con la concentración de OD (asegurando que  $OD \gg 0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Otra ventaja es que la velocidad de respiración puede obtenerse en un corto intervalo de tiempo teniendo, como único factor limitante, la frecuencia de lectura del sensor de oxígeno. Esto hace que los respirómetros basados en el principio de medición LFE sean apropiados para la realización de estudios cinéticos y experimentos de optimización de modelos.

Es obvio que mientras la configuración básica del respirómetro con arreglo LFE consiste en un recipiente equipado con un aireador, impelente o bomba de recirculación para mezclar, y electrodo de oxígeno, versiones más avanzadas diseñadas para realizar experimentos automatizados (y/o en línea) incluyen equipamiento suplementario tales como bombas para el llenado de recipiente con biomasa, adición de agua residual y sustrato, control de nivel y válvulas de drenaje. Esto requiere un sistema adecuado de adquisición de datos y control, además de suficiente capacidad de computación para los procesos de estimación de parámetros. La Figura 3.21 muestra un ejemplo de una versión comercial de un respirómetro basado en ese principio de medición.





**Figura 3.20** (A) Esquema de un montaje de respirometría basada en el principio LFE (Vanrolleghem *et al.*, 1994) y (B) ejemplo típico de respirograma (Kong *et al.*, 1996).

- **Principio de medición LEF (en fase Líquida, con gas Estático y líquido Fluyente)**

El principio de medición respirométrica LEF permite el muestreo continuo de una corriente de biomasa, por ejemplo, lodo activado procedente de un reactor de laboratorio o del tanque de aireación de una planta de escala completa, mientras se mide la velocidad de respiración. Cuando la biomasa fluye a través de un recipiente cerrado y completamente mezclado (celda respirométrica) sin una fase gaseosa, entonces la velocidad de respiración puede calcularse, a partir de la Ec. 3.4, conociendo el volumen de la celda y la velocidad de flujo, y midiendo la concentración de OD a la entrada y salida de la celda. Alternativamente el OD entrante puede medirse en el reactor de origen (previando que no exista variación de OD en el conducto que le conecta al respirómetro) mientras que el OD saliente puede medirse en la propia celda. Siempre, como en los otros principios de medición respirométrica, la concentración de OD en la celda debe

ser lo suficientemente alta, para que el oxígeno no sea limitante.

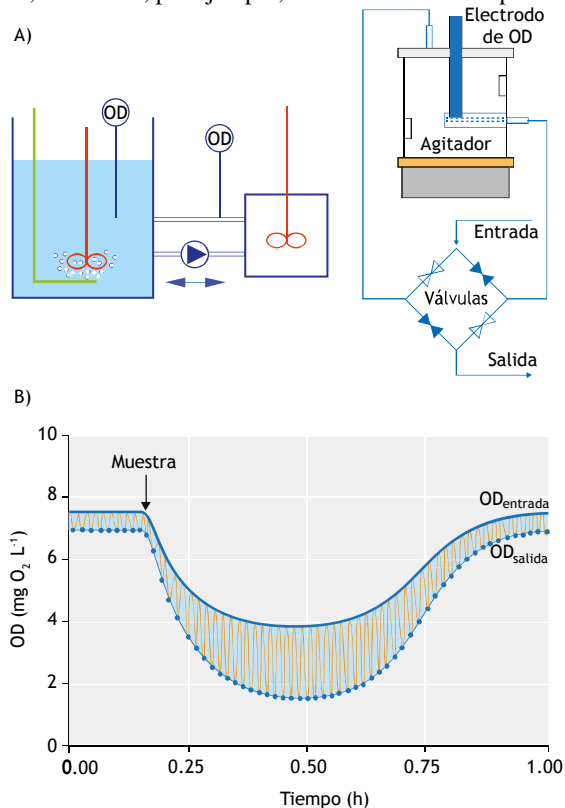


**Figura 3.21** Ejemplo de versión comercial de respirómetro basado en el principio LFE y usando el arreglo mostrado en la Figura 3.20. En el centro aparece el recipiente termostatzado y en el fondo, a la izquierda y la derecha, bombas para agua residual y soluciones para calibrar, respectivamente (foto: Kelma NV).

Una fuente potencial de errores de medición radica al emplear dos electrodos diferentes para medir el OD a la entrada y a la salida porque, aún cuando las características de los electrodos difieran ligeramente, pueden ocurrir grandes errores relativos derivados de las diferencias entre las dos lecturas de OD necesarias para calcular la velocidad de respiración. Spanjers y Olsson (1992) resolvieron el problema, midiendo alternativamente la concentración de OD a la entrada y salida de la celda con un solo electrodo ubicado en un puerto. Esto se realizó cambiando periódicamente la dirección del flujo a través del recipiente usando cuatro válvulas solenoides que se activaban de dos en dos (Figura 3.22).



Si se asume un estado estacionario con respecto a la velocidad de respiración, entonces la velocidad puede calcularse usando la Ec. 3.4, asumiendo que la derivada sea cero. Sin embargo, resolviendo la ecuación con métodos de diferencias finitas, la velocidad de respiración puede calcularse bajo condiciones dinámicas. La Figura 3.23 muestra una versión comercial de la variante respirométrica LEF usando la solución de un solo electrodo. Este respirómetro mide la velocidad de respiración con un intervalo típico de 1 minuto y puede estar conectado a un reactor de laboratorio o tanque de aireación de plantas a escala real, utilizando, por ejemplo, un circuito o ciclo rápido.



**Figura 3.22** Ejemplo de implementación práctica de respirometría basada en el principio LEF usando un solo electrodo para medir la concentración de OD a la entrada y salida de la celda respirométrica (Spanjers, 1993). (A) representación esquemática del arreglo y (B) perfil típico de la señal registrada por el único electrodo (Spanjers y Olsson, 1992). La señal representa el OD oscilando entre el valor de la entrada y a la salida de la celda. Esta señal de OD es la base para el cálculo de la velocidad de respiración.

- **Principio de medición GEE (en fase Gaseosa, con gas Estático y líquido Estático)**

Al igual que ocurre en el esquema LEE, que es uno de los principios respirométricos con mediciones de OD en

la fase líquida, el GEE es el más simple de los esquemas con mediciones en la fase gaseosa. La simplicidad se debe a que al no haber flujo de gas ni de líquido, no se necesita de equipos suplementarios tales como bombas y sistema de aireación. Sin embargo, como en este caso el cálculo de la velocidad de respiración se basa en la medición del oxígeno en la fase gaseosa mientras que en realidad el consumo tiene lugar en la fase líquida, es necesario establecer una relación entre la dinámica del oxígeno en la fase gaseosa y la velocidad de respiración. De esta manera, además del balance de masa del OD en la fase líquida, debe considerarse también el balance de masa de oxígeno en la fase gaseosa, así como resolver el conjunto de ecuaciones asociadas para hallar la tasa de respiración, asumiendo la relación de transferencia entre ambas fases.



**Figura 3.23** Versión comercial de un respirómetro del principio LEF usando el arreglo mostrado en la Figura 3.22. A la izquierda está el tanque de aireación. En la caja a la izquierda está la bomba de muestreo, y a la derecha, las válvulas solenoides. La celda respirométrica está colocada detrás de las válvulas (foto: Applitek NV).

Un respirómetro típico con el esquema GEE consiste en un recipiente con biomasa, equipo de mezclado, y de medición de gas. El oxígeno gaseoso es medido a través de métodos físicos, tales como los gasométricos y el paramagnético. Los métodos gasométricos miden los cambios en la concentración del oxígeno gaseoso, mismos que son detectados a través de los cambios de presión (si el volumen permanece constante, método manométrico), o cambios en el volumen (si la presión se mantiene constante, método volumétrico, por ejemplo, con el frasco de Mariotte)(Sección 3.3.1.2). Al igual que cuando se emplea el esquema LEE, cuando el consumo de oxígeno es muy alto, es necesario volver a suministrar oxígeno a la fase gaseosa, produciéndose una interrupción temporal de las mediciones. Esto limita la posibilidad de un seguimiento continuo de la velocidad de respiración.

Una complicación importante en el empleo del esquema GEE es que, como se libera  $\text{CO}_2$  como consecuencia de la actividad biológica, este gas debe ser removido de la fase gaseosa para evitar interferencias en algunos de los métodos simples de medición de  $\text{O}_2$ . En la práctica, para la eliminación del  $\text{CO}_2$  se utiliza una solución alcalina para su absorción química. Al igual que en el esquema LEE, el principio de medición GEE puede utilizarse para realizar análisis de DBO (Sección 3.4.2), por ejemplo con el Oxitop (Figura 3.16).

- **Principio de medición GFE (en fase Gaseosa, gas Fluyendo y líquido Estático)**

De manera similar al principio de respirometría LFE, en el esquema GFE también el gas fluye, aireando la biomasa de manera continua (con aire u oxígeno puro), de manera que siempre se asegura la presencia de suficiente oxígeno en el volumen de líquido. Sin embargo en el último esquema, para hallar la tasa de respiración la medición de oxígeno se hace en la fase gaseosa, específicamente en el gas que abandona la fase líquida sometida a aireación, también llamado emisiones de gases. Teniendo en cuenta que las emisiones de gases puede contener otros componentes que dependen del proceso metabólico que ocurre en la fase líquida, tales como dióxido de carbono y nitrógeno, es obvio que también estos pueden ser medidos para obtener información adicional sobre la actividad de la biomasa.

Un respirómetro GFE típico consiste en un recipiente para la biomasa, equipos de aireación y mezclado, además de los aditamentos necesarios para la medición las emisiones de gases. El oxígeno gaseoso es medido por métodos físicos, tal como el gasométrico (esto es: suministrando oxígeno puro procedente de un tanque o producido mediante electrólisis) o por métodos paramagnéticos.

En el método gasométrico, el cambio de presión o cambio de volumen en un espacio cerrado de la parte libre superior de la celda está relacionado con el consumo de oxígeno en la fase líquida. Esta información se puede utilizar para activar un sistema de producción de oxígeno compensatorio, basado en un cilindro de oxígeno puro o en una celda electrolítica, donde el flujo de oxígeno o corriente eléctrica puede ser convertido en velocidad de respiración. De hecho, el suministro de oxígeno resultante sirve como medio de aireación, es decir, gas que fluye. El cambio de presión se puede medir con un sensor de presión. No se ha encontrado ningún documento accesible en la literatura

que describa el uso del cambio de volumen para activar el suministro de oxígeno. Obviamente, el método gasométrico se basa en la medición de la transferencia de oxígeno [ $kL_a \cdot (S_{\text{O}_2}^* - S_{\text{O}_2})$ ] y no en la medición de la concentración de oxígeno en la fase gaseosa. La concentración de oxígeno en fase gaseosa debe ser asumida como constante (es decir,  $d\text{CO}_2 / dt = 0$ ). En cualquier caso, el método gasométrico requiere un dispositivo de absorción de  $\text{CO}_2$  para eliminar del gas el  $\text{CO}_2$  que se produce durante la biodegradación, y que se libera desde la fase líquida a la gaseosa. De no eliminarse, la producción de  $\text{CO}_2$  interferiría con la medición de la presión o del cambio de volumen. Por lo general, en la respiración aerobia, se produce un mol de  $\text{CO}_2$  por mol de  $\text{O}_2$ , lo que por definición significa que no se produciría ningún cambio en la presión total del gas si no se elimina el gas carbónico.

Alternativamente se puede medir directamente la concentración de oxígeno en la fase gaseosa, lo que elimina la necesidad de capturar el  $\text{CO}_2$  y permite la oxigenación continua de la biomasa con aire. Sin embargo, además de la concentración de oxígeno gaseoso, debe medirse también la concentración de OD en la fase líquida porque hay que considerar el balance de masa de oxígeno en ambas fases gaseosa y líquida. De igual modo, el caudal del gas tiene que ser medido, por ejemplo, con un controlador de flujo másico.

El oxígeno es uno de los pocos gases que muestran características paramagnéticas, por lo que puede medirse cuantitativamente de una mezcla gaseosa utilizando el método paramagnético. El método se basa en el cambio en un campo magnético como resultado de la presencia de oxígeno, y este cambio es proporcional a la concentración de oxígeno gaseoso presente.

Otro método para medir la concentración de oxígeno en la fase gaseosa es mediante el uso de un espectrómetro de masas. El uso de este equipo más caro tiene la ventaja de que también se pueden medir otros gases, que entonces se denomina normalmente análisis de emisiones de gases. Especialmente, el  $\text{CO}_2$  se puede medir en la fase gaseosa porque es un indicador útil de la actividad de la biomasa bajo todas las condiciones redox. Sin embargo, si se mide  $\text{CO}_2$  en las emisiones, considerando que el  $\text{CO}_2$  se asocia con el sistema de carbonato, se necesitará un equipo adicional para medir el pH y la concentración de bicarbonato en la fase líquida (Pratt *et al.*, 2003). Tenga en cuenta que un

espectrómetro de masas es un equipo costoso que también requiere gases especiales (para su calibración), lo que hace que este método sea más una herramienta avanzada de laboratorio que una aplicación de campo. Una alternativa puede ser un analizador de  $\text{CO}_2$  infrarrojo menos costoso.

La Figura 3.24 muestra un ejemplo de implementación práctica de un respirómetro que opera según el principio de medición GFE. Este respirómetro se basa en el análisis de las emisiones de gases mediante espectrometría de masas y está integrado con una unidad de titulación que permite tomar en cuenta la interacción entre el  $\text{CO}_2$  producido y la evolución del sistema tampón ácido/base de la fase líquida.

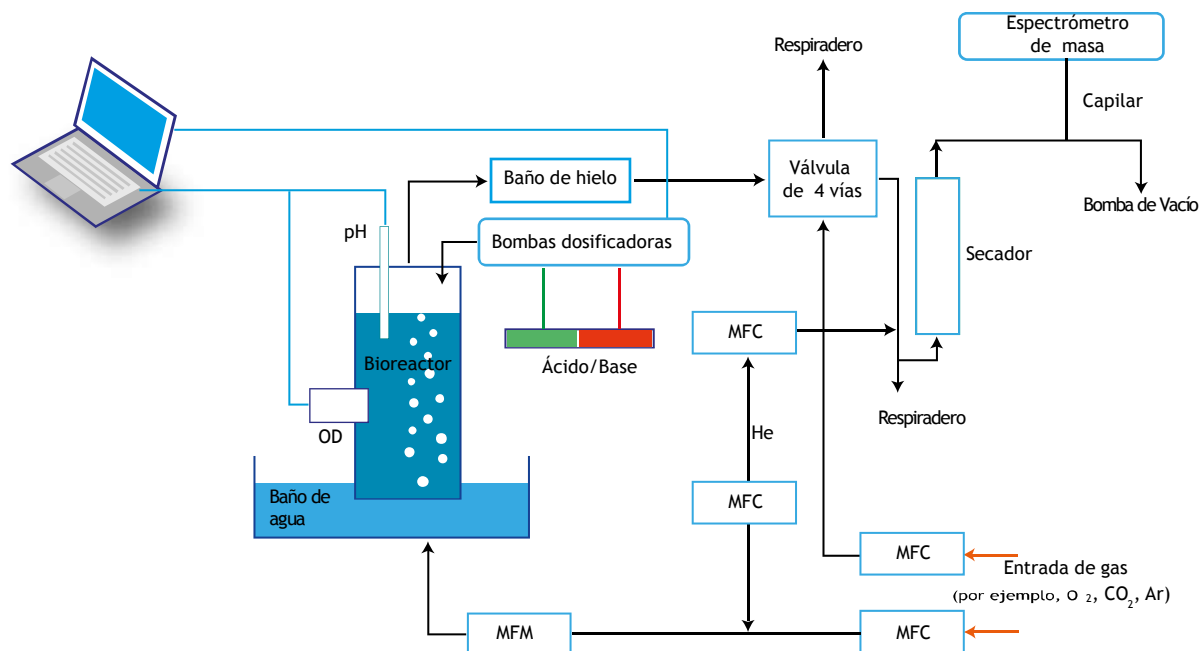


Figura 3.24 Esquema del arreglo para un respirómetro GFE (Pratt *et al.*, 2003).

El respirómetro mostrado previamente fue usado para estudiar el proceso de nitrificación de dos etapas, más específicamente, la acumulación de nitrito en los sistemas de tratamiento de aguas residuales operados en condiciones ambientales variables (pH y concentraciones de OD) (Gapes *et al.*, 2003).

## 3.4 CARACTERIZACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

Para la caracterización de las aguas residuales, ya sea para conocer la carga contaminante o para evaluar la toxicidad, se han desarrollado y aplicado diferentes métodos. A continuación, primero se describirán los diferentes métodos respirométricos utilizados para evaluar el potencial de producción de metano, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), seguido de los

métodos respirométricos de evaluación de toxicidad, y finalmente se dará una visión general de los métodos de fraccionamiento de las aguas residuales.

### 3.4.1 Potencial de biometano (PBM)

#### 3.4.1.1 Propósito

El ensayo del potencial del biometano (PBM) se realiza cuando se necesita conocer el rendimiento de metano de un sustrato, por ejemplo en el contexto del desarrollo de un plan de negocio que utiliza digestores anaerobios. También puede ser necesario conocer la producción de metano en el tiempo con el fin de optimizar el tiempo de retención de sólidos de un digestor, o para determinar las dimensiones del equipamiento para manipular el gas producido.

### 3.4.1.2 General

El ensayo de PBM se realiza para conocer cuál es la capacidad de producción de metano de una muestra. El PBM determina, en cierta medida, los detalles económicos y el diseño de una planta de biogás (Angelidaki *et al.*, 2009). También puede ser útil como medio de evaluación del desempeño de la biomasa (Actividad Metanogénica Específica, AME). Por ejemplo, la velocidad de producción de metano puede emplearse para estimar la actividad hidrolítica del inóculo. Los ensayos de PBM son frecuentemente utilizados en la literatura, pero bajo una muy grande variedad de protocolos, por lo cual se llevaron a cabo varios esfuerzos para su estandarización (Angelidaki *et al.*, 2009).

La Figura 3.25 muestra un resultado típico de un ensayo de PBM, el cual, en este caso fue realizado con los sólidos extraídos de un agua residual municipal filtrada mediante cribados gruesos. En la Figura se aprecia la producción de metano en el tiempo.

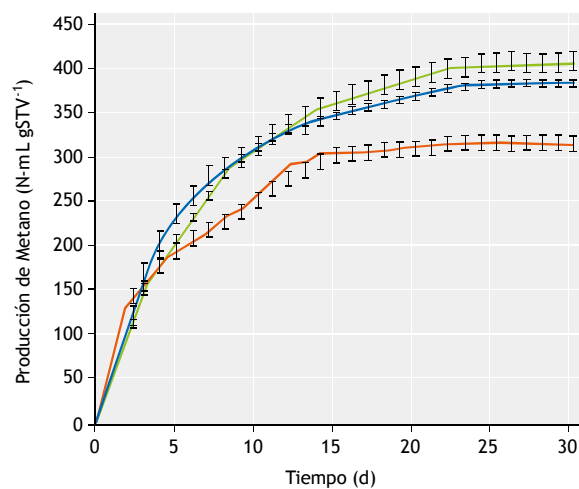
### 3.4.1.3 Ejecución del ensayo

En los ensayos de PBM, la cantidad de inóculo (requerido para la digestión anaerobia) es medida comúnmente a través de la concentración de los sólidos suspendidos volátiles (SSV), aunque los sólidos totales volátiles (STV) constituyen una alternativa. La diferencia entre estos métodos radica en que los STV toman en cuenta todas las fracciones volátiles del inóculo, mientras que los SSV solamente consideran los sólidos volátiles mayores a un determinado tamaño de poro de filtración. Es preferible el uso de los SSV sobre los STV porque es de esperar que la biomasa viable no pase a través del filtro. Existe por tanto una mejor correlación de la biomasa con los SSV que con los STV; ver también la Sección 3.5.1. Sin embargo, también puede decidirse trabajar con los STV por la precisión y la simplicidad de su determinación y porque es de esperar que la concentración de sólidos solubles volátiles en el inóculo sea pequeña, comparada con los volátiles particulados. Para la determinación de los STV o los SSV, la mayoría de los investigadores siguen el Standard Methods (APHA *et al.*, 2012).

En los ensayos de PBM, la forma de medir el sustrato depende de los propósitos de la prueba y de la forma en que se encuentra el sustrato. Cuando el sustrato es un lodo biológico, usualmente se emplean los STV. Los sustratos líquidos tales como las aguas residuales pueden cuantificarse por la DQO (demanda

química de oxígeno). Cuando se investiga el PBM en la digestión anaerobia convencional, es importante que no se acumulen ácidos grasos volátiles (AGV) durante el ensayo. Esto quiere decir que durante el ensayo, la acidificación y el consumo de AGV por el consorcio metanogénico deben estar en equilibrio. La relación entre el inóculo y el sustrato es por tanto, importante. Para la biomasa procedente de un digestor, se recomienda adoptar la siguiente relación, que ha demostrado, en muchos casos, no producir una acumulación neta de AGV:

$$2 \geq \frac{SSV_{\text{inóculo}}}{STV_{\text{sustrato}}} \quad \text{Ec. 3.15}$$



**Figura 3.25** Resultados de un ensayo de PBM: producción de metano en función del tiempo de sólidos extraídos de un agua residual mediante filtración gruesa. Las mediciones fueron realizadas por triplicado. La curva roja fue obtenida con los sólidos retenidos en un filtro de banda, la verde con los sólidos retenidos en un filtro de tambor, y la azul con una mezcla de ambos (Kooijman, 2015; información sin publicar).

Hay que destacar que se trata de una relación másica aplicada en el ensayo, expresada en gramos de SSV por gramos de STV en el reactor (no usar concentraciones). Para obtener el PBM del sustrato, debe medirse solamente la producción de metano del inóculo (blanco sin sustrato), en paralelo a la del conjunto sustrato-inóculo, y de la diferencia obtener la del sustrato.

Para realizar el ensayo PBM, las botellas de digestión deben ser incubadas a la temperatura deseada. La temperatura estándar para el intervalo mesofílico es 35°C. La temperatura puede mantenerse constante utilizando un baño de agua. La agitación en la botella puede efectuarse a través de un impelente. Cuando se

realiza el ensayo PBM con biomasa muy viscosa debe prestarse mucha atención a la agitación, porque una agitación insuficiente puede afectar negativamente la velocidad de la digestión y algunas veces el impelente, en botellas de ensayo pequeñas (200-400 mL), no propicia una buena agitación. Una solución a esta dificultad es agitar las botellas de reacción en una base o charola orbital ubicada dentro de una incubadora. La duración del ensayo depende de su objetivo y de las características del sustrato, pero lo más común son corridas de 30 días.

### 3.4.1.4 Procesamiento de los datos

En muchos casos, el propósito de los ensayos respirométricos anaerobios es medir el PBM de un sustrato. Como se muestra en la Figura 3.25, el PBM depende del tiempo de la digestión, de manera similar al análisis de la DBO (Sección 3.4.2). El PBM es también expresado usualmente en volumen normal (N-mL) de CH<sub>4</sub> por gramo de STV-sustrato. Para el lodo en exceso de los sistemas de lodo activado, el PBM último se encuentra en el intervalo de 150-200 N-mL gSTV<sup>-1</sup>. Para lodos primarios este intervalo está entre 300-400 N-mL g STV<sup>-1</sup>. Como la hidrólisis es frecuentemente la etapa limitante de la digestión anaerobia (Eastman y Ferguson, 1981), la velocidad de producción de metano está directamente relacionada con la velocidad de hidrólisis, de manera que la pendiente (inicial) del respirograma, como es mostrado en la Figura 3.25, es una medida directa de la velocidad (máxima) de hidrólisis a cada tiempo.

### 3.4.1.5 Recomendaciones

- **Corrección de presión y temperatura**

Para determinar la cantidad de metano que se produce en el ensayo, es necesario conocer el volumen, la presión y la temperatura en cada instante. Típicamente la cantidad de gas producida es expresada para condiciones estándar (usualmente 273.15 K = 0 °C, y 1013.25 mbar = 1 atm).

- **Difusión de metano**

Se conoce que las moléculas de metano son capaces de pasar por difusión a través de plásticos tal como la silicona. Por tanto, es importante que en el diseño del ensayo de PBM (o para la Actividad Metanogénica Específica, AME, Sección 3.5.2), los materiales que estén en contacto con el biogás tengan poca difusividad para el metano.

- **Indicador de pH de color para la solución de absorción de gases**

Es importante que el líquido contenido en las botellas de absorción y en el dispositivo de medición de flujo de biogás (Figuras 3.13 y 3.15, respectivamente) tenga un pH > 9, de manera que el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>S se remuevan en el líquido. Un valor inferior de pH resultará en lecturas erróneas de los flujos de CH<sub>4</sub>. Al líquido absorbente donde se burbujea el biogás, es posible adicionar azul de metileno para detectar su saturación. La solución así formada tendrá un color azul mientras el pH sea superior a 9.0. La decoloración será un indicador visual de la pérdida de eficiencia del líquido.

- **Actividad del inóculo**

La metanogénesis es muy susceptible a los cambios de temperatura. Es importante que la actividad de las bacterias metanogénicas sea alta desde el inicio de los experimentos, particularmente cuando se realizan ensayos de AME. Por tanto, es fuertemente recomendado preservar el inóculo a 35 °C durante las 24 h anteriores al experimento. De esta forma, para el ensayo de PBM (o de AME) realizado a 35 °C, las bacterias metanogénicas no serán sujetas a choques térmicos y el PBM (o AME) no tendrá afectaciones atribuibles a la temperatura.

- **Macro y micronutrientes**

La insuficiente concentración de micro y macronutrientes durante la realización de ensayos PBM (o AME) puede afectar la conversión. En caso de déficit, estos compuestos deben ser añadidos en cantidad suficiente. En la literatura existen diferentes sugerencias de soluciones de nutrientes para los ensayos de digestión anaerobia (Angelidaki *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014).

- **Inhibición por oxígeno**

A temperatura ambiente y nivel del mar, la concentración de saturación de OD en el agua tiene un valor próximo a 9 mg L<sup>-1</sup>. Se conoce que el oxígeno inhibe la metanogénesis. Por otra parte, el oxígeno también puede “consumir” la DQO de la mezcla. Por tanto, es aconsejable eliminar el oxígeno de la solución de sustrato (especialmente en ensayos de AME donde se mide la velocidad de la metanogénesis) antes de mezclarla con la biomasa. Para eliminar el oxígeno disuelto suele emplearse el burbujeo lento de gas N<sub>2</sub> en la solución durante aproximadamente 60 segundos.

- **Hermeticidad**

Con anterioridad al ensayo PBM debe verificarse la hermeticidad a gases del sistema de producción y de



medición de gas. Esto puede hacerse introduciendo una cantidad conocida de aire en la manguera conectada a la botella de burbujeo y el medidor de flujo para asegurar que todo esté montado adecuadamente, incluyendo la efectividad de la hermeticidad. La cantidad de aire medida a la salida debe ser igual a la inyectada. En caso contrario, probablemente hay una fuga.

- **Soluciones alcalinas**

Típicamente, se emplean soluciones alcalinas para eliminar los compuestos ácidos del biogás mediante el “burbujeo” de los gases en la solución alcalina. Otros compuestos, como  $H_2$  y  $NH_3$ , no son removidos por estos absorbentes alcalinos. El  $NH_3$  está presente frecuentemente en cantidades importantes cuando el pH del digestato es alto (próximo a 9.0). En cuanto al hidrógeno, su formación es favorecida cuando se presenta una acidificación severa del digestor, y el  $H_2$  puede llegar a estar presente en grandes cantidades en el biogás. Durante la realización del ensayo, puede usarse una solución tampón de fósforo para evitar variaciones de pH significativas que lleven a estos extremos.

### 3.4.2 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

#### 3.4.2.1 Propósito

El ensayo de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es ejecutado con el objetivo de evaluar la concentración de compuestos orgánicos biodegradables en la muestra de agua, por ejemplo para diseñar una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) o para evaluar su operación en términos de remoción de compuestos orgánicos. Debido a su sensibilidad, la DBO se emplea también para evaluar la concentración de compuestos orgánicos presentes en las aguas de cuerpos receptores.

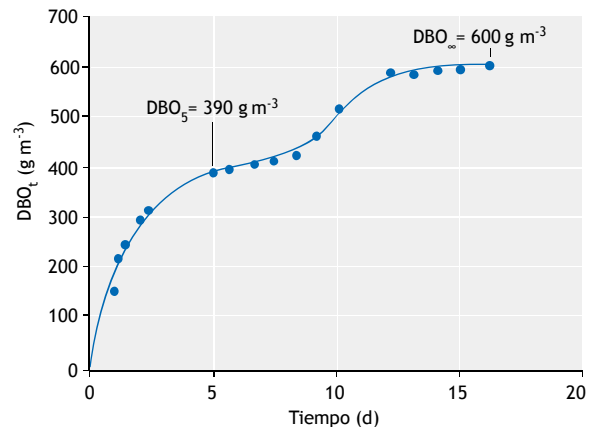
#### 3.4.2.2 General

La determinación de la DBO en aguas residuales, efluentes y aguas receptoras contaminadas, se basa en una prueba que mide el consumo de oxígeno por las bacterias durante un tiempo dado de incubación. El ensayo cuantifica la degradación bioquímica de los compuestos orgánicos (demanda bioquímica carbonácea, CDBO) pero también incluye el oxígeno empleado en la oxidación de compuestos inorgánicos como el sulfuro y el ión ferroso. A menos que se utilice un inhibidor de la nitrificación en la prueba, la DBO incluye también el oxígeno que se consume en la oxidación de las formas reducidas del nitrógeno

(demanda bioquímica nitrogenada de oxígeno, NDBO). Para ser más preciso, el término de DBO total ( $DBO_t$ ) se utiliza cuando la determinación se hace sin inhibidor, lo que representa la suma de CDBO y NDBO.

Normalmente el tiempo de incubación se limita a 5 días, dando lugar al tradicional parámetro  $DBO_5$ . Sin embargo, el ensayo puede realizarse para otro tiempo de incubación, como por ejemplo, 7 días, para facilitar la organización de los análisis en el laboratorio, o 28, 60, y hasta 90 días, para determinar la llamada DBO última (UDBO,  $DBO_\infty$  o  $DBO_U$ ). Esta última es una medida del oxígeno requerido para la degradación total de la materia orgánica (demanda última carbonácea) y/o para oxidar las formas reducidas de los compuestos de nitrógeno (demanda última nitrogenada).

Las mediciones que incluyen la NDBO generalmente no son de utilidad para evaluar la demanda de oxígeno asociada a los compuestos orgánicos. De hecho, la NDBO puede estimarse directamente del nitrógeno nitrificable (amoniacoal o N total de Kjeldahl), y la CDBO se calcularía restando el valor equivalente teórico de NDBO, del valor de DBO obtenido como resultado del ensayo realizado sin inhibidor. Sin embargo, este último método es engorroso y sujeto a muchos errores. La inhibición química de la nitrificación constituye el método más directo y confiable de medir la CDBO.



**Figura 3.26** Curva de DBO<sub>t</sub> para una mezcla de aguas residuales municipales y de matadero (Henze *et al.*, 1995).

#### 3.4.2.3 Ejecución del ensayo

Básicamente hay dos procedimientos para medir la DBO. Uno de ellos emplea una botella cerrada (respirómetro LEE) y el único oxígeno disponible para

la oxidación de los compuestos orgánicos es el oxígeno disuelto al inicio del ensayo en la muestra (diluida).

En el segundo procedimiento, el oxígeno se suministra de manera continua desde una fase gaseosa contenida en la botella (respirómetro LFE) y se da seguimiento al oxígeno consumido.

A continuación, se tratará lo relativo al primer procedimiento, y posteriormente se discutirán los otros métodos basados en el suministro continuo de oxígeno desde una fase gaseosa.

#### • Ensayo de DBO con respirómetro LEE

El método consiste en rellenar un frasco completamente con la muestra de agua a evaluar y luego incubar la botella herméticamente cerrada a  $20 \pm 0.1$  °C en la oscuridad (para evitar la fotosíntesis), durante un número específico de días (5, 7, 28, 60, 90 días). La concentración de oxígeno disuelto se mide al inicio y al final del período de incubación, y la DBO se calcula a partir de la diferencia entre el OD al inicio y al final. Como la concentración de OD inicial se mide inmediatamente después de la dilución, todo el oxígeno que se consume después de esta medición estará incluido en el cálculo de la DBO. Los frascos son típicamente de 300 mL, con tapa esmerilada y boca en forma de cono truncado. Los frascos deben ser lavados con detergente y enjuagados con abundante agua (para eliminar cualquier traza de jabón).

#### Dilución

Teniendo en cuenta que la única fuente de oxígeno es el que está inicialmente presente, la cantidad de materia orgánica que es posible oxidar está limitada por el hecho de que, para que el OD no sea limitante, su concentración al final nunca debe ser menor de  $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ . Esto, por supuesto, limita la concentración de DBO del agua en la botella a tener un valor máximo aproximado de  $7 \text{ mg L}^{-1}$ . Mientras que este pudiera ser un valor aceptable de concentración de DBO para efluentes tratados y aguas receptoras, las aguas residuales necesitan ser diluidas considerablemente en el propio frasco. Sin embargo, la dilución conlleva a un problema, porque el metabolismo bacteriano tiene requerimientos de nutrientes como nitrógeno, fósforo y trazas de metales (Mg, Ca, Fe). Sin estos nutrientes, la biodegradación de los contaminantes orgánicos se verá afectada, dando lugar a una sub-estimación del valor de la DBO. También se necesita una cierta capacidad amortiguadora para asegurar que el pH de la muestra incubada permanezca dentro del intervalo en el que es posible el crecimiento de bacterias. Obviamente, el agua

de dilución que se use no debe contener compuestos biodegradables.

#### Siembra

Teniendo en cuenta que el ensayo depende de la actividad bacteriana para degradar los compuestos orgánicos presentes en la muestra, es esencial que la población presente sea capaz de hacerlo. Las aguas residuales domésticas, los efluentes de PTARs antes de su desinfección y las aguas superficiales sujetas a descargas, generalmente contienen una cantidad de microorganismos suficiente en sí misma como auto-siembra. Algunas aguas residuales, particularmente de origen industrial, pueden necesitar la adición de un inóculo externo para iniciar la biodegradación en la prueba de DBO. Tales inóculos pueden obtenerse de biomasas o efluentes de PTARs, pero como estos suelen ser acompañados de nitrificantes, se recomienda utilizar un inhibidor de la nitrificación para asegurar resultados apropiados en el ensayo de determinación de la CDBO. Hay casos en los que las características de la contaminación requieren inóculos con organismos diferentes a los contenidos en las PTARs municipales. En estos casos se recomienda hacer la siembra con la biomasa de una planta de tratamiento sujeta a esta descarga o con la corriente aguas abajo que recibe ese efluente.

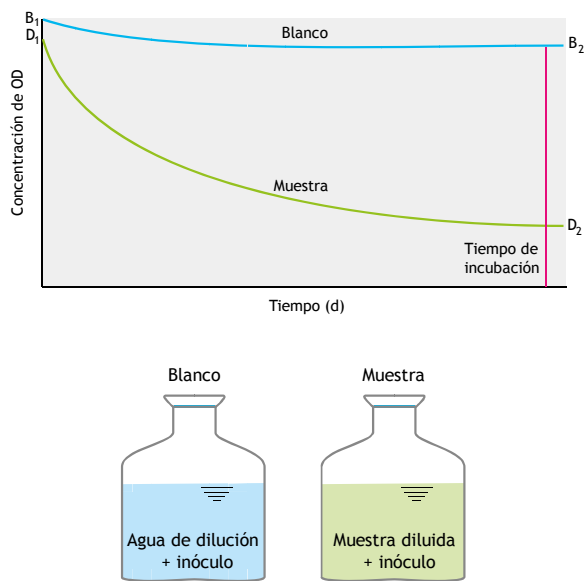
#### Blanco

Tanto el agua de dilución como la siembra, pueden afectar el resultado del ensayo de la DBO, por ejemplo, introduciendo materia orgánica en el frasco. De hecho, pueden ocurrir cuatro situaciones diferentes (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Diferentes combinaciones posibles de blancos para la ejecución de pruebas de DBO.

	Siembra	Dilución
1	-	-
2	x	-
3	-	x
4	x	x

Como la calidad del ensayo puede afectarse por la dilución, hay que asegurar que se realice un ensayo de DBO en blanco con el agua de dilución. En este blanco se utiliza la misma cantidad de siembra que la del ensayo que contiene la muestra con el agua de dilución (Figura 3.27).



**Figura 3.27** Resultados típicos de pruebas de DBO en frascos cerrados para una muestra y un blanco

### Medición de OD

El oxígeno disuelto puede medirse a través del método de titulación yodométrica (versión modificada de azida) o mediante un electrodo de oxígeno bien calibrado. Para la medición de la DBO última ( $DBO_U$ ) en tiempos de incubación prolongados, se recomienda utilizar solamente electrodos de oxígeno, debido a la necesidad de determinar el OD periódicamente a diferentes días durante la incubación (intervalos de 2 a 5 días máximos y con un mínimo de 6 a 8 valores).

### Procesamiento de los datos

A continuación se describe cómo hacer el cálculo de la DBO de la muestra (Figura 3.27):

$$DBO = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2)}{P} \quad \text{Ec. 3.16}$$

Donde,  $D_1$  es la concentración inicial de OD de la muestra diluida inmediatamente después de su preparación ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $D_2$  es la concentración final de OD de la muestra diluida al finalizar el período de incubación ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $B_1$  es la concentración inicial de OD en el blanco inmediatamente después de su preparación ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $B_2$  es la concentración final de OD en el blanco al finalizar el período de incubación ( $\text{mg L}^{-1}$ ), y  $P$  es la fracción decimal del volumen de muestra utilizado.

Note el hecho de que el balance de masas en el frasco cerrado es el mismo del esquema respirométrico LEE:

$$\frac{dS_{O_2}}{dt} = -r_{O_2} \quad \text{Ec. 3.17}$$

De donde se tiene, después de integrar la expresión, que,

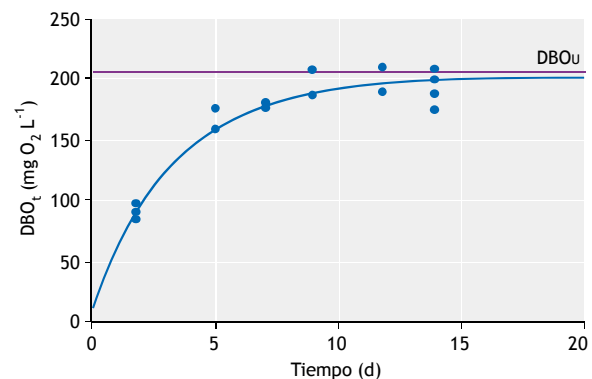
$$DBO = S_{O_2,t_0} - S_{O_2,t_{fin}} = \int_{t_0}^{t_{fin}} r_{O_2}(t) \cdot dt \quad \text{Ec. 3.18}$$

Se aprecia que la DBO corresponde a el área bajo la curva del llamado respirograma, mismo que es una serie de datos de velocidades de respiración en el tiempo.

Para la determinación de la DBO última, se ajusta la siguiente ecuación de primer orden, al conjunto de datos de DBO ejercida ( $O_2$  consumido) en función del tiempo (Figura 3.28):

$$DBO_t = DBO_U (1 - e^{-kt}) \quad \text{Ec. 3.19}$$

Donde,  $DBO_t$  es la DBO ejercida o cantidad de oxígeno consumido al tiempo  $t$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $DBO_U$  es la DBO última ( $\text{mg L}^{-1}$ ), y  $k$  es la constante cinética de primer orden de la velocidad de consumo de oxígeno ( $\text{d}^{-1}$ ).



**Figura 3.28** Mediciones de DBO ejercida a lo largo de un período de 14 días y su ajuste con una ecuación cinética de primer orden (Weijers, 2000).

Para la estimación de los parámetros, es preferible realizar el ajuste de la ecuación utilizando un método de regresión no lineal, como la función Solver del Excel, para minimizar la suma de cuadrados de los errores entre los valores medidos y las predicciones de  $DBO_t$  del modelo. Note que con esta aplicación se determinan tanto el valor de  $DBO_U$  como de  $k$ . El valor de  $k$  brinda información sobre la velocidad de degradación de los compuestos orgánicos de la muestra. Por último, vale

aclarar que el modelo de primer orden no es siempre la mejor opción. En ocasiones se obtiene un mejor ajuste acudiendo a otros modelos cinéticos alternativos, particularmente el que consiste en la suma de dos o más modelos de primer orden.

### Recomendaciones

Cuando al final del ensayo la concentración de OD es menor que  $1 \text{ mg L}^{-1}$  o el consumo después de la incubación ha sido menor de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , hay que realizar el ensayo nuevamente, pero con una dilución mayor o menor, respectivamente.

Para verificar si el ensayo fue bien ejecutado, puede realizarse un control con una solución de DBO conocida. En este sentido se recomienda el empleo de una solución estándar formada por una mezcla de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido glutámico y  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de glucosa. Una dilución de 2 % de esta solución patrón debe tener una  $\text{DBO}_5$  de aproximadamente  $200 \pm 30 \text{ mg L}^{-1}$ . El valor de  $\text{DBO}_U$  esperado con esta solución es aproximadamente  $308 \text{ mg L}^{-1}$  (APHA, 2012).

Puede ser necesario un pre-tratamiento de la muestra. También puede ser necesario ajustar el pH a  $6.5 < \text{pH} < 7.5$  y la temperatura a  $20^\circ\text{C}$  antes de hacer la dilución. Si la muestra estuviera clorada, debe eliminarse el cloro, adicionando  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , además de requerir un inóculo. Si la muestra fue previamente conservada en frío, o si ha tenido actividad fotosintética, puede presentar sobresaturación de oxígeno (más de  $9 \text{ mg L}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ ). En tales casos es necesaria la desoxigenación, agitando vigorosamente el frasco de DBO lleno parcialmente, o aireando con aire comprimido limpio.

La nitrificación puede inhibirse utilizando varios productos, como allylthiourea (ATU), nitrapirín o el 2-cloro-6-(triclorometil)piridina (TCMP). Aunque la concentración recomendada de estos productos ha demostrado que pueden inhibir la nitrificación, se ha reportado la adaptación de la biota a los mismos, y en algunos casos hasta su degradación, permitiendo que ocurra la nitrificación en etapas avanzadas del ensayo. Por lo anterior, es recomendable verificar al final si ha habido formación de nitrato o nitrito.

Existen kits o aplicaciones para determinar la DBO en condiciones de campo, sin equipos de laboratorio. En este caso el OD es medido por fotometría utilizando nutrientes estándar y bacteria de siembra disponibles en sobres comerciales.

### • Ensayo de DBO con respirómetro GFE

Se han desarrollado otros tipos de equipos para ensayos de DBO para resolver el problema de la limitación a la disponibilidad de oxígeno cuando se realiza el ensayo en frascos cerrados. Basado en el principio respirométrico GFE, en esos equipos se suministra oxígeno al líquido, permitiendo la degradación de la materia orgánica en mayores cantidades. A partir de esa facilidad se extiende el intervalo de medición de la DBO, usando menores diluciones y en algunos casos sin dilución alguna. El equipamiento básico consiste en un recipiente en el que se pueda suministrar oxígeno a la fase gaseosa a medida que está siendo consumido por la muestra líquida. Hay dos maneras de lograr eso: o que el volumen de gas contenga suficiente oxígeno para completar la oxidación de toda la materia biodegradable de la muestra, o que el equipo sea capaz de reponer oxígeno fresco a la fase gaseosa, a partir de una fuente externa. De esta forma se puede medir el oxígeno consumido en el tiempo, más o menos continuamente, lo que sirve no solamente para la DBO, sino también permite calcular las velocidades de respiración en el tiempo.

Hay varios equipos que operan bajo el principio GFE. El esquema básico incluye los respirómetros manométricos que funcionan registrando el cambio de presión en la fase gaseosa que está sobre el líquido, conforme se consume el oxígeno. La interferencia debida al  $\text{CO}_2$ , que se produce durante la biodegradación y escapa de la fase líquida hacia la gaseosa, se elimina capturando el  $\text{CO}_2$  en una solución o perlas alcalinas (KOH) integradas al equipo. Registrando la caída de presión, y usando la ley de los gases ideales, puede calcularse el consumo de oxígeno. Comercialmente se dispone de equipos que utilizan transductores de presión, cálculos simples y un registrador de datos para obtener una serie de valores de DBO en el tiempo. Como alternativa, los respirómetros volumétricos registran la reducción del volumen de gas (a presión constante) a medida que se agota el oxígeno de la fase gaseosa. Aquí también se necesita la solución (o perlas) alcalina, para eliminar el  $\text{CO}_2$ . Por su lado, los respirómetros electrolíticos utilizan el esquema del volumen y presión constantes de gas para activar la producción electrolítica de oxígeno y mantener constante la concentración de oxígeno en la fase gaseosa (Figura 3.29). El  $\text{CO}_2$  emitido por el líquido nuevamente interfiere con el esquema de presión constante y debe eliminarse de la fase gaseosa. De manera alternativa, para mantener la presión constante en la celda

hermética, puede suministrarse oxígeno a partir de una fuente de oxígeno puro (cilindros comerciales),

debiendo medirse el flujo.

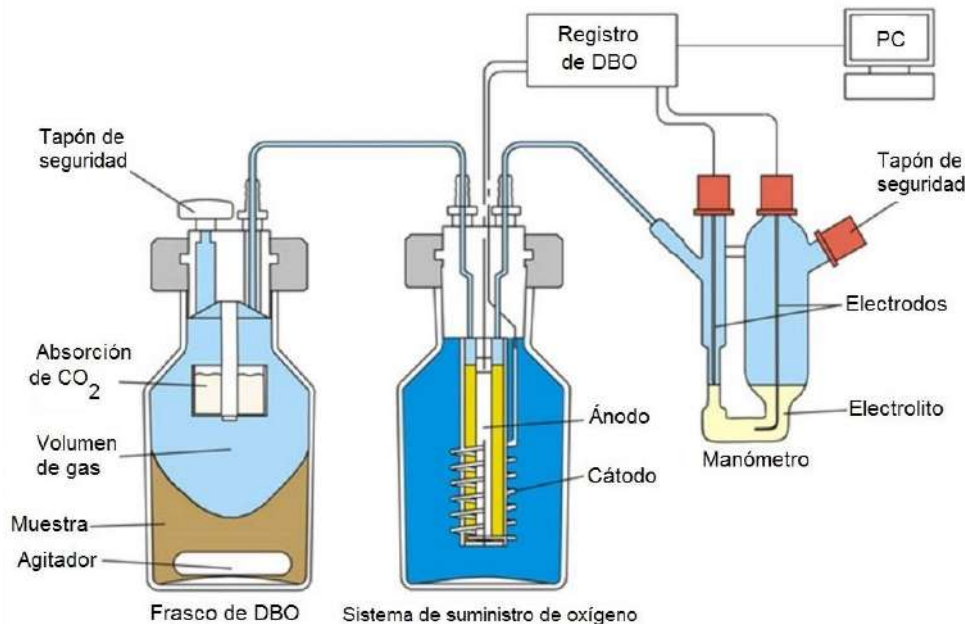


Figura 3.29 Respirómetro electrolítico para análisis de DBO (SELUTECH GmbH).

Si no se dispone de un suministro externo de oxígeno, como en el respirómetro descrito anteriormente (“Ensayo de DBO con respirómetro LEE”), debe prestarse atención al consumo total de oxígeno que sería requerido por la muestra. Éste no debe exceder la cantidad de oxígeno disponible en la fase gaseosa (que se encuentra en la parte superior libre por encima del líquido), lo que permite evitar que el O<sub>2</sub> fuera limitante y produzca resultados erróneos. El volumen de alícuota que debe introducirse en la botella de DBO depende del rango de concentración de DBO en la muestra. Los manuales de los respirómetros brindan comúnmente una tabla donde se establecen los volúmenes recomendados a añadir para los diferentes intervalos de DBO. En cualquier caso, en los métodos que se basan en el no-suministro de oxígeno, siempre ocurre una disminución de la concentración de OD, y este podría influir sobre la velocidad de oxidación durante el ensayo.

Los instrumentos permiten lecturas de la DBO con una frecuencia que varía entre cada 15 min hasta cada 6 h. Una alta frecuencia en la captación de datos puede ayudar en la interpretación de los resultados en términos

de cinética de degradación o permitir un mejor ajuste de los modelos, reduciendo la influencia de posibles interferencias en las mediciones y obteniendo una estimación más confiable de la DBO última.

#### Recomendaciones

La interferencia de otros gases diferentes al CO<sub>2</sub> puede causar resultados erróneos no siempre reportados. Las variaciones de temperatura en el ambiente también pueden afectar las mediciones de presión y volumen, ya que influyen en la presión total. Por otra parte, los cambios de presión atmosférica pueden afectar las mediciones en algunos respirómetros.

Puede detectarse una demanda de oxígeno tan pequeña como 0.1 mg L<sup>-1</sup>, pero la precisión del ensayo dependerá de la cantidad total de oxígeno consumido, la precisión de las mediciones de presión o volumen y del efecto de las variaciones de temperatura y presión atmosféricas.

Como el oxígeno debe transferirse de la fase gaseosa a la líquida, hay que tener cuidado que la velocidad de consumo de oxígeno no exceda mucho a la velocidad de transferencia de masa, porque eso podría tener como consecuencia una limitación de la disponibilidad de



oxígeno en el proceso de biodegradación e introducir errores en los resultados de la DBO. La transferencia de oxígeno es mayormente dependiente de las condiciones de mezclado en estos respirómetros, limitando la velocidad de consumo de oxígeno a  $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para condiciones de bajo nivel de mezcla y hasta  $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para alta intensidad de mezcla. Si la velocidad de consumo excede a la de suministro del respirómetro disponible, puede diluirse la muestra en una magnitud tal que la velocidad de consumo decrezca hasta niveles aceptables. Debe comprobarse la composición del agua de dilución tal como ya ha sido mencionado anteriormente.

Tenga en cuenta que el ensayo de la DBO es un ensayo respirométrico porque mide el consumo del  $\text{O}_2$  (último aceptor de electrones), aunque en general no mide como tal la velocidad del consumo. De hecho, la DBO es el consumo acumulado de oxígeno, mismo que puede obtenerse por cálculo de integración a partir de las velocidades de respiración para un determinado período de incubación. Como fue destacado previamente, la respirometría LFE inherentemente brinda la posibilidad de calcular la velocidad de respiración en el tiempo.

Note además que la DBO puede medirse de forma similar usando otros aceptores de electrones, tal como el nitrato.

Puede necesitarse la adición de nutrientes y de siembra externa para determinadas muestras de aguas residuales en aquellos casos en los que no esté presente la biomasa adecuada, o en aguas residuales no balanceadas en términos de nutrientes (de acuerdo al contenido de compuestos orgánicos), donde podría ocurrir una limitación del crecimiento bacteriano y traducirse por tanto en sesgos en los resultados de la DBO.

### 3.4.3 Demanda bioquímica de oxígeno a corto plazo ( $\text{BOD}_{st}$ )

La variación de la composición de las aguas residuales en el tiempo puede ser caracterizada rápidamente usando métodos químicos como los análisis de la DQO y el COT. Estos métodos pueden proveer datos con alta frecuencia de medición (por ejemplo, sobre una base horaria), pero no brindan información acerca de la biotratabilidad de los contaminantes. Los métodos como el ya mencionado de la  $\text{DBO}_5$ , que tradicionalmente brindan información sobre biodegradabilidad, no son

capaces de aportar información a corto plazo y alta frecuencia debido al largo tiempo que debe transcurrir entre el inicio del análisis y el momento en que se obtienen los resultados. Sin embargo, el principio de dar seguimiento al consumo de oxígeno, para evaluar la tratabilidad y concentración de materia orgánica de un agua residual, es una herramienta muy potente ya que la mayoría de los procesos de tratamiento de aguas residuales dependen de la degradación aerobia de los compuestos orgánicos. Por tanto, se han propuesto métodos para disminuir el tiempo de respuesta de estos métodos biológicos hasta niveles tales, que se ha hecho posible su medición con relativamente una alta frecuencia de muestreo.

La demanda bioquímica de oxígeno a corto plazo ( $\text{DBO}_{st}$ ) se define como la cantidad de oxígeno consumida en la biodegradación de compuestos orgánicos rápidamente (o fácilmente) degradables, por unidad de volumen de agua residual.

En el ensayo tradicional de la  $\text{DBO}_5$  (Sección 3.4.2), se adiciona una pequeña cantidad de biomasa a un volumen grande de muestra de agua residual (típicamente la relación inicial sustrato-biomasa  $S_0/X_0$  se fija entre 10/1 y 100/1  $\text{mg DBO}_5 \text{ mg SSVLM}^{-1}$ ). Como resultado, debe ocurrir un crecimiento sustancial de la biomasa antes de que se degraden los contaminantes disponibles y posiblemente puede haber una fase de adaptación del lodo al sustrato. Para acelerar el tiempo de respuesta (a un tiempo inferior a 1 hora), en la técnica de la determinación de la  $\text{DBO}_{st}$ , se utiliza una baja relación  $S_0/X_0$  (intervalo típico comprendido entre 1/20 y 1/200  $\text{mg DBO}_5 \text{ mg SSVLM}^{-1}$ ). Estas condiciones se obtienen adicionando una pequeña alícuota de agua residual al lodo activado presente en el recipiente del ensayo. De esta manera, el tiempo de degradación se reduce considerablemente (muy frecuentemente a menos de 1 hora), sin crecimiento significativo de la biomasa dada la relativamente baja cantidad de materia orgánica (sustrato) añadida.

Debido al corto tiempo que dura el ensayo, es evidente que los compuestos orgánicos lentamente biodegradables de la muestra no se degradan, o sea, solamente se mide la fracción que es fácilmente biodegradable. Tampoco hay tiempo para la adaptación de la biomasa a cualquier compuesto orgánico contenido en el agua residual a la que no haya sido expuesta con anterioridad. También es importante saber que no se debe de usar biomasa que tenga la capacidad de almacenar o acumular intracelularmente el sustrato, como es el caso de lodos que provienen de un proceso

de remoción biológica mejorada de fósforo (EBPR). El lodo procedente de los procesos EBPR contiene organismos acumuladores de fósforo (PAOs) que pueden acumular los ácidos grasos volátiles (AGV). Cuando la fracción de AGV de los compuestos rápidamente biodegradables es asimilada como material almacenado, no será oxidada de manera inmediata y por tanto no puede medirse con precisión en el ensayo respirométrico. Se recomienda al lector consultar también las secciones 3.5.3.2 y 3.5.3.3 (Figura 3.48).

La posibilidad de medir la fracción de materia orgánica rápidamente (fácilmente) biodegradable brinda una información muy relevante, particularmente para predecir y optimizar el desempeño de los procesos de desnitrificación o de los procesos de remoción biológica mejorada de fósforo. Como el ensayo respirométrico puede emplearse para distinguir entre los compuestos fácilmente y los lentamente biodegradables, este tipo de prueba brinda una base para realizar el fraccionamiento de la DQO de las aguas residuales, como método de caracterización en el contexto de la modelación matemática de los procesos de lodo activado (Sección 3.4.5).

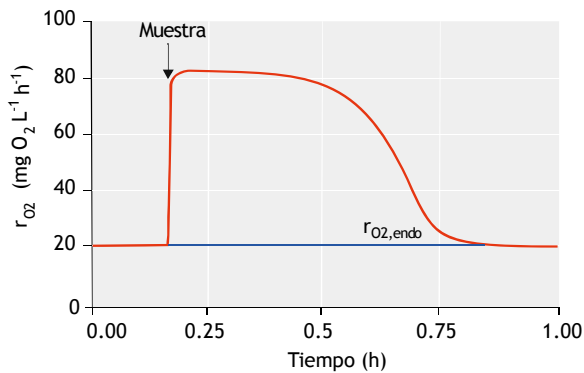
Debido al aumento de la respiración como resultado de la alta capacidad degradativa disponible en el recipiente del ensayo, pueden surgir problemas para satisfacer el requerimiento de oxígeno del lodo. Los métodos respirométricos que se basan en la medición del decrecimiento de la cantidad de oxígeno disuelto inicialmente presente pueden llegar a tener su uso severamente restringido por el riesgo de que el oxígeno se torne limitante. Ante ese temor, el intervalo de concentración de DBO que admiten esos métodos es pequeño, típicamente menor a 5 mg BOD<sub>st</sub> L<sup>-1</sup> para cada ciclo de medición. Es obvio que la posibilidad de re-aireaciones del lodo del que disponen muchos respirómetros resuelve este problema. Sin embargo, la intensidad de la aireación debe ser suficiente. Como en muchos casos el oxígeno disuelto es medido en el recipiente del ensayo, puede verificarse fácilmente si durante el ensayo de DBO<sub>st</sub> el oxígeno suministrado es suficiente (el OD siempre debe ser mayor de 2 mg L<sup>-1</sup>). En muchos respirómetros con capacidad de re-aeración entre los ciclos de medición, la concentración inicial de BOD<sub>st</sub> en el recipiente del ensayo puede fácilmente alcanzar hasta 100 mg BOD<sub>st</sub> L<sup>-1</sup>.

### 3.4.3.1 Ejecución del ensayo

Para realizar el ensayo de DBO<sub>st</sub>, primero se expone la muestra de lodo activado a temperatura constante (20°C,

por ejemplo) y se mantiene en aireación dentro del recipiente del ensayo hasta alcanzar condiciones estables caracterizadas en este caso por el llamado estado de respiración endógena. La respiración endógena se define como el estado que adquiere la biomasa cuando no hay más sustrato externo disponible en el lodo activado. La biomasa utiliza como sustrato su propia reserva, o aquellos compuestos que resultan de la lisis de la biomasa muerta. Llegar a este estado puede tomar desde muy pocas horas hasta un día, dependiendo de en qué medida el lodo activado contenga compuestos lentamente biodegradables (hidrolizables). Las velocidades típicas de respiración endógena se encuentran en el intervalo comprendido entre 2 y 10 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Segundo, una vez que se ha alcanzado el estado endógeno, se inyecta un pulso de agua residual. La cantidad de agua residual alimentada con el pulso se calcula teniendo en cuenta que se debe alcanzar una relación inicial de S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> de aproximadamente 1/20 a 1/200 mg DBO<sub>5</sub> mg SSVLM<sup>-1</sup>. La biomasa inicia la biodegradación del material orgánico tan pronto como el sustrato está disponible, aumentándose la velocidad de consumo de oxígeno rápidamente hasta alcanzar un valor máximo que es determinado por la actividad de la biomasa y la velocidad de degradación del sustrato. Si hay organismos nitrificantes presentes en el lodo, y el agua residual contiene nitrógeno nitrificable (amonio o nitrógeno orgánico que se amonifica rápidamente), esta velocidad de respiración exógena incluye también la tasa de consumo de oxígeno de la nitrificación. Los sustratos se agotan gradualmente y la velocidad de consumo de oxígeno también disminuye gradualmente, hasta alcanzar eventualmente el valor de la respiración endógena (r<sub>O<sub>2</sub>,endo</sub>). La curva de la tasa de consumo de oxígeno (r<sub>O<sub>2</sub></sub>) inducido por el pulso de sustrato recibe el nombre de respirograma, cuya representación esquemática aparece en la Figura 3.30.

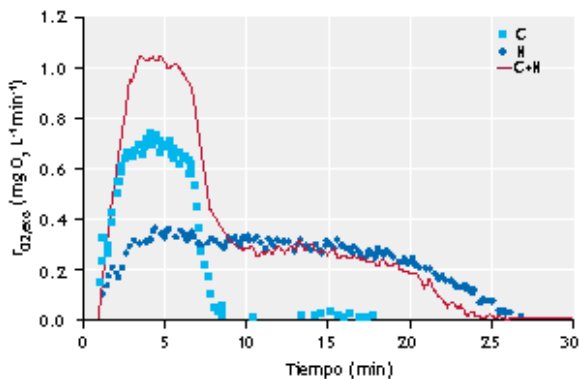
La Figura 3.31 permite observar que las velocidades de respiración exógena, heterótrofa *versus* autótrofa, son independientes y que sus respirogramas se superponen. En la figura se muestran tres respirogramas, uno con la adición solamente de una fuente de carbono como acetato (DQO), evidenciando la actividad heterótrofa, otro con la adición de amonio solamente, evidenciando la actividad de nitrificantes, y el tercero con la mezcla DQO/N.



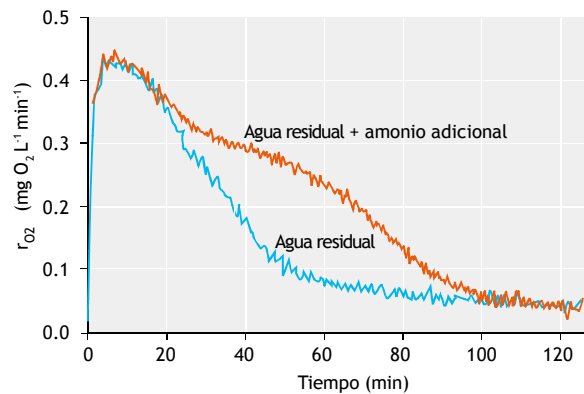
**Figura 3.30** Representación esquemática de un respirograma. Después que la biomasa ha alcanzado la respiración endógena (no hay sustrato externo presente), se inyecta la muestra conteniendo material orgánico. Inicia la respiración exógena y continúa hasta que todo el sustrato ha sido removido, y la respiración regresa a un nivel endógeno.

En las Figuras 3.32, 3.33 y 3.34 se aprecian algunos respirogramas típicos. Las tasas de respiración fueron calculadas directamente a partir de los datos de OD y con base en los principios respirométricos. Algunas de las figuras muestran únicamente las velocidades de respiración exógena.

En el respirograma de la Figura 3.32, es muy notable la presencia de respiración debida a la nitrificación. De hecho, cuando se inyecta una muestra de agua residual con un suplemento de amonio, puede observarse claramente la respiración exógena adicional debido a la nitrificación (en ausencia de inhibidores de nitrificación).



**Figura 3.31** Superposición de las tasas de respiración, sumando la velocidad de respiración exógena heterótrofa y autótrofa. Los cuadrados representan el respirograma con la adición de 20 mg DQO L<sup>-1</sup> de acetato, los círculos la velocidad de respiración debida a la nitrificación después de la adición de 2.5 mg N L<sup>-1</sup> y la línea continua es el respirograma de la mezcla de 20 mg DQO L<sup>-1</sup> y 2.5 mg N L<sup>-1</sup> (Kong *et al.*, 1996).

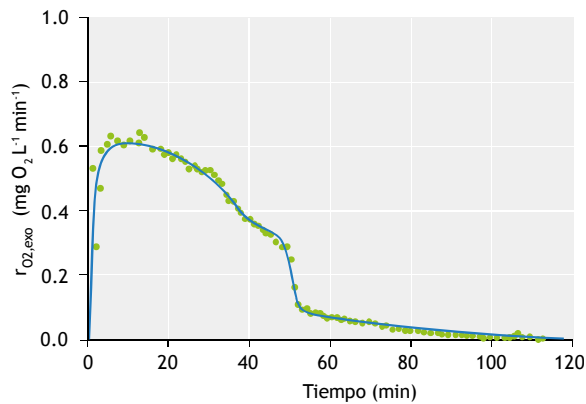


**Figura 3.32** Ejemplo de respirogramas obtenidos de un ensayo de DBO con agua residual solamente y con agua residual a la que se agregó cierta cantidad de amonio adicional (Petersen *et al.*, 2002a).

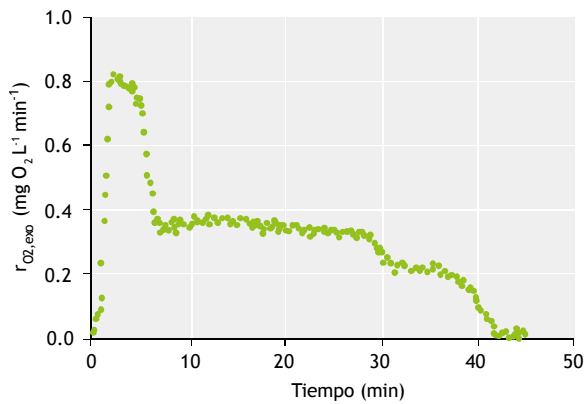
Cuando se realizan experimentos, uno con inhibidor de la nitrificación, y otro sin inhibidor, puede estimarse la concentración de amonio en el agua residual a partir de la diferencia entre las DBO<sub>st</sub> medidas de ambas muestras. Si esta diferencia entre las demandas se divide por 4.33 mg O<sub>2</sub> mg N<sup>-1</sup>, se obtiene la concentración de amonio de la muestra de agua residual (asumiendo que haya ocurrido la nitrificación completa a nitrato). Además, como el proceso de amonificación es normalmente muy rápido, no solamente el nitrógeno amoniacal puede ser estimado de esta forma, sino también de hecho todo el nitrógeno nitrificable contenido en la muestra de agua residual.

La Figura 3.33 muestra un ejemplo de un respirograma de una muestra de agua residual municipal típica agregada a la biomasa sin inhibidor de nitrificación. En esta gráfica la velocidad representada es la de respiración exógena. La interpretación del respirograma es la siguiente (Spanjers y Vanrolleghem, 1995). Enfocándose en el lado derecho del respirograma, se observa que la velocidad de respiración sufre un brusco decrecimiento a aproximadamente 50 min. Esta caída se debe a la completa remoción del amonio del lodo activado, momento después del cual solamente se oxida el material orgánico hidrolizable, por tanto el perfil de decrecimiento exponencial típico que es observado luego y que refleja el carácter de una cinética de primer orden de la hidrólisis.

El último ejemplo presenta el respirograma de un agua residual industrial (Figura 3.34).



**Figura 3.33** Ejemplo de respirograma obtenido de un ensayo de  $DBO_{st}$  con agua residual municipal (Spanjers y Vanrolleghem, 1995).



**Figura 3.34** Resultados de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) de un agua residual industrial, mostrando tres respirogramas superpuestos de tres compuestos (Coen *et al.*, 1998)

Otra vez se muestra solamente la velocidad de respiración exógena. El respirograma aparece como una suma de tres respirogramas superpuestos. Esto se explica por la presencia de tres solventes en el agua residual que fueron degradados simultáneamente por una biomasa aclimatada. Trazando tres líneas horizontales que coincidan con las mesetas de la gráfica, puede delinearse la cantidad de cada compuesto, tomando el área correspondiente a cada uno de ellos (ver el cálculo más abajo). Note que en la Figura 3.34 pueden usarse líneas horizontales porque las velocidades medidas en cada meseta corresponden a condiciones de saturación, de por lo menos uno de los sustratos (no limitantes), mientras que en otros casos (por ejemplo Figura 3.39) donde las condiciones de sustrato son limitantes, la velocidad de respiración decrece en la medida en que el sustrato se agota, y entonces se utilizan líneas inclinadas.

### 3.4.3.2 Cálculos

Como la  $DBO_{st}$  ( $mg\ O_2\ L^{-1}$ ) se define como la cantidad de oxígeno consumida en la biodegradación de contaminantes, puede calcularse fácilmente integrando en el tiempo las velocidades de respiración exógenas  $r_{O_2,exo}$  ( $mg\ O_2\ L^{-1}\ h^{-1}$ ):

$$DBO_{st} = \int_{t_{pulso}}^{t_{final}} r_{O_2,exo}(t) \cdot dt \quad \text{Ec. 3.20}$$

Donde,  $t_{pulso}$  es el tiempo al que se adiciona el pulso de sustratos, y  $t_{final}$  es el tiempo final cuando la velocidad de respiración alcanza otra vez el nivel de respiración endógena, una vez agotado el sustrato de la muestra.

Evidentemente, la  $DBO_{st}$  de la muestra inyectada se deduce de:

$$DBO_{st}^{muestra} = \frac{V_{lodo} + V_{muestra}}{V_{muestra}} \cdot DBO_{st} \quad \text{Ec. 3.21}$$

Donde,  $V_{muestra}$  y  $V_{lodo}$  son los volúmenes de las muestras de agua residual y de lodo que fueron añadidas en el recipiente al inicio del ensayo.

Como ya fue explicado en el contexto de la Figura 3.31, la cantidad de nitrógeno que puede ser nitrificado ( $N_{nit}$  en  $mg\ N\ L^{-1}$ ) se calcula de la parte del respirograma que es atribuible a la velocidad de respiración debida a la nitrificación  $r_{O_2,exo}^{Nit}$  ( $mg\ O_2\ L^{-1}\ h^{-1}$ ):

$$N_{Nit} = \frac{1}{4,57 - Y_{ANO}} \int_{t_{pulso}}^{t_{final}} r_{O_2,exo}^{Nit}(t) \cdot dt \quad \text{Ec. 3.22}$$

Donde  $Y_{ANO}$  es el coeficiente de rendimiento de los organismos nitrificantes, que tiene un valor típico de  $0.24\ mg\ DQO\ mg\ N^{-1}$ .

De manera similar, la  $BOD_{st}$  debida a cada una de las  $i$  diferentes fracciones de materia orgánica presentes en el agua residual puede calcularse a partir de la curva de velocidad de respiración exógena que corresponde a la contribución individual de cada uno de los respirogramas que están superpuestos, ( $r_{O_2,exo}^i$  ( $mg\ O_2\ L^{-1}\ h^{-1}$ ))(Figura 3.33):

$$DBO_{st}^i = \int_{t_{pulso}}^{t_{final}} r_{O_2,exo}^i(t) \cdot dt \quad \text{Ec.3.23}$$

### 3.4.4 Toxicidad e inhibición

#### 3.4.4.1 Propósito

La respirometría es frecuentemente utilizada como técnica para evaluar los efectos inhibitorios y tóxicos que sobre la biomasa tienen algunas sustancias y aguas residuales (Volskay y Grady, 1990). La inhibición es una afectación de la función biológica, normalmente reversible, mientras que la toxicidad es un efecto adverso sobre el metabolismo biológico, que normalmente se traduce en una inhibición irreversible (Batstone *et al.*, 2002). En este capítulo se prefiere utilizar los términos toxicidad y tóxico (agente tóxico) para cubrir ambos efectos, reversible e irreversible. Aunque los resultados del ensayo de toxicidad frecuentemente se expresan en términos de  $IC_{50}$  (la concentración que produce el 50 % de inhibición de la respiración), el  $IC_{50}$  no brinda una visión completa del efecto tóxico de una sustancia dada. Para predecir el efecto de una sustancia en la remoción de compuestos orgánicos y de nutrientes, o para diseñar acciones de mitigación en los procesos de tratamiento biológico, debe cuantificarse la cinética de la biodegradación del agente tóxico.

#### 3.4.4.2 Ejecución del ensayo

Para evaluar la toxicidad puede utilizarse la disminución de la velocidad de respiración, tanto exógena como endógena. Si se emplea la disminución de la velocidad de respiración endógena como indicador de la toxicidad, la biomasa debe ser llevada a condición endógena antes de adicionar el compuesto (o agente) tóxico, y posteriormente se mide la reducción en la velocidad de respiración. Si el compuesto tóxico o el agua residual que posee carácter tóxico son biodegradables, puede tener lugar la respiración exógena, interfiriendo con la evaluación de la reducción de la velocidad de respiración endógena. Por otro lado, se ha encontrado que la biomasa es menos sensible a los tóxicos cuando está en condiciones endógenas.

La evaluación de la toxicidad a partir de la velocidad de respiración exógena se realiza con base en respirogramas (ver Sección 3.4.3.1). En los ensayos basados en la velocidad exógena se inyecta un sustrato de referencia (acetato para ensayos de toxicidad heterótrofa o amonio para toxicidad en nitrificantes) antes de la adición de la muestra potencialmente tóxica, para evaluar la velocidad de respiración de referencia (actividad de la biomasa). Posteriormente a que el

agente tóxico sea añadido y de haber transcurrido el tiempo suficiente para que la biomasa pueda haber sido afectada, se inyecta otro pulso con el sustrato de referencia y la velocidad de respiración (actividad de la biomasa) que se obtiene en esta segunda situación se compara con la anterior (que no tenía ninguna sustancia tóxica). Debe destacarse que el tiempo transcurrido entre la adición del agente tóxico y la adición del sustrato puede afectar el nivel de toxicidad medido, ya que un tiempo más prolongado de exposición puede conducir a un efecto mayor, o inclusive a la adaptación de la biomasa (Figura 3.35). No hay un criterio definido acerca del tiempo óptimo de exposición. Algunas veces, incluso puede ocurrir que en presencia de algunos compuestos tóxicos se estimule la velocidad de respiración, es decir que la tasa máxima de respiración sea mayor con la presencia de un tóxico, que sin él. Esto se debe a un posible incremento en los requerimientos energéticos de la biomasa al enfrentarse con los agentes tóxicos (por ejemplo en el desacoplamiento energético causado por el ácido benzoico, como agente tóxico). En todos los casos, importa reportar siempre el tiempo transcurrido entre la inyección del agente tóxico y la del sustrato de referencia.

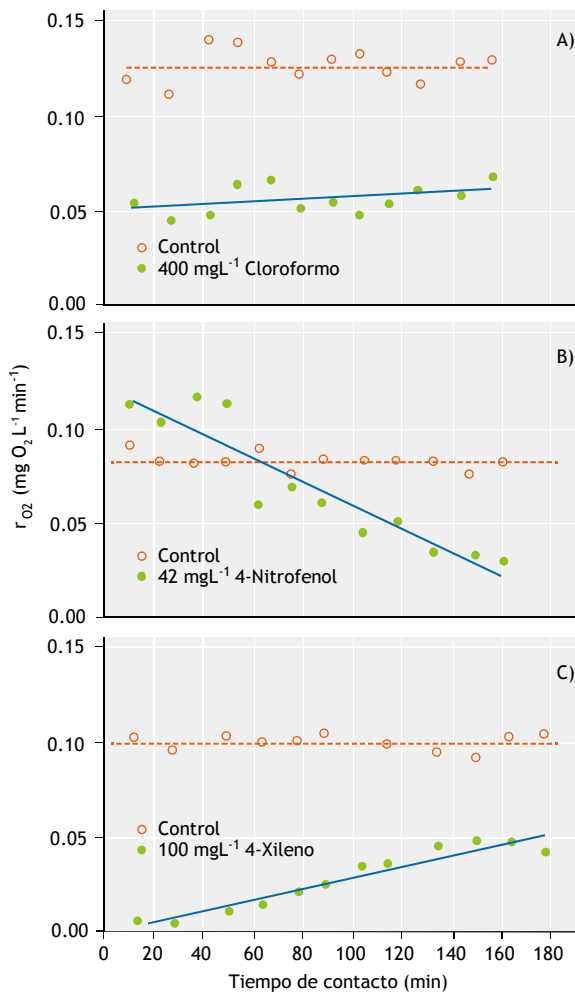
#### 3.4.4.3 Cálculos

Calculando la relación que existe entre el nivel de actividad antes y después de la adición de un tóxico, puede determinarse la severidad del nivel de toxicidad ocurrida.

$$\text{Toxicidad (\%)} = \frac{r_{O_2, \text{exo}}^{\text{max}}(\text{antes}) - r_{O_2, \text{exo}}^{\text{max}}(\text{después})}{r_{O_2, \text{exo}}^{\text{max}}(\text{antes})} \times 100$$

Ec. 3.24



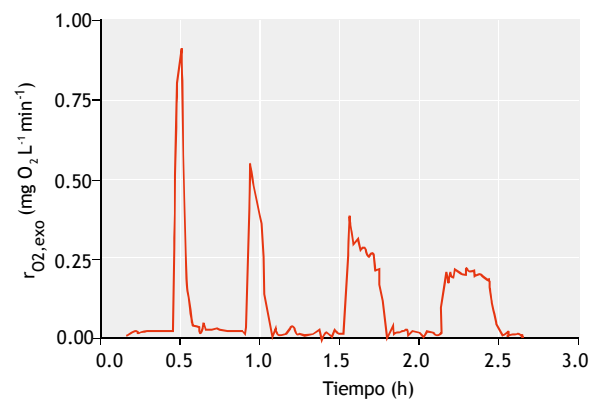


**Figura 3.35** Datos típicos de ensayos de inhibición de respiración a diferentes tiempos de contacto (A) Cloroformo, (B) 4-Nitrofenol, y (C) 4-Xileno (Volskay y Grady, 1990)

Es obvio que el nivel de severidad de la toxicidad depende de la dosis aplicada de agente tóxico. De una serie de experimentos en los que se mida la respuesta a diferentes dosis se podrán obtener curvas de dosis-respuestas, permitiendo la evaluación de  $IC_{50}$  (concentración inhibitoria media). Normalmente el protocolo de los ensayos para obtener la relación dosis-efecto consiste en realizar una secuencia de ensayos referencia-tóxico-referencia a una dosis, reemplazar la biomasa con otra biomasa fresca, y realizar otra secuencia referencia-tóxico-referencia a otra dosis superior. Comúnmente la concentración de la dosis es un múltiplo de la anterior. Esta secuencia de referencia-tóxico-referencia se continúa hasta que la biomasa se inhibe totalmente.

Para acelerar la etapa experimental puede omitirse el paso del remplazo de la biomasa (Kong *et al.*, 1994), pero en este caso el tiempo de contacto deja de ser una variable bajo control en el experimento. En la Figura 3.36 se presenta un ejemplo de determinación rápida de la relación dosis-efecto del cobre sobre un cultivo bacteriano, con dosis crecientes de 0, 2.5, 5.0 y 10.0 ppm del metal y diferentes tiempos de contacto para cada dosis. La figura demuestra claramente que la velocidad de degradación de acetato (el sustrato de referencia en el experimento) decrece rápidamente. Es destacable que el área bajo la curva permanece constante (correspondiendo a la  $DBO_{st}$ , Sección 3.4.3), ya que en todos los casos, todo el acetato se degrada, aunque el tiempo requerido para la degradación es cada vez más largo.

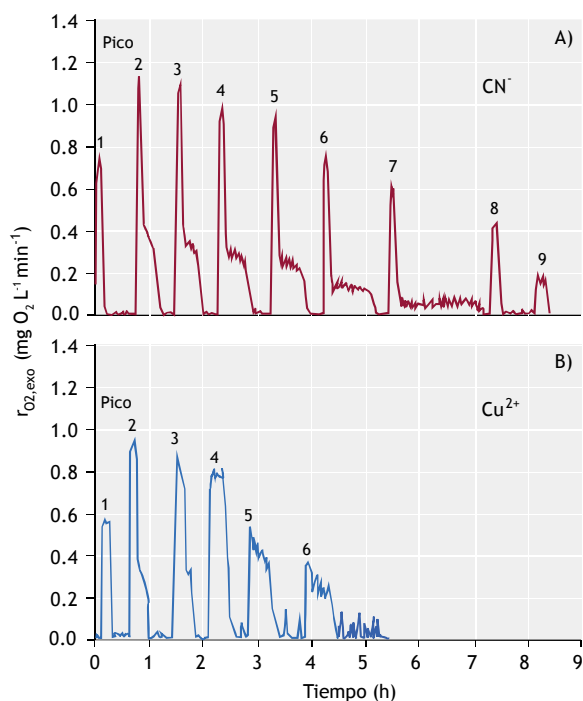
De este experimento, el  $IC_{50}$  puede deducirse visualmente, siendo aproximadamente de 7.5 ppm, ya que la máxima velocidad de respiración a esta concentración de cobre es la mitad de la velocidad de respiración máxima en ausencia de cobre (puede compararse el primer respirograma a ~0.5 h, con el tercero a ~1.7 h).



**Figura 3.36** Respirogramas típicos obtenidos en ensayos realizados en un ARIKA (Automated Respiration Inhibition Kinetics Analysis) con cobre (Kong *et al.*, 1994). El primer respirograma fue obtenido usando acetato puro, y para los respirogramas sucesivos fue usada una mezcla de acetato con concentraciones crecientes de tóxicos (a una concentración acumulada de tóxicos de 2.5, 7.5 y 17.5 ppm).

Como ha sido mencionado previamente, los respirogramas heterótrofos y autótrofos pueden superponerse, por lo que es posible realizar ensayos de toxicidad sobre la actividad heterótrofa y autótrofa simultáneamente, en un solo experimento con una mezcla de DQO y N como sustrato de referencia. En la Figura 3.37 se evalúa el impacto de dos agentes tóxicos

clásicos, cobre y cianuro sobre biomasa heterótrofa y autótrofa. Esta serie de respirogramas empleando concentraciones crecientes del tóxico demuestra que los organismos nitrificantes son más sensibles al cianuro que los heterótrofos ( $IC_{50}$  es aproximadamente 0.2 ppm para nitrificantes, mientras que para los heterótrofos es cercano a 1 ppm). Para el cobre, el  $IC_{50}$  para los oxidantes del acetato y para los nitrificantes es aproximadamente el mismo, en la medida que todo el respirograma decrece como un solo conjunto.



**Figura 3.37** Respirogramas exógenos después de la adición de sustratos de C y N (20 mg L<sup>-1</sup> y 2 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente), en presencia de Cu<sup>2+</sup> (A) y CN<sup>-</sup> (B) como sustancias tóxicas. El primer pico es del acetato puro, el segundo es de la mezcla de C y N sin tóxico, seguido de otros picos para una serie de mezclas de C y N (sustratos) con diferentes niveles de concentración acumulada del tóxico Cu<sup>2+</sup> o CN<sup>-</sup> (concentración acumulada de 2.5, 7.5, 17.5, 37.5, 77.5 y 157.5 ppm de Cu<sup>2+</sup>, versus 0.013, 0.038, 0.088, 0.188, 0.388, 0.788 y 1.588 ppm de CN<sup>-</sup>) (Kong *et al.*, 1996).

#### 3.4.4.4 Compuestos tóxicos biodegradables

Hasta el momento solamente han sido considerados los compuestos tóxicos no biodegradables. Sin embargo, usar la respirometría para determinar la toxicidad de sustancias biodegradables es más laborioso. Cuando para determinar toxicidad se utiliza la secuencia típica conocida como referencia-tóxico-referencia, el tóxico biodegradable originará un respirograma inmediatamente después de su inyección. Por lo tanto,

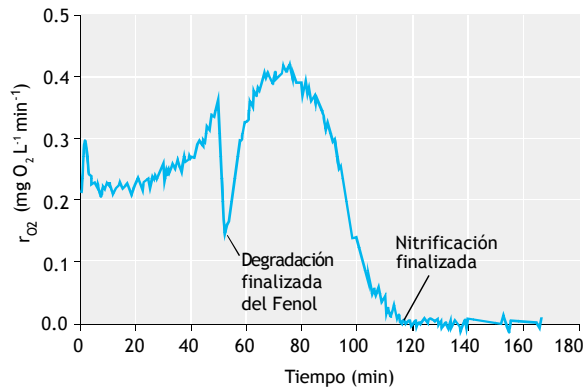
esto debe completarse antes de que se pueda añadir el segundo pulso de sustrato de referencia. Si el impacto tóxico es reversible (es decir, se trata de una inhibición), puede ser que no se detecte toxicidad alguna ya que el tóxico es eliminado del lodo activado al ser asimilado por la biomasa. Sin embargo, contrariamente a esta toxicidad temporal (no duradera), la toxicidad duradera se puede evaluar si se sigue una secuencia que considere la adición de la sustancia de referencia, seguida de la tóxica y una vez más la dereferencia (referencia-tóxica-referencia), como se ha explicado anteriormente.

La respirometría puede ser muy útil para estudiar un determinado número de compuestos tóxicos biodegradables que son inhibidores de su propia biodegradación y que son denominados sustratos inhibidores, es decir, el sustrato con el cual la biomasa crece es inhibidor del proceso de crecimiento de la biomasa. La nitrificación también puede ser auto-inhibida cuando la concentración de amoníaco es demasiado alta. Los respirogramas de tales sustratos auto-inhibidores muestran una velocidad de respiración creciente a medida que la concentración del tóxico biodegradable disminuye con el tiempo y su efecto inhibidor se reduce.

La Figura 3.38 ilustra cómo la respirometría puede explicar fenómenos complejos que ocurren cuando un proceso biológico de tratamiento de aguas residuales es expuesto a compuestos tóxicos (Gernaey *et al.*, 1999).

En este ejemplo el fenol y el amonio se añaden a una mezcla de biomasa formada por bacterias heterótrofas y nitrificantes. El fenol es uno de los mejores ejemplos conocidos de compuestos que son tóxicos, pero que son biodegradables al mismo tiempo. En un ensayo preliminar se había confirmado que el fenol puede ser degradado por la biomasa empleada. Lo que se observa en el ensayo respirométrico representado en la Figura 3.38 es que la nitrificación es inhibida por el fenol, mismo que estuvo siendo degradado gradualmente por las bacterias heterótrofas. Sin embargo, la degradación del fenol como tal es también inhibida por los efectos tóxicos que tiene sobre los heterótrofos. Esta es una situación de auto-inhibición. En la primera fase se inhibe la nitrificación, pero el fenol es degradado, aunque lentamente. La degradación del fenol acelera su velocidad después de 30 min y finaliza después de los 50 min, como puede verse por la pronunciada caída en el perfil de  $r_{O_2,exo}$ . Tan pronto como la degradación del fenol finaliza, se incrementa la nitrificación hasta obtener la misma velocidad que la

que tenía antes de la adición de fenol (puede realizarse un ensayo separado con adición de amonio para evaluar solamente el efecto sobre la nitrificación).



**Figura 3.38** Respuesta respirométrica de una biomasa formada por una mezcla de heterótrofos y nitrificantes ante la adición de una mezcla de fenol (15 mg L<sup>-1</sup>) y amonio (5 mg N L<sup>-1</sup>). Solamente se muestra la velocidad exógena (Gernaey *et al.*, 1999).

Debido a que la concentración inhibitoria depende del origen de la biomasa (procedencia e historia) y de su adaptación, puede ser interesante el estudio de la toxicidad de los compuestos frente a una biomasa adaptada. Un ejemplo de estudio de adaptación o aclimatación basado en un experimento respirométrico, con incremento progresivo del IC<sub>50</sub> y del coeficiente de inhibición, puede encontrarse en Rezouga *et al.* (2009).

### 3.4.5 Fraccionamiento del agua residual

El empleo de modelos dinámicos en los procesos de lodo activado se ha extendido cada vez más y convertido en una manera de pensar y comunicar acerca de los procesos de tratamiento de aguas residuales. El Modelo de Lodo Activado No. 1, conocido como ASM1 por sus siglas del nombre en inglés (Activated Sludge Model No.1; Henze *et al.*, 1987) es generalmente aceptado como el “estado del arte”, y utilizado para la simulación de PTARs en muchos estudios. El modelo fue presentado por un grupo de trabajo de la asociación IAWQ (actual IWA) sobre “Modelación matemática para diseño y operación de procesos biológicos de tratamiento de agua residual”. El ASM1 constituirá la base de esta sección que trata del uso de la respirometría para la obtención de las fracciones de sustratos del agua residual, en el contexto del ASM1.

Antes de establecer la relación entre la velocidad de respiración y las fracciones de los componentes del

ASM1, es importante explicar este modelo, en cuanto a los procesos heterótrofos (Tabla 3.3). Se asume que el lector comprende la matriz de Gujer mostrada en la Tabla 3.3. En el balance de masas de los organismos heterótrofos X<sub>OHO</sub> (componente No. 5, de manera abreviada: c.5), la producción de X<sub>OHO</sub> por el crecimiento aerobio (proceso o reacción 1, de manera abreviada: r.1) es contrarrestado por la pérdida de X<sub>OHO</sub> debido a la muerte de heterótrofos (r.4). En este proceso de muerte, el componente X<sub>OHO</sub> (c.5) se convierte en el componente X<sub>CB</sub> (c.4). Esta producción de X<sub>CB</sub> es contrarrestada por la pérdida de X<sub>CB</sub> por hidrólisis (r.7), dando lugar a la producción del componente S<sub>B</sub> (c.2). S<sub>B</sub> es usado para el crecimiento heterótrofo (r.1) mientras es convertido en el componente X<sub>OHO</sub> (c.5) a expensas del componente oxígeno S<sub>O2</sub> (c.8), esto es la respiración. Un razonamiento similar puede hacerse para los procesos que involucran los componentes solubles y particulados del nitrógeno (S<sub>NHx</sub>, S<sub>B,N</sub> y X<sub>CB,N</sub>) y los organismos autótrofos (nitrificantes) (X<sub>ANO</sub>). El crecimiento anóxico (r.2) con nitrato S<sub>NOx</sub> (c.9) como último aceptor de electrones es también considerado.

Por tanto, en lo adelante, las fracciones de aguas residuales que serán cuantificadas usando respirometría aerobia o anóxica son las fracciones de DQO biodegradables (S<sub>B</sub> y X<sub>CB</sub>), la biomasa potencialmente presente en el agua residual (X<sub>OHO</sub> y X<sub>ANO</sub>) y las fracciones de nitrógeno (S<sub>NHx</sub>, S<sub>B,N</sub> y X<sub>CB,N</sub>). Otras fracciones inertes también pueden ser determinadas usando datos de respirometría, pero para lo anterior, se necesitará de análisis químicos adicionales que informen sobre las fracciones de DQO soluble y total, y de nitrógeno soluble. Esto no se tratará en el presente capítulo, pero puede hallarse en Vanrolleghem *et al.* (1999) y Petersen *et al.* (2003).

De acuerdo con el ASM1, la velocidad de respiración total de la biomasa en contacto con el agua residual es:

$$r_{O_2, \text{tot}} = \frac{1 - Y_{OHO}}{Y_{OHO}} \cdot X_{OHO} \cdot \mu_{OHO} + \frac{4.57 - Y_{ANO}}{Y_{ANO}} \cdot X_{ANO} \cdot \mu_{ANO} \quad \text{Ec. 3.25}$$

Donde las velocidades de crecimiento específico  $\mu_{OHO}$  y  $\mu_{ANO}$  son funciones (tipo Monod) de S<sub>B</sub> y S<sub>NHx</sub>, respectivamente (Henze *et al.*, 1987).

A su vez, las concentraciones de S<sub>B</sub> y S<sub>NHx</sub>, dependen de las velocidades a las que X<sub>CB</sub>, S<sub>N,B</sub> y X<sub>CB,N</sub> son degradados (Tabla 3.3). Está claro que todos los procesos independientes resumidos en la Tabla 3.3 inciden eventualmente sobre la transferencia de masa

del oxígeno (y nitrato si la misma evaluación se hace para condiciones anóxicas).

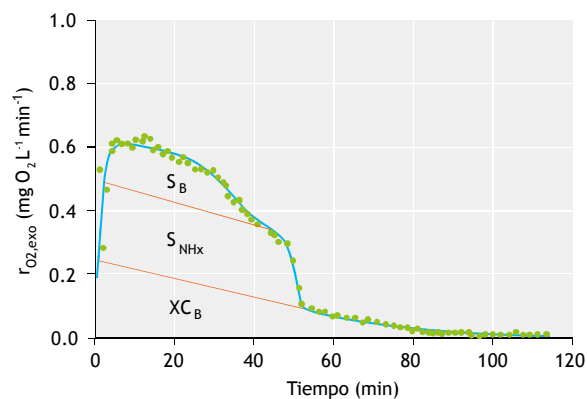
Hay dos enfoques para la determinación de las fracciones (o componentes del agua residual) definidas en el modelo. Por un lado, existen los métodos directos centrados en fracciones específicas que pueden ser evaluadas directamente de las mediciones de velocidades de respiración (Ekama *et al.*, 1986; Spanjers *et al.*, 1999), mientras que por otro lado existen los métodos indirectos de optimización vía el ajuste de modelos a los datos experimentales (Kappeler y Gujer, 1992; Wanner *et al.*, 1992; Spanjers y Vanrolleghem, 1995). En este último caso, se utilizan técnicas numéricas para hallar los valores de las fracciones no conocidas de las aguas residuales, que conduzcan a las menores desviaciones entre los valores de velocidad de respiración que predice el modelo y los valores medidos. Los métodos de optimización utilizando técnicas numéricas para las estimaciones no se discuten aquí, pero se referencian en el Capítulo 5.

De los procesos descritos en la Tabla 3.3, queda claro que la velocidad total de respiración está afectada por la concentración de todos los componentes biodegradables y que el consumo acumulado de oxígeno (la integral de  $r_{O_2}$ ) es una medida de las masas de componentes degradados. Observe que debido a que en métodos directos se toman integrales de las velocidades de respiración, la frecuencia de medición y las relaciones señal/ruido (error de medición comparado con el valor de medición) no son muy críticas para la evaluación fiable de las concentraciones de los componentes. Esto contrasta con el caso de la caracterización cinética (Vanrolleghem *et al.*, 1999 y Petersen *et al.*, 2003), donde la información se obtiene de cambios en las velocidades de respiración (derivada de  $r_{O_2}$ ). Esto requiere una dependencia mucho mayor de la precisión de los parámetros sobre la calidad de medición respirométrica.

El uso de biomasa es inherente a las pruebas respirométricas para la caracterización de aguas residuales: la evaluación de los componentes de las aguas residuales se basa en la respuesta respirométrica de la biomasa a las mismas. Dos aspectos importantes están asociados con el uso de la biomasa. El primero es la cantidad de DQO del agua residual con respecto a la biomasa (relación  $S_0/X_0$ , secciones 3.4.1.3 y 3.4.3) que se utiliza. En segundo lugar, en el concepto de muerte-regeneración adoptado en el ASM1 para representar el

proceso de decaimiento de las biomasa, hay nuevas cantidades de  $S_B$ ,  $XC_B$ ,  $S_{NHx}$ ,  $S_{N,B}$  y  $XC_{N,B}$  que se generan continuamente a partir de la biomasa en descomposición. En este modelo, por lo tanto, es difícil distinguir entre los componentes originarios de las aguas residuales y los que se derivan de la propia biomasa. De hecho, la transición entre la respiración exógena y la respiración endógena es gradual. Por tanto, el ensayo respirométrico debe organizarse de manera tal que se puedan distinguir estas velocidades. Este es uno de los problemas más desafiantes en la caracterización respirométrica de aguas residuales en el contexto de ASM1.

La Figura 3.39 muestra un respirograma tomado de un experimento en batch en el que al inicio se adicionó agua residual a un lodo endógeno.



**Figura 3.39** Perfil de respiración exógena obtenido después de adicionar 0.7 L de agua residual a 1.3 L de lodo activado y fraccionamiento de los componentes de acuerdo al procedimiento descrito por Spanjers y Vanrolleghem (1995b).

Tabla 3.3 Modelo ASM 1 de Lodo Activado: matriz Gujer (Henze et al., 1987)

Component (i) → ↓ Process (j)	1 S <sub>O</sub>	2 S <sub>B</sub>	3 X <sub>A,INF</sub>	4 X <sub>C,B</sub>	5 X <sub>O,H</sub>	6 X <sub>A,NO</sub>	7 X <sub>GLE</sub>	8 S <sub>O2</sub>	9 S <sub>NOX</sub>	10 S <sub>NH</sub>	11 S <sub>B,N</sub>	12 X <sub>C,B,N</sub>	13 S <sub>A,S</sub>	Process rate (p <sub>j</sub> )
1 Aerobic growth of heterotrophic biomass		$\frac{1}{Y_{O,H}}$			1			$-\frac{1-Y_{O,H}}{Y_{O,H}}$		$-f_{X,C,B,H}$			$-\frac{f_{X,C,B,H}}{14}$	$\mu_{O,H,ASM} \frac{S_B}{K_{S,B,O,H} + S_B} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}} \frac{X_{O,H}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}}$
2 Anoxic growth of heterotrophic biomass		$-\frac{1}{Y_{O,H}}$			1					$-f_{X,B,H}$			$-\frac{1-Y_{O,H}}{14+2.85Y_{O,H}} \frac{f_{X,C,B,H}}{14}$	$\mu_{O,H,ASM} \frac{S_B}{K_{S,B,O,H} + S_B} \frac{K_{O_2,O,H}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}} \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3,O,H} + S_{NO_3}} \frac{X_{O,H}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}}$
3 Aerobic growth of autotrophic biomass						1		$\frac{4.57 - Y_{A,NO}}{Y_{A,NO}}$	$-\frac{1}{Y_{A,NO}}$	$-f_{X,C,B,A}$			$-\frac{f_{X,C,B,A}}{14}$	$\mu_{A,NO,ASM} \frac{S_{NH}}{K_{S,NH,A,NO} + S_{NH}} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2,A,NO} + S_{O_2}} \frac{X_{A,NO}}{K_{O_2,A,NO} + S_{O_2}}$
4 Decay of heterotrophic biomass				$1 - f_{X,C,B,H}$	-1							$f_{X,C,B,H} - f_{X,C,B,A}$	$b_{O,H} X_{O,H}$	
5 Decay of autotrophic biomass				$1 - f_{X,C,B,A}$	-1							$f_{X,C,B,A} - f_{X,C,B,H}$	$b_{A,NO} X_{A,NO}$	
6 Ammonification of soluble organic nitrogen									1	1	-1		$\frac{1}{14}$	$q_{am} S_{B,N} X_{O,H}$
7 Hydrolysis of slowly biodegradable substrate		1		-1										$q_{X,C,B} \frac{X_{C,B}}{X_{O,H}} \frac{X_{A,NO}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}} \left( \frac{S_{O_2}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}} \frac{K_{O_2,NO_3}}{K_{O_2,NO_3} + S_{O_2}} + \eta_{hydro} \frac{X_{O,H}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}} \right) \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3,O,H} + S_{NO_3}} \frac{X_{A,NO}}{K_{O_2,O,H} + S_{O_2}}$
8 Hydrolysis of organic nitrogen											1	-1		$\rho_T (X_{C,B} / X_{C,B})$



En la Figura 3.39 se presenta solamente la velocidad de respiración exógena, obtenida al sustraer la respiración endógena de la total. Un respirograma típico de agua residual muestra un pico inicial producido por la oxidación de la fracción de materia orgánica fácilmente biodegradable, seguido de una o más inflexiones donde sucesivamente continúan siendo oxidados otros componentes. De acuerdo a la ecuación anterior de velocidad de respiración total, el área total debajo de la curva del respirograma representa el total de componentes biodegradables  $[(S_B + X_{C_B}) / (1 - Y_{OHO})] + [(S_{NH_x} + S_{N,B} + X_{C_{N,B}}) / (4,57 - Y_{ANO})]$ . En la Figura 3.39 pueden distinguirse tres fracciones de sustrato, correspondientes a  $S_B$ ,  $X_{C_B}$  y  $S_{NH_x}$ .

### 3.4.5.1 Sustrato fácilmente biodegradable ( $S_B$ )

El sustrato fácilmente biodegradable está formado presumiblemente de compuestos solubles de baja masa molecular, tales como los AGV y alcoholes (Henze *et al.*, 1992). Entre las características de estos compuestos están que se degradan muy fácilmente y por tanto tienen una rápida respuesta respirométrica.

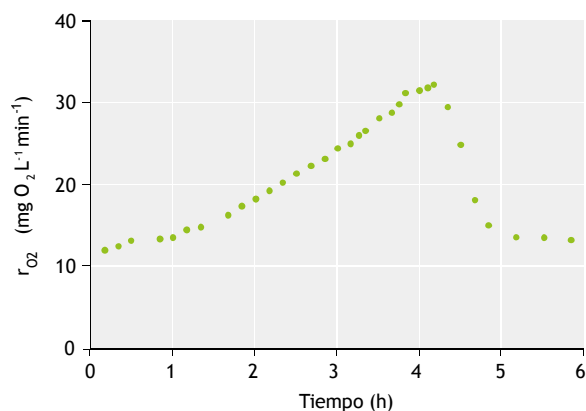
Un ensayo típico en batch para la determinación de  $S_B$  (Ekama *et al.*, 1986) implica la adición de la muestra de agua residual a un lodo endógeno y medir o registrar la velocidad de respiración hasta que retorne al nivel donde razonablemente pueda asumirse que el sustrato fácilmente biodegradable fue totalmente removido. Si otros procesos que consumen oxígeno también ocurren (como la respiración endógena y la nitrificación), su contribución a la respiración debe identificarse o sus valores deben asumirse, de manera tal que el  $r_{O_2}$  de estos procesos puede sustraerse de la velocidad de respiración total (Figura 3.39). Si se desea la nitrificación puede inhibirse (Sección 3.4.2). Solamente cuando todos los otros procesos consumidores de oxígeno hayan sido tomados en cuenta, es que la velocidad de respiración relacionada con la oxidación de sustratos fácilmente biodegradables ( $r_{O_2,exo}^{S_B}$ ) podrá ser identificada, y utilizada para calcular la concentración  $S_B$  en el agua residual.

La concentración de sustrato fácilmente biodegradable inicialmente presente en la mezcla de biomasa y agua residual podrá entonces ser calculada como sigue:

$$S_B(0) = \frac{1}{1 - Y_{OHO}} \left( \int_0^{t_{fin}} r_{O_2,exo}^{S_B}(t) dt \right) \quad \text{Ec. 3.26}$$

Para el cálculo de la concentración de  $S_B$  en el agua residual ha de tenerse en cuenta la dilución. El punto final  $t_{final}$  del intervalo de integración es el instante de tiempo donde  $S_B$  es completamente oxidado y donde la velocidad de respiración exógena llega a cero. La integral puede ser determinada con facilidad estimando el área bajo la curva, empleando cualquier método gráfico o numérico. Una alternativa a este método directo es el método de optimización ya explicado. Este consiste en resolver las ecuaciones del balance de masas con algún método numérico para predecir la velocidad de respiración exógena para  $S_B$  en el experimento en batch. Dependiendo del valor inicial  $S_B(0)$  dado al algoritmo de integración, la simulación dará lugar a diferentes respirogramas predictivos. De esa manera se podrá seleccionar el valor de  $S_B(0)$  que brinde el mejor ajuste a los datos medidos. Para esta simple aplicación, el método de optimización puede parecer un poco excesivo, pero para procesos más complejos de estimación (ver párrafo siguiente), se hace más práctico que el llamado método directo de cálculo.

Observe que para el cálculo de  $S_B$  a partir de la velocidad de respiración es necesario conocer el coeficiente de rendimiento heterótrofo,  $Y_{OHO}$ . Este coeficiente estequiométrico siempre está involucrado cuando el consumo de oxígeno es convertido a sustrato equivalente (ver también la próxima sección y las Secciones 3.4.5.2 -3.4.5.6). El ensayo en batch descrito arriba es empleado también para evaluar otros componentes y parámetros cinéticos del ASM1, usando el método de optimización en el caso de las constantes cinéticas.

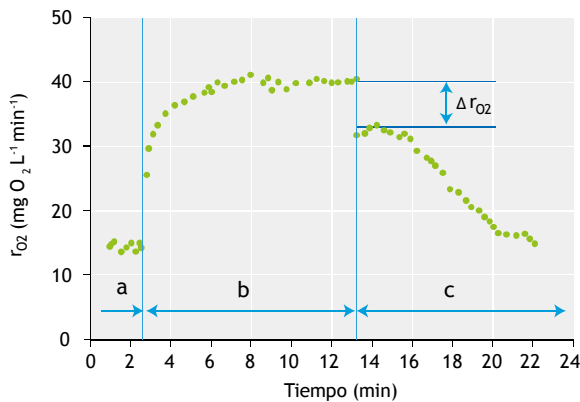


**Figura 3.40** Velocidades de respiración medidas en un ensayo en batch (Kappeler y Gujer, 1992) para la determinación de la fracción de sustrato fácilmente biodegradable, de acuerdo al método de Wentzel *et al.* (1995).

Otro ensayo en batch (Wentzel *et al.*, 1995) consiste en el seguimiento de la velocidad de respiración del agua residual municipal no sedimentada y sin inocular, durante un largo período (hasta aproximadamente 20 h). Se obtiene un respirograma similar al mostrado en la Figura 3.40. El valor de  $S_B$  se calcula a partir de las velocidades de respiración observadas entre el inicio del ensayo, hasta la caída abrupta (debido al agotamiento de  $S_B$ ), e incluyendo una corrección por el incremento de la respiración endógena debido al aumento de la biomasa durante el ensayo. Adicionalmente a  $Y_{OHO}$ , es necesario conocer la tasa de crecimiento neto, la cual puede ser obtenida del mismo ensayo.

Ekama *et al.* (1986) presentaron un método para determinar  $S_B$  que involucra el seguimiento de la velocidad de respiración en un reactor completamente mezclado que opera con una alimentación cíclica diaria. Se asume que la disminución brusca observada en la velocidad de respiración al momento de concluir la adición del sustrato (Figura 3.41), corresponde únicamente a la cantidad de  $S_B$  que ha entrado vía el afluente. Entonces, la concentración del sustrato fácilmente biodegradable en el agua residual puede ser calculada como:

$$S_B = \frac{V_{\text{react}}}{Q_{\text{ww}}} \cdot \frac{\Delta r_{O_2, \text{tot}}}{1 - Y_{OHO}} \quad \text{Ec. 3.27}$$



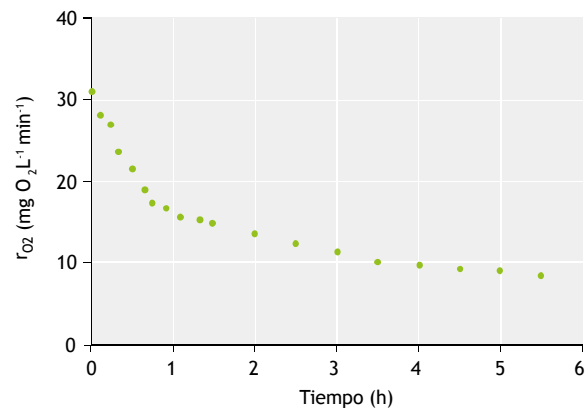
**Figura 3.41** Velocidad de respiración ( $r_{O_2}$ ) obtenida usando el método experimental de Ekama *et al.* (1986) y permitiendo la estimación directa de la concentración de sustrato fácilmente biodegradable,  $S_B$ .

### 3.4.5.2 Sustrato lentamente biodegradable ( $X_{CB}$ )

Se asume que el sustrato lentamente biodegradable  $X_{CB}$ , a veces también definido como materia orgánica particulada biodegradable, está constituido de compuestos (macro-moleculares) que van desde la

condición soluble hasta coloidal y particulada (Henze, 1992). La característica común de estos compuestos es que no pueden pasar a través de la membrana celular y primero deben sufrir una hidrólisis para transformarse en compuestos de baja masa molecular ( $S_B$ ) que posteriormente pueden ser asimilados y oxidados. Debido a que la velocidad de hidrólisis es menor que la velocidad de oxidación de  $S_{SB}$ , la respuesta respirométrica a  $X_{CB}$  es menor y normalmente se puede identificar fácilmente como una cola en la parte final del respirograma.

En un ensayo en batch se puede observar frecuentemente en los respirogramas una "cola" que disminuye exponencialmente después del pico inicial del  $S_B$  (Figura 3.39). En la figura 3.42, esta cola comienza después de aproximadamente 0.75 h. La concentración de  $X_{CB}$  en el agua residual se puede evaluar de una manera similar a la anterior, utilizando el apropiado valor de  $r_{O_2, \text{exo}}^{X_{CB}}$  (Kappeler y Gujer, 1992). Procesos de oxidación que ocurren simultáneamente, tales como nitrificación, podrían interferir y complicar la identificación de la velocidad de respiración gobernada por la hidrólisis. En este caso se puede usar un inhibidor de nitrificación para facilitar la evaluación de  $X_{CB}$  (Spanjers y Vanrolleghem, 1995). Alternativamente, si se evalúan los datos de tales ensayos batch respirométricos utilizando el método de optimización para que la respuesta del modelo coincida con los datos, la parte de nitrificación puede extraerse fácilmente del respirograma (Spanjers y Vanrolleghem, 1995).



**Figura 3.42** Velocidad de respiración ( $r_{O_2}$ ) obtenida de acuerdo a Kappeler y Gujer (1992) para la estimación de  $X_{CB}$ .

El ejemplo de la Figura 3.43 se presenta para insistir en el hecho de que todos los métodos mencionados que utilizan respiración de oxígeno, también son aplicables para los ensayos de respiración anóxica usando mediciones de nitrato (vía análisis químicas o sondas). En esta figura no se muestra un respirograma de nitrato, sino su integral, que es de hecho el cambio en la concentración de nitrato. Se observan diferentes periodos que tienen diferentes niveles de tasas de utilización de nitrato (el periodo inicial corresponde a la biodegradación de  $S_B$  y  $X_{CB}$ , y el segundo a la biodegradación de  $X_{CB}$  solamente, seguido de la respiración endógena de nitrato en la parte final). En una mirada retrospectiva, extrapolando las líneas de pendientes hacia su cruce con el eje Y, se puede identificar la cantidad de nitrato (el  $\Delta NO_x$ ) utilizada en cada proceso, y por tanto calcular las concomitantes concentraciones de sustratos en el agua residual.

El cálculo puede hacerse de una manera similar a la de la velocidad de respiración de oxígeno, con algunas modificaciones (el  $\Delta NO_x$  de la Figura 3.43 sustituye en este caso a las integrales):

$$S_B(0) = \frac{2.86}{1 - Y_{OHO,ax}} \left( \int_0^{t_{fin}} r_{NO_x,exo}^{S_B}(t) dt \right) \quad \text{Ec. 3.28}$$

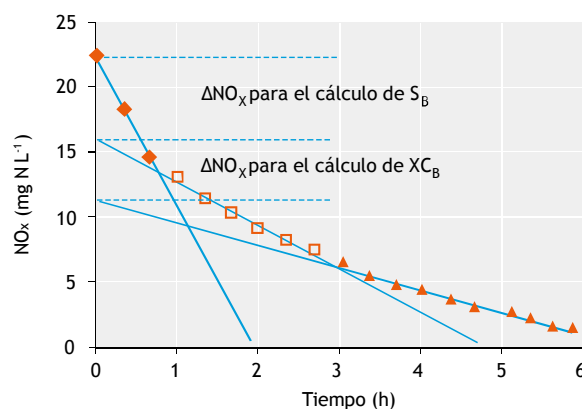
$$X_{CB}(0) = \frac{2.86}{1 - Y_{OHO,ax}} \left( \int_0^{t_{fin}} r_{NO_x,exo}^{X_{CB}}(t) dt \right) \quad \text{Ec. 3.29}$$

Donde se utiliza el término equivalente de oxígeno de 2.86 g DQO g N- $NO_3^{-1}$ . Debe tenerse en cuenta que el rendimiento anóxico es algo menor que el aerobio; mientras para  $Y_{OHO}$  se utiliza el valor de 0.66 g DQO<sub>biomasa</sub> g DQO<sub>sustrato</sub><sup>-1</sup>, para el rendimiento anóxico se sugiere tomar el de 0.54 g DQO<sub>biomasa</sub> g DQO<sub>sustrato</sub><sup>-1</sup> (Muller *et al.*, 2003).

### 3.4.5.3 Biomasa heterótrofa ( $X_{OHO}$ )

Algunas aguas residuales pueden contener cantidades significativas de biomasa heterótrofa (Henze, 1992), por lo que se hace necesario cuantificarla. Un ensayo en batch descrito por Kappeler y Gujer (1992) y Wentzel *et al.* (1995) permite estimar  $X_{OHO}$  a partir del respirograma del agua residual cruda sin adición de biomasa como inóculo. El procedimiento de cálculo requiere que se conozca el coeficiente de rendimiento  $Y_{OHO}$  y la diferencia entre otros dos parámetros cuya resta ( $\mu_{OHO} - b_{OHO}$ ) puede ser obtenida a partir del

mismo respirograma; estos dos parámetros son la velocidad específica máxima de crecimiento  $\mu_{OHO}$  y el coeficiente de muerte  $b_{OHO}$ . El respirograma que se obtiene en este tipo de prueba es parecido al presentado en la Figura 3.40. Básicamente, el procedimiento retroestima la cantidad de biomasa heterótrofa originalmente presente en el agua residual comparando la velocidad de respiración original con la respiración después de un crecimiento significativo (por lo tanto, bien cuantificable) de  $X_{OHO}$ .



**Figura 3.43** Perfil típico de concentración de nitrato para la determinación de  $S_B$  y  $X_{CB}$  a partir de un experimento de respiración (anóxica) de nitrato (Urbain *et al.*, 1998).

### 3.4.5.4 Biomasa autótrofa (nitrificante) ( $X_{ANO}$ )

Hasta el momento, no se conoce algún procedimiento definido y bien aceptado para determinar la concentración de biomasa autótrofa en aguas residuales. Esto posiblemente se debe al hecho de que es muy poco probable encontrar cantidades significativas de organismos nitrificantes en las aguas residuales. Sin embargo, se puede asumir que se puede aplicar un procedimiento similar al desarrollado para  $X_{OHO}$ , es decir, evaluar la velocidad de respiración de nitrificación  $r_{O_2,exo}^{Nit}$  de los autótrofos presentes en el agua residual y compararla con la velocidad de respiración de un cultivo con concentración de biomasa autótrofa conocida  $X_{ANO}$ , por ejemplo, tras un crecimiento significativo. No obstante, la sensibilidad y precisión de tal método.

### 3.4.5.5 Amonio ( $S_{NH_x}$ )

La concentración de amonio en las aguas residuales puede calcularse a través de las técnicas analíticas

convencionales. Sin embargo, la respirometría también ofrece la posibilidad de deducir el valor de  $S_{NHx}$  a partir de mediciones en batch, de forma similar al cálculo de  $S_B$  y  $XC_B$  (en este caso el ensayo se realiza con un lodo activado nitrificante). Como se establece en la Tabla 3.3, se necesita el coeficiente de rendimiento de nitrificantes  $Y_{ANO}$  para convertir el oxígeno consumido en la nitrificación, en concentración de nitrógeno, dividiendo por  $(4.57 - Y_{ANO})$ . Sin embargo, el valor de  $S_{NHx}$  no es muy sensible a  $Y_{ANO}$  en la medida que  $Y_{ANO}$  es pequeño comparado con 4.57. Debe tenerse en cuenta que el amonio también es utilizado para la formación de biomasa (alrededor del 12% del peso de la biomasa como SSV consiste en nitrógeno), que puede requerir una considerable cantidad de nitrógeno si una gran cantidad de DQO es biodegradada ( $DQO^{Degradada}$ ). El nitrógeno que puede ser nitrificado se calcula aproximadamente por:

$$N_{Nit} = S_{NHx} - i_{N,Bio} \cdot Y_{OHO} \cdot DQO^{Degradada}$$

Ec. 3.30

Donde  $i_{N,Bio}$  es el contenido de nitrógeno de la nueva biomasa formada. De esta ecuación puede deducirse fácilmente la concentración original de nitrógeno cuando se conoce el valor de  $DQO^{Degradada}$ , y de los parámetros estequiométricos  $i_{N,Bio}$  y  $Y_{OHO}$ . Ajustando un modelo de tasa de respiración en el que se incluyan los  $r_{O_2}$  para la oxidación del carbono y para el nitrógeno (esto es, el método de optimización), esta corrección se tendrá en cuenta automáticamente (Spanjers y Vanrolleghem, 1995).

### 3.4.5.6 Fracciones de nitrógeno orgánico ( $XC_{B,N}$ y $S_{B,N}$ )

Es probable que debido a que los procesos de hidrólisis y de amonificación del nitrógeno de los compuestos orgánicos son relativamente rápidos, se le haya prestado hasta ahora poca atención a las técnicas respirométricas para la cuantificación de  $XC_{B,N}$  y  $S_{B,N}$  (estos componentes incluso han sido eliminados en los subsiguientes Modelos de Lodos Activados N° 2 y 3). En los ensayos batch, estos compuestos se convierten típicamente en  $S_{NHx}$  antes de que el  $S_{NHx}$  que estaba originalmente presente en el agua residual se haya eliminado por nitrificación. Estas fracciones están así “encapsuladas” en la concentración de nitrógeno total Kjeldahl (NTK) ( $N_{org} + NH_x$ ). Por lo tanto,  $XC_{B,N}$  y  $S_{B,N}$  no se pueden observar directamente en estos ensayos.

Aun así, para algunas aguas residuales, las etapas de hidrólisis y amonificación pueden ser considerablemente más lentas y puede ser necesario cuantificar las concentraciones de estos componentes. En tales casos, se puede imaginar un procedimiento en el que la velocidad de respiración de nitrificación sea medida e interpretada en términos de hidrólisis y amonificación, similar a la forma en que la respiración resultante de la degradación de la DQO se interpreta en términos del proceso de hidrólisis. Posteriormente, las cantidades de los diferentes tipos de sustratos de nitrógeno podrían evaluarse tomando la integral de las correspondientes fracciones y dividiéndolas por  $(4.57 - Y_{ANO})$ , el coeficiente estequiométrico correspondiente a la nitrificación. En caso de que se produzca la eliminación simultánea de DQO, se debe corregir de nuevo el cálculo, tomando en cuenta el nitrógeno asimilado en la biomasa heterótrofa formada (Sección 3.4.5.5).

## 3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

### 3.5.1 Sólidos suspendidos volátiles

En los ensayos de caracterización de la biomasa, la actividad usualmente se normaliza, expresando la velocidad de conversión por unidad de masa de sólidos suspendidos volátiles (SSV) con el fin de tener en cuenta las variaciones en las concentraciones de biomasa. Sin embargo, los SSV no son biomasa en su totalidad, sino que la biomasa activa es solamente una fracción (generalmente desconocida) de los SSV. Por tanto, los SSV son únicamente una aproximación a la concentración de biomasa. De hecho, el reto de los métodos descritos en esta sección es determinar qué parte de los SSV realmente representa la concentración de biomasa. Para mayor información de cómo evaluar la fracción de biomasa activa de los SSV, puede referirse a Ekama *et al.* (1996), Still *et al.* (1996) y Lee *et al.* (2006).

### 3.5.2 Actividad metanogénica específica (AME)

#### 3.5.2.1 Propósito

El ensayo de actividad metanogénica específica (AME) implica la evaluación de la actividad metanogénica acetoclástica de una biomasa. Esto contrasta con las pruebas de actividad de biomasa anaeróbica en las que

se mide la actividad global de la biomasa, durante la biodegradación de un sustrato generalmente complejo. En estos ensayos la actividad está limitada por la velocidad de la etapa más lenta de la biodegradación, que normalmente es la hidrólisis, de manera que se evalúa la actividad hidrolítica de la biomasa para ese sustrato. El ensayo de AME puede utilizarse para dar seguimiento al desempeño del reactor o para caracterizar la biomasa antes de su uso como inóculo para la puesta en operación de un nuevo reactor y por lo tanto, identificar su potencial como inóculo para ese proceso específico (Sorensen y Ahring, 1993).

### 3.5.2.2 General

En las pruebas de AME se cuantifica la actividad de los metanógenos. Esto se hace mediante el suministro de un sustrato que se puede convertir directamente en metano. Este puede ser  $\text{CO}_2$  o gas  $\text{H}_2$ , pero el sustrato más común y práctico es el acetato. En la literatura, en la medida que más y más investigadores la utilizan, la AME se ha convertido en una prueba estándar (Ersahin *et al.*, 2014, Jeison y van Lier, 2007). La velocidad de conversión de acetato a metano, normalizada con respecto a la cantidad de biomasa, brinda información sobre la actividad específica de los metanógenos presentes en la biomasa. La AME se expresa generalmente en  $\text{g DQO g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

Para evitar la acidificación en un digestor anaerobio, es necesario que la producción de AGV y el consumo de AGV estén en equilibrio (Sección 3.4.1). Por lo tanto, la AME indica la máxima producción de acetato, durante la digestión anaerobia, que puede ser manejada por los metanógenos acetoclásticos sin que el pH decaiga a valores que inhiban la metanogénesis.

### 3.5.2.3 Ejecución del ensayo

En ensayos de AME, al igual que en los de PBM, la cantidad de inóculo requerido para la digestión es medida usualmente como sólidos suspendidos volátiles (SSV), aunque también es posible medirla como sólidos totales volátiles (STV) (Sección 3.4.1).

En los ensayos AME la relación entre el inóculo y el sustrato es balanceada de tal manera que la cantidad de metano sea la suficiente para que pueda ser medido con precisión. El flujo debe estar dentro del intervalo de medición del medidor de flujo, y la concentración de acetato deberá permanecer por debajo de los niveles de

inhibición. La concentración de acetato que se suele emplear para la AME es de  $2 \text{ g DQO L}^{-1}$ . Para ello puede usarse la siguiente relación inóculo-sustrato:

$$\lambda = \frac{\text{SSV}_{\text{inóculo}}}{\text{DQO}_{\text{sustrato}}} \quad \text{Ec. 3.31}$$

Tanto la DQO como los SSV están dados en masa suministrada al ensayo, expresada en gramos, no en concentración.

#### • Soluciones estándar

- La solución estándar amortiguadora que se necesita es una elaborada con la mezcla de dos soluciones tampones de fosfato: una solución estándar A (que contiene  $0.2 \text{ M K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ :  $45.65 \text{ g L}^{-1}$ ) y una solución estándar B (compuesta por  $0.2 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :  $31.20 \text{ g L}^{-1}$ ).
- La solución de macro-nutrientes debe contener por litro:  $170 \text{ g NH}_4\text{Cl}$ ;  $8 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $9 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- La solución de micro-nutrientes contiene por litro:  $2 \text{ g FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $2 \text{ g CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $0.5 \text{ g MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $30 \text{ mg CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $50 \text{ mg ZnCl}_2$ ;  $50 \text{ mg HBO}_3$ ;  $90 \text{ mg (NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $100 \text{ mg Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $50 \text{ mg NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $1 \text{ g EDTA}$ ;  $1 \text{ mL HCl } 36\%$ ;  $0.5 \text{ g resazurina}$ , y  $2 \text{ g}$  de extracto de levadura.

#### • Inóculo

El inóculo debe ser lodo anaerobio típico procedente de una planta de biogás a escala real. Se deben medir la concentración de sólidos suspendidos totales (SST) y de sólidos suspendidos volátiles (SSV) del lodo.

#### • Sustrato

Para la actividad metanogénica acetoclástica, el sustrato que se utiliza es la sal de acetato de sodio tri-hidratado ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) ( $\text{MM} = 136.02 \text{ g mol}^{-1}$ ). El valor de la DQO es  $0.4706 \text{ g DQO por g NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . La solución de acetato de sodio con una concentración típica de  $2.0 \text{ g DQO L}^{-1}$  se prepara incluyendo las siguientes soluciones:

- Tampón de fosfato: mezclar  $30.5 \text{ mL}$  de solución estándar A y  $19.5 \text{ mL}$  de solución estándar B (en total  $50 \text{ mL}$ ), por litro de solución del sustrato, para obtener un tampón de fosfato de  $10 \text{ mM}$  a  $\text{pH } 7$ .
- Macro-nutrientes: dosificar  $6 \text{ mL}$  por  $\text{L}$  de sustrato.
- Micro-nutrientes: dosificar  $6 \text{ mL}$  por  $\text{L}$  de sustrato.



Verifique el pH y mida la concentración de DQO de la solución de sustrato. Para los blancos, prepare la misma solución, pero sin sustrato.

- **Preparación de los recipientes de reacción y ejecución del ensayo**

Utilice triplicados tanto para el blanco como para la muestra, es decir, tres frascos para el blanco (solo inóculo + medios inorgánicos) y tres frascos para la muestra (inóculo + medios con sustrato). Como se ha indicado con anterioridad, en el ensayo de AME normalmente se usa una relación de inóculo a sustrato de 2:1 (basada en SSV). Debe elegirse un volumen adecuado para los recipientes de la reacción. Para realizar el ensayo de AME, así como para el de PBM, los frascos necesitan ser incubados a la temperatura deseada. La temperatura mesófila estándar es 35 °C. El ensayo de AME se continúa hasta que cesa totalmente la producción de biogás.

### 3.5.2.4 Procesamiento de los datos

Durante el ensayo de AME se mide la producción de metano en el tiempo. En la Figura 3.44, se muestra en ejemplo los datos de un ensayo de AME. Observe que el ensayo no comenzó a 0 N-mL. Esto se debió a que el gas inicialmente presente en el espacio libre superior del recipiente de reacción (reactor) se expandió durante el calentamiento hasta 35°C, creando un pequeño flujo de gas. Este flujo de gas en los primeros 10 minutos no representa, por lo tanto, el flujo real de metano. Durante los dos primeros días se observó una fase de baja actividad: la fase de retardo o latencia. Esto se explica por el hecho de que los metanógenos en el tiempo  $t = 0$  fueron introducidos en una nueva matriz donde la presión osmótica, la conductividad, la composición de nutrientes o las concentraciones de sustrato eran diferentes en comparación con la matriz de la que se extrajeron los metanógenos (lodo digerido). Esta fase de retardo es normal para ensayos AME. Después de  $t = 4$  días, la producción de metano casi se ha detenido. Esto se debe probablemente al agotamiento del sustrato. Antes del inicio de un ensayo de AME, se puede calcular la producción de metano esperada, basada en la DQO del acetato. Para 1 g de DQO de acetato, teóricamente se pueden producir 350 N-mL de metano. Esto se puede calcular como se describe a continuación: 1 mol de acetato (Ac) produce 1 mol de  $\text{CH}_4$ , por lo que 1 g de Ac produce  $1/59$  mol de  $\text{CH}_4$ . A temperatura y presión estándar (TPN)(que corresponden a 273.15 K y

1013.25 mbar), 1 mol de gas es equivalente a 22.4 L, por lo que 1 g Ac produce  $22.4/59 = 0.380$  L  $\text{CH}_4$ . Dado que 1 g de Ac representa una DQO de 1.085 se obtiene entonces una relación  $0.380/1.085 = 0.350$  L  $\text{CH}_4$  g  $\text{DQO}^{-1}$ .

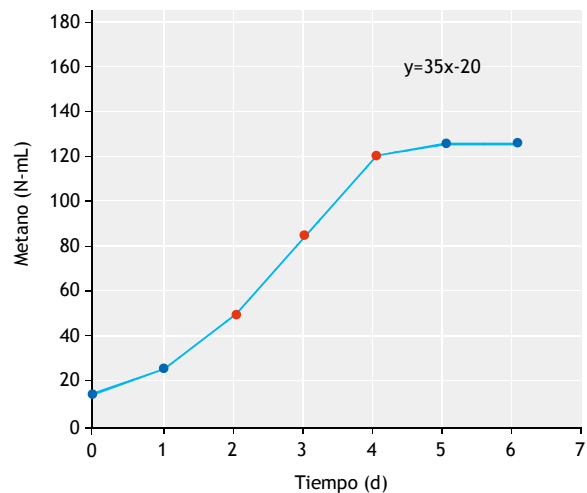


Figura 3.44 Ejemplo de un ensayo de AME.

La información que puede obtenerse de este gráfico es la velocidad máxima de producción de biogás. Esta velocidad máxima de producción puede calcularse a partir de la pendiente del respirograma de la Figura 3.44. La pendiente se puede calcular en cualquier punto, pero debe elegirse el intervalo apropiado. En este caso, el intervalo entre  $t = 2$  y  $t = 4$  (en rojo en la Figura 3.44) se elige porque la velocidad de producción es más alta en ese periodo. La velocidad máxima de producción de metano del lodo es de  $35 \text{ N-mLd}^{-1}$ . En este ejemplo se introdujeron 800 mg de SSV de inóculo y, por lo tanto, la AME es de  $43 \text{ N-mL g SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Es necesario tomar en cuenta que la forma más común de expresar la cantidad de metano es en términos de DQO. Un g de DQO de metano ocupa 350 N-mL de gas (a TPN). Por lo tanto, la AME de este experimento es  $43/350 = 0.123$  g DQO g  $\text{SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Este valor está dentro del intervalo típico de 0.1 y 0.2 g DQO g  $\text{SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$  comúnmente encontrado en digestores convencionales de lodos de PTARs municipales. El lodo granular en reactores de tipo UASB suele tener una AME más alta, entre 0.2 y 0.4 g DQO g  $\text{SSV}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

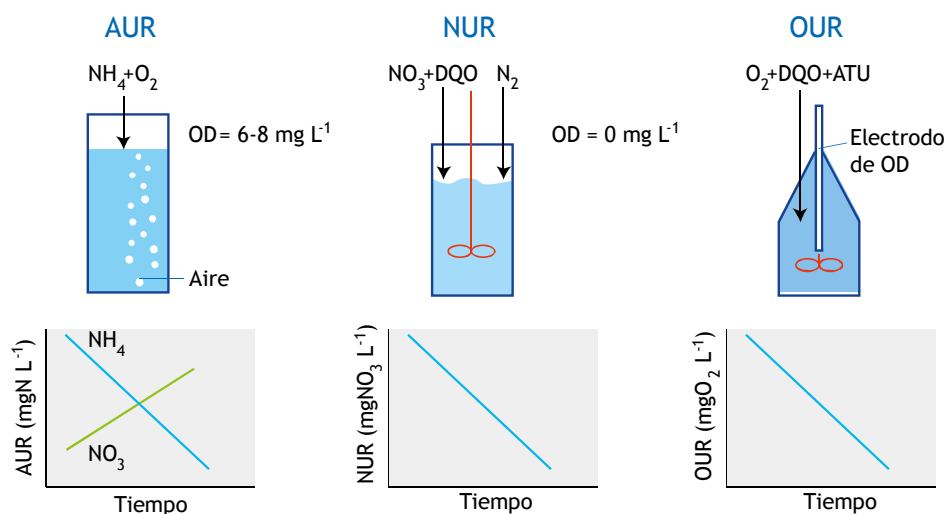
- **Recomendaciones**

En los ensayos de AME es especialmente importante prestar atención a la sensibilidad de los metanógenos a la temperatura y a la inhibición por el oxígeno. Para más

información sobre ésta y otras recomendaciones, el lector puede consultar la sección sobre los ensayos de PBM. La forma de procesar los datos de un blanco del ensayo AME es diferente al del ensayo PBM, es decir: en el ensayo de AME los datos del blanco no se restan de los datos de la muestra.

### 3.5.3 Actividad específica aerobia y anóxica de la biomasa

Kristensen *et al.* (1992) han resumido un conjunto de procedimientos de laboratorio para evaluar la actividad de nitrificantes (velocidad de utilización de amonio, AUR; del inglés *ammonium uptake rate*), la actividad de biomasa desnitrificante (velocidad de utilización de nitrato, NUR; del inglés *nitrate uptake rate*) y la actividad de biomasa heterótrofa (velocidad de utilización de oxígeno, OUR; del inglés *oxygen uptake rate*). Estas abreviaturas son precedidas de la letra S (del inglés *specific*) cuando se trata de velocidades específicas. Los tres procedimientos y ejemplos esquemáticos son presentados en la Figura 3.45 y son discutidos a continuación.



**Figura 3.45** Procedimientos respirométricos de laboratorio y ejemplos de datos para la caracterización de biomasa nitrificante (AUR: velocidad de utilización de amonio), biomasa des-nitrificante (NUR: velocidad de utilización de nitrato) y biomasa heterótrofa (OUR: velocidad de utilización de oxígeno) (Kristensen *et al.*, 1992).

Entonces se extraen muestras de 10 mL de lodo activado a intervalos de 15-30 min durante 3-4 h. Las muestras son filtradas inmediatamente para detener las bio-reacciones. El filtrado puede ser preservado, hasta el momento de ser analizada, adicionando 0.1 mL de solución 4M de  $H_2SO_4$ . Las muestras son

#### 3.5.3.1 Velocidad específica máxima de nitrificación (SAUR)

Para evaluar la velocidad de utilización de amonio (AUR) se mezcla agua del grifo con biomasa concentrada (procedente de la recirculación o de la purga del exceso de lodo) en una probeta de 1 L, para obtener una concentración de sólidos suspendidos entre 3-4 g SSV  $L^{-1}$ . El lodo activado se mantiene en suspensión, mediante aireación a través de difusores, que al mismo tiempo mantiene una concentración de OD en el intervalo entre 6-8  $mg O_2 L^{-1}$ . Una vez que se alcanzan condiciones estables (respiración endógena) se adiciona amonio hasta alcanzar una concentración inicial de  $N-NH_4$  de 20  $mg N L^{-1}$ . Tenga en cuenta que la nitrificación es una reacción acidificante, por lo que el pH debe ser vigilado durante el ensayo para asegurar que el pH no afecte el proceso. La calidad de la determinación de la AUR puede mejorarse adicionando manualmente alcalinidad o instalando un sistema de control de pH que posibilite la adición de una solución básica.

subsecuentemente analizadas para nitrógeno amoniacal, y para nitrato y nitrito. Alternativamente, puede utilizarse, directamente en la suspensión aireada, un electrodo ion-selectivo para amonio, asimismo una sonda selectiva de iones o un sensor UV para nitrato y para nitrito, lo anterior para obtener un mayor nivel de

detalle en las series de datos temporales y potencialmente poder realizar estudios de modelación bio-cinética de los nitrificantes.

La velocidad de utilización de amonio (AUR,  $\text{mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) se calcula de la pendiente de la curva de producción de nitrito más nitrato, y a modo de control, también de la curva de utilización de amonio. En realidad el balance de amonio también puede afectarse por la actividad heterótrofa endógena debido a la muerte y liberación de amonio, y por el consumo de amonio en el crecimiento heterotrófico concomitante. Las formas oxidadas de nitrógeno que se producen se deben directamente a la nitrificación, por supuesto con la condición de que el oxígeno fue suficientemente alto en todo momento para que no ocurra desnitrificación. Para que se pudiera comparar la capacidad de nitrificación en diversas condiciones con valores típicos reportados, la velocidad específica de utilización de amonio (SAUR,  $\text{mg N-NH}_4 \text{ g SSV}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) se obtiene dividiendo la velocidad volumétrica (AUR,  $\text{mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) por la concentración de biomasa ( $\text{g SSV L}^{-1}$ ) tomada al inicio del ensayo.

La capacidad de nitrificación puede calcularse también a partir de un ensayo respirométrico con adición de amonio (Sección 3.4.5.5). La velocidad máxima de respiración que puede ser atribuida a la nitrificación ( $r_{\text{ANO},\text{O}_2}$ ) en  $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , esto es, después de restar la respiración endógena, puede traducirse en términos de velocidad de conversión de amonio ( $\text{mg N-NH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) mediante una ecuación similar a la utilizada para obtener el nitrógeno nitrificable ( Sección 3.4.5.5):

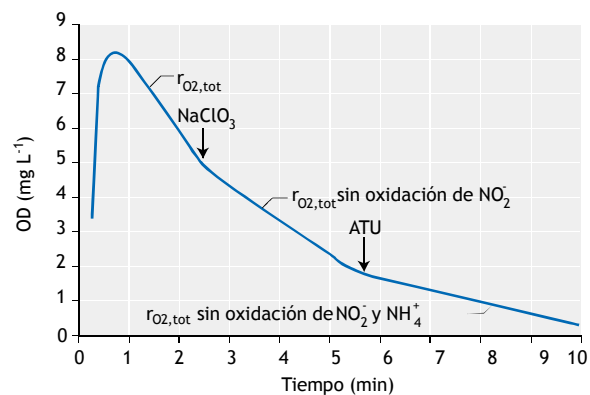
$$\text{AUR} = \frac{r_{\text{ANO},\text{O}_2}}{4,57 - Y_{\text{ANO}}} \quad \text{Ec. 3.32}$$

Donde  $Y_{\text{ANO}}$  es el coeficiente de rendimiento de nitrificantes, típicamente  $0.24 \text{ mg DQO mg N}^{-1}$ .

Para separar las actividades de la biomasa amonio-oxidante y nitrito-oxidante, es posible realizar dos ensayos, uno con adición de amonio, y otro con adición de nitrito. En estos ensayos separados, se puede seguir el consumo de amonio y de nitrito y traducirse separadamente en sus respectivas actividades. Alternativamente, en experimentos en los que llega a ocurrir una acumulación de nitrito en el ensayo, también los datos pueden usarse para obtener ambas actividades por separado. Lo anterior puede llevarse a cabo determinando la velocidad de utilización de nitrito

después de que todo el amonio haya sido oxidado, puede calcularse la actividad de la biomasa nitrito-oxidante. En este caso, el AUR debe obtenerse a partir del perfil de amonio y no del perfil de nitrato, ya que la producción de nitrato es retardada y mucho más lenta que la velocidad de consumo del amonio, debido a la acumulación de nitrito. Para que este tipo de análisis funcione, es importante que la capacidad de oxidación del amonio sea significativamente más rápida que la de oxidación de nitrito, porque se debe acumular suficiente nitrito (se recomienda tener más de  $2 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$  en el momento en el que se agota el amoníaco).

Un método alternativo para la determinación de las actividades de los dos grupos de biomasa involucrados en la nitrificación fue desarrollado por Surmacz-Gorska *et al.* (1996). Está basado en un ensayo respirométrico en el que se añade clorato de sodio ( $\text{NaClO}_3$ ,  $20 \text{ mM}$ , es decir  $2.13 \text{ g L}^{-1}$ ), un inhibidor de la segunda etapa de la nitrificación, después de que el OD ha decrecido aproximadamente  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , seguido de la adición de ATU después de que el OD baja otros  $2$  a  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , para inhibir la primera etapa de la nitrificación. Un perfil típico de concentración de OD obtenido en un frasco cerrado para este tipo de procedimiento, se muestra en la Figura 3.46.



**Figura 3.46** Perfil típico de concentración de OD registrado con el procedimiento de caracterización de nitrificación en dos etapas basado en la inhibición de la oxidación del nitrito con clorato (Surmacz-Gorska *et al.*, 1996). Las pendientes del perfil de OD son usadas para evaluar los respectivos  $r_{\text{O}_2}$  (OURs).

Las velocidades de respiración respectivas, expresadas en  $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , son obtenidas directamente de tres pendientes de disminución del OD, y permiten calcular las tasas de consumo de oxígeno debido a cada una de las dos etapas de la nitrificación:  $r_{\text{O}_2,\text{NO}_2,\text{exo}}$

(asociada a  $r_{\text{NO}_2, \text{O}_2}$ ) se calcula por la diferencia de pendientes de OD antes y después de la adición de clorato, mientras que  $r_{\text{O}_2, \text{NH}_4, \text{exo}}$  (asociada a  $r_{\text{AOO}, \text{O}_2}$ ) se obtiene de la diferencia de pendientes de OD antes y después de la adición de ATU. Con estas velocidades de respiración, pueden calcularse las actividades (en mg N-NH<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y mg N-NO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente) de ambas biomasas nitrificantes:

$$r_{\text{NH}_4, \text{NO}_2} = \frac{r_{\text{AOO}, \text{O}_2}}{3.43 - Y_{\text{AOO}}} \quad \text{Ec. 3.33}$$

$$r_{\text{NO}_2, \text{NO}_3} = \frac{r_{\text{NOO}, \text{O}_2}}{1.14 - Y_{\text{NOO}}} \quad \text{Ec. 3.34}$$

Donde,  $Y_{\text{AOO}}$  y  $Y_{\text{NOO}}$  son los coeficientes de rendimiento de las dos etapas de nitrificación, típicamente, 0.18 mg DQO mg N-NH<sub>4</sub><sup>-1</sup> y 0.06 mg DQO mg N-NO<sub>2</sub><sup>-1</sup> respectivamente. Una vez más, las actividades específicas se obtienen dividiendo las velocidades volumétricas por la concentración de SSV.

### 3.5.3.2 Velocidad específica máxima de respiración aerobia heterótrofa (SOUR)

Para determinar la velocidad de utilización de oxígeno (OUR) relacionada con la actividad heterótrofa aerobia, se mezcla agua del grifo y la biomasa hasta obtener una concentración de sólidos suspendidos cercana a 2-3 g SSV L<sup>-1</sup> en un recipiente de un litro. Luego, se realiza un ensayo con exceso de DQO. Típicamente se adiciona acetato, para una concentración de 200 mg DQO L<sup>-1</sup> (para tener una relación  $S_0/X_0$  entre 1/10 y 1/20). Cuando se trata de hallar la actividad aerobia endógena, que es otro indicador alternativo de la actividad heterótrofa aerobia, entonces no se debe de adicionar la fuente de DQO. La nitrificación se inhibe mediante la adición de alitiourea (típicamente 5-10 mg L<sup>-1</sup> ATU). La biomasa se airea continuamente para mantener una concentración de OD de 6-8 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. En el procedimiento propuesto por Kristensen *et al.* (1992), la velocidad de respiración se mide periódicamente tomando parte del cultivo en batch (biomasa y agua de grifo aireada, con sustrato) e introduciéndolo en un frasco de DBO de 300 mL para medir la velocidad de utilización de oxígeno, utilizando un electrodo insertado en el frasco (principio LEE de respirometría). EL OUR puede entonces ser calculado de la pendiente del perfil de OD resultante. Observe que aquí se utiliza como indicador de la actividad aerobia heterótrofa la velocidad total de respiración ( $r_{\text{O}_2, \text{endo}} + r_{\text{O}_2, \text{exo}}$ ) en presencia de un inhibidor de la nitrificación. También puede emplearse la forma alternativa de obtener

velocidades de respiración discutida en las Secciones 3.2 y 3.3 para obtener el OUR.

La velocidad específica de consumo de oxígeno (SOUR), un indicador muy utilizado de la actividad de biomasas, se calcula dividiendo el OUR por la concentración de SSV del ensayo en batch.

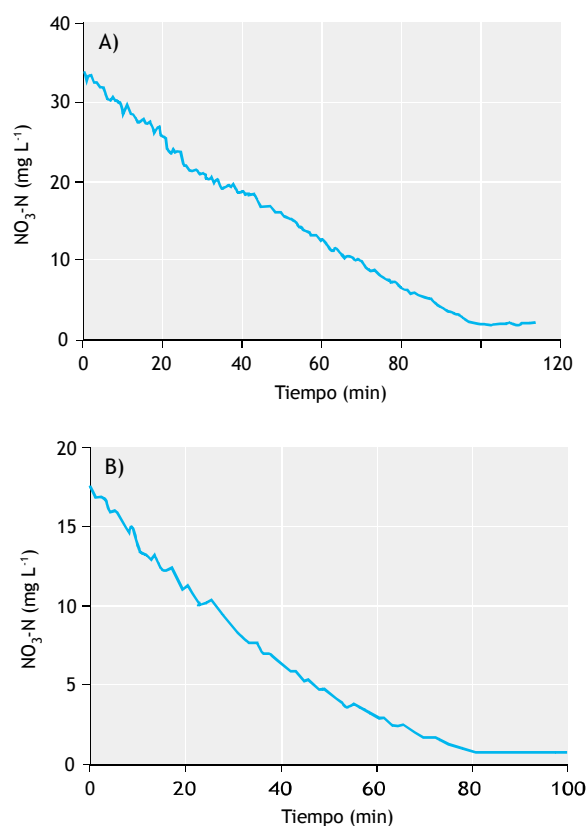
Un elemento importante a destacar es que el uso del acetato puede no ser ideal en todos los casos debido a que algunas biomasas pueden adaptarse al régimen de abundancia-escasez de comida y almacenar la DQO en lugar de utilizarla directamente para su crecimiento. La velocidad de respiración correspondiente al almacenaje puede ser muy diferente a la que se busca para la evaluación de la actividad de los heterótrofos. Si se detecta tendencia al almacenaje, entonces deberá utilizarse una fuente diferente de DQO (como el ácido glutámico ya mencionado anteriormente).

### 3.5.3.3 Velocidad específica máxima de desnitrificación (SNUR)

La velocidad específica de utilización de nitrato (SNUR) para la desnitrificación, puede evaluarse utilizando un reactor batch de 2 L, completamente mezclado y aislado de la atmósfera. La biomasa concentrada se mezcla con agua del grifo para obtener una concentración de sólidos suspendidos de 3-4 g SSV L<sup>-1</sup>. Después de alcanzar condiciones estables (respiración endógena), se añade nitrato para obtener una concentración inicial entre 20-30 mg N L<sup>-1</sup>. Se adiciona DQO en exceso (más frecuentemente como acetato), para obtener una concentración inicial de 100-150 mg DQO L<sup>-1</sup>. Para determinar la velocidad máxima de desnitrificación (NUR) endógena, se utilizan mayores concentraciones de biomasa (para reducir el tiempo del ensayo), y no se adiciona DQO. Como la desnitrificación es un proceso que incrementa el pH, que se magnifica cuando la fuente de DQO es el acetato, (ver los resultados del control del pH para ensayos NUR con acetato y glucosa en la Figura 3.47; Petersen *et al.*, 2002b), debe vigilarse y rectificar el pH en caso necesario. A pesar de lo anterior, la probabilidad de que ocurra un impacto negativo en este caso es mucho menor que en los ensayos AUR dado que la biomasa heterótrofa es menos sensible a la variación del pH, y debido al bajo impacto que el pH tiene sobre la desnitrificación.

Para llevar a cabo este ensayo, se extraen muestras de 10 mL de lodo activado a intervalos de 15-30

minutos en un período de 3-4 h. La mejor forma de evitar la entrada de aire al reactor durante la toma de muestra es bajo la adición de gas nitrógeno. Las muestras deben ser pre-tratadas, como se mencionó anteriormente en la determinación de AUR, y analizada para conocer su contenido de nitrógeno en forma de nitrato y nitrito. De modo alternativo, en el reactor puede utilizarse un electrodo ion-selectivo o un sensor UV para nitrato y para nitrito, lo cual permite obtener un mayor nivel de detalle en las series de datos temporales, y potencialmente facilitar la realización de estudios de modelación bio-cinética del proceso de desnitrificación. En la Figura 3.47 se muestra un ejemplo de estos tipos de datos.



**Figura 3.47** Ejemplo de ensayo de velocidad de utilización de nitrato con acetato (A) y glucosa (B), bajo control del pH con adición de ácido (A) o base (B) (Petersen *et al.*, 2002b).

La NUR (mg N-NO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) se calcula de la pendiente de la curva resultante de la utilización de nitrato más nitrito. La velocidad específica de desnitrificación (SNUR, mg N-NO<sub>3</sub> g SSV<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) se obtiene dividiendo la velocidad volumétrica obtenida (mg N-NO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) por la concentración de biomasa (g SSV L<sup>-1</sup>) del inicio del ensayo, para poder comparar la

capacidad de desnitrificación calculada con los valores típicos reportados en la literatura.

Las actividades heterótrofas aerobia y anóxica están muy relacionadas, porque ambas reflejan la capacidad de la biomasa heterótrofa de oxidar compuestos orgánicos, usando ya sea oxígeno o nitrato como aceptor final de electrones. La Figura 3.48 muestra una comparación de respirogramas NUR y OUR obtenidos con una misma biomasa y con adición de acetato (Sin y Vanrolleghem, 2004). El elongamiento final que se presenta en los resultados de ambos ensayos después de volver a la respiración endógena (al final de la gráfica), ilustra en ambos casos, para esta muestra de biomasa, la ocurrencia del antes mencionado fenómeno de almacenamiento de DQO, tanto en condiciones aerobias como anóxicas.

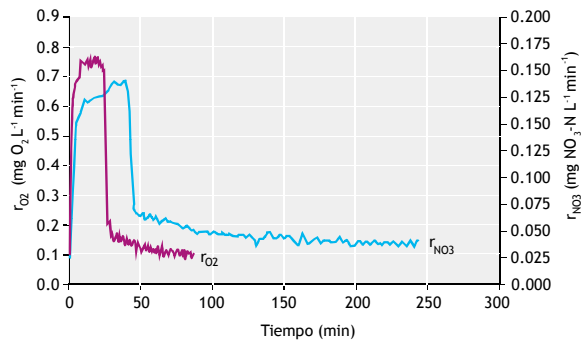
Cuando se comparan las velocidades de respiración bajo condiciones anóxicas y aerobias, uno debe darse cuenta que las velocidades de conversión de DQO son menores en condiciones anóxicas. Esto se explica de dos maneras: o porque la velocidad específica de conversión en condiciones anóxicas es realmente menor, o porque solamente una fracción de la biomasa total es capaz de “respirar” con nitrato. Un parámetro de caracterización de la biomasa muy frecuentemente utilizado para este fenómeno es el llamado factor de reducción anóxico,  $\eta$ , el cual es la relación que existe entre ambas actividades, con base en los equivalentes de electrones (por lo tanto el factor 2.86):

$$\eta = 2.86 \cdot \frac{r_{\text{NO}_3, \text{exo}}}{r_{\text{O}_2, \text{exo}}} \quad \text{Ec. 3.35}$$

Para sustratos fácilmente biodegradables, el factor  $\eta$  es próximo a 1 (~0.85) (Ekama *et al.*, 1996). Para sustratos lentamente biodegradables como en el modelo de lodo activado No. 1 (ASM1),  $\eta$  ~0.33 (van Haandel *et al.*, 1981) y en el ASM2,  $\eta$  es 0.66 (Clayton *et al.*, 1991). La razón de estas diferencias aún es desconocido.

El uso de la relación  $\eta$  asume que el rendimiento del crecimiento es el mismo, independientemente que el último aceptor de electrones sea nitrato u oxígeno. Sin embargo, el rendimiento de crecimiento en condiciones anóxicas es típicamente menor que bajo condiciones aerobias (Muller *et al.*, 2003). Esto significa que para la misma velocidad de conversión de DQO, en condiciones anóxicas se consumen más aceptores de electrones (para obtener la misma cantidad de biomasa debe consumirse más DQO). Por tanto, esto significa que, en teoría, el factor de conversión puede ser mayor de 1, si la velocidad de consumo de DQO es la misma.



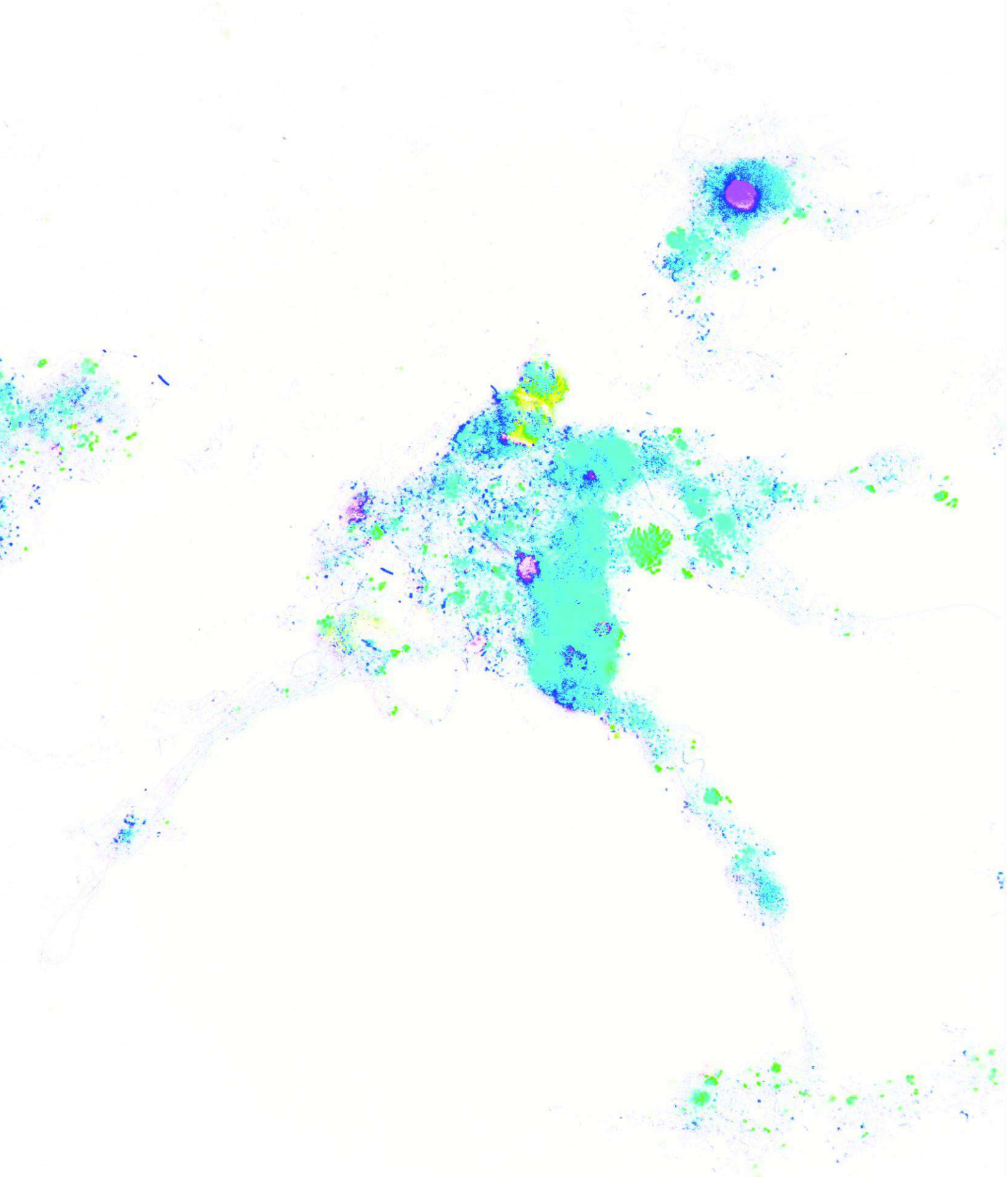


**Figura 3.48** Comparación de respirogramas aerobio (rojo) y anóxico (azul) con adición de acetato a un lodo de la PTAR de Ossemeersen: después de la adición de 46.9 mg DQO<sub>Ac</sub> L<sup>-1</sup> (para  $r_{O_2}$ ) y 38.9 mg DQO<sub>Ac</sub> L<sup>-1</sup> (para  $r_{NO_3}$ ) (Sin y Vanrolleghem, 2004).

## Referencias

- Alberts, B., Johnson A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K. and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>th</sup> edition, Garland Science, 1616 pp.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Sci Tech*. 59(5): 927-34.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF) (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd Edition. New York. ISBN 9780875530130.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W., Siegrist, H. and Vavilin, V. (2002) *Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)*. IWA Publishing, London.
- Clayton, J.A., Ekama, G.A., Wentzel M.C. and Marais G.v.R (1991) Denitrification kinetics in biological nitrogen and phosphorus removal systems treating municipal wastewaters. *Water Sci Tech*. 23(4/6-2): 1025-1035.
- Coen, F., Petersen, B., Vanrolleghem, P.A., Vanderhaegen, B. and Henze, M. (1998) Model-based characterization of hydraulic, kinetic and influent properties of an industrial WWTP. *Water Sci Tech*. 37(12): 317-326.
- Copp, J.B., Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A. (Eds.), 2002. *Respirometry in control of the activated sludge process: Benchmarking control strategies*. Scientific and Technical Report No. 11, IWA Publishing, London, UK.
- Eastman, J.A. and Ferguson, J.F., 1981. Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *Water Poll. Control Fed*. 53: 352-366.
- Ekama, G.A., Dold, P.L. and Marais, G.v.R. (1986) Procedures for determining influent COD fractions and the maximum specific growth rate of heterotrophs in activated sludge systems. *Water Sci Tech*. 18: 91-114.
- Ekama, G.A., Wentzel, M.C., Casey, T.G. and Marais, G.v.R (1996) Filamentous organism bulking in nutrient removal activated sludge systems. Paper 3: Stimulation of the selector effect under anoxic conditions. *Water SA*, 22(2):119-126.
- Ersahin, M.E., Ozgun, H., Tao, Y., van Lier, J.B., 2014. Applicability of dynamic membrane technology in anaerobic membrane bioreactors. *Water Res*. 48: 420-9.
- Gaps, D., Pratt, S., Yuan, Z., and Keller, J. (2003) Online titrimetric and off-gas analysis for examining nitrification processes in wastewater treatment. *Water Res*. 37: 2678-2690.
- Gernaey, K., Petersen, B., Ottoy, J.P. and Vanrolleghem, P.A. (1999) Biosensing activated sludge. *WQI*, May/June 1999, 16-21.
- Henze, M., Grady Jr., C.P.L., Gujer, W., Marais G.v.R. and Matsuo, T. (1987). *Activated sludge model No. 1*. Scientific and Technical Report No. 1, IAWPRC, London.
- Henze, M. (1992) Characterization of wastewater for modelling of activated sludge processes. *Water Sci Tech*. 25 (6): 1-15.
- Henze, M., Harremoes, P., Jansen, J. and Arvin, E. (1995). *Wastewater Treatment Biological and Chemical Processes*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 383.
- Jeison, D. and van Lier, J.B., (2007). Thermophilic treatment of acidified and partially acidified wastewater using an anaerobic submerged MBR: Factors affecting long-term operational flux. *Water Res*. 41: 3868-79.
- Kappeler, J. and Gujer, W. (1992) Estimation of kinetic parameters of heterotrophic biomass under aerobic conditions and characterization of wastewater for activated sludge modelling. *Water Sci Tech*. 25(6): 125-139.
- Kong, Z., Vanrolleghem, P.A. and Verstraete, W. (1994) Automated respiration inhibition kinetics analysis (ARIKA) with a respirographic biosensor. *Water Sci Tech*. 30(4): 275-284.
- Kong, Z., Vanrolleghem, P.A., Willems, P. and Verstraete, W. (1996) Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxidation and nitrification with a respirometer. *Water Res.*, 30: 825-836.
- Kristensen, G.H, Jorgensen, P.E. and Henze, M. (1992) Characterization of functional groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. *Water Sci Tech*. 25(6): 43-57.
- Lasaridi, K.E. and Stentiford, E.I. (1998) A simple respirometric technique for assessing compost stability. *Water Res*. 32(12): 3717-23.
- Lee, B.J., Wentzel, M.C. and Ekama, G.A. (2006) Measurement and modelling of ordinary heterotrophic organism active biomass concentration in anoxic/aerobic activated sludge mixed liquor. *Water Sci Tech*. 54(1):1-10.
- Muller, A., Wentzel, M.C., Ekama, G.A. and Loewenthal, R.E. (2003) Heterotrophic anoxic yield in anoxic aerobic activated

- sludge systems treating municipal wastewater. *Water Res.* 37: 2435-2441.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th Edition, Palgrave Macmillan, ISBN: 978-0-716-77108-1, 1100 pp. McCarthy, E.L. (1934). Mariotte's bottle. *Science*. 80, 100.
- Petersen, B., Gernaey, K., Henze, M. and Vanrolleghem, P.A. (2002a) Evaluation of an ASM1 model calibration procedure on a municipal-industrial wastewater treatment plant. *J. Hydroinformatics*, 4, 15-38.
- Petersen, B., Gernaey, K. and Vanrolleghem, P.A. (2002b) Anoxic activated sludge monitoring with combined nitrate and titrimetric measurements. *Water Sci Tech.* 45(4-5): 181-190.
- Petersen, B., Gernaey, K., Henze, M. and Vanrolleghem, P.A. (2003) Calibration of activated sludge models: A critical review of experimental designs. In: *Biotechnology for the Environment: Wastewater Treatment and Modeling, Waste Gas Handling*. Eds. Agathos S.N. and Reineke W., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 101-186.
- Pratt, S., Yuan, Z., Gapes, D., Dorigo, M., Zeng, R.J. and Keller, J. (2003) Development of a Novel Titration and Off-Gas Analysis (TOGA) Sensor for Study of Biological Processes in Wastewater Treatment Systems. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 482-495.
- Rezouga, F., Hamdi, M. and Sperandio, M. (2009) Variability of kinetic parameters due to biomass acclimation: Case of par-nitrophenol biodegradation. *Bioresource Technology*. 06/2009; 100(21): 5021-9.
- Rieger, L., Langergraber, G., Kaelin, D., Siegrist H. and Vanrolleghem P.A. (2008) Long-term evaluation of a spectral sensor for nitrite and nitrate. *Water Sci Tech.* 57(10): 1563-1569.
- Sin, G. and Vanrolleghem, P.A. (2004) A nitrate biosensor based methodology for monitoring anoxic activated sludge activity. *Water Sci Tech.* 50(11): 125-133.
- Sorensen, A.H. and Ahring, B.K. 1993. Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 427-431.
- Spanjers, H. and Vanrolleghem, P.A. (1995a) Application of a hybrid respirometric technique to the characterization of an industrial wastewater. *Proceedings 50<sup>th</sup> Purdue Industrial Waste Conference*, 611-618.
- Still, D.A., Ekama, G.A., Wentzel, M.C., Casey, T.G. and Marais, G.v.R (1996) Filamentous organism bulking in nutrient removal activated sludge systems. Paper 2: Stimulation of the selector effect under aerobic conditions. *Water SA*, 22(2): 97-118.
- Spanjers, H. and Vanrolleghem, P.A. (1995b) Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Sci Tech.* 31(2): 105-114.
- Spanjers, H., Vanrolleghem, P.A., Olsson, G., Dold, P.L., 1998. Respirometry in control of the activated sludge process: Principles. Scientific and Technical Report No. 7, IAWQ, London, UK.
- Surmacz-Gorska, J., Gernaey, K., Demuyne, C., Vanrolleghem, P.A. and Verstraete, W. (1996) Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Res.*, 30:1228-1236.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mcallan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.
- Urbain, V., Naidoo, V., Ginestet, P. and Buckley, C.A. (1998) Characterization of wastewater biodegradable organic fraction: accuracy of the nitrate utilisation rate test. In *Proceedings of the Water Environmental Federation 71<sup>st</sup> Annual Conference and Exposition*, October 3-7, Orlando, Florida (USA), 247-255.
- van Haandel, A.C., Ekama, G.A. and Marais, G.v.R (1981) The activated sludge process Part 3 - Single sludge denitrification. *Water Res.*, 15: 1135-1152.
- Vanrolleghem, P.A., Kong, Z., Rombouts, G. and Verstraete, W. (1994). An on-line respirographic biosensor for the characterization of load and toxicity of wastewaters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 59: 321-333.
- Vanrolleghem, P.A., Spanjers, H., Petersen, B., Ginestet, P. and Takacs, I. (1999) Estimating (combinations of) Activated Sludge Model No.1 parameters and components by respirometry. *Water Sci Tech.* 39(1): 195-214.
- Volskay, V. and Grady, C. (1990) Respiration inhibition kinetic analysis. *Water Res.*, 24, 863-874.
- Weijers, S.R. (2000) *Modelling, Identification and Control of Activated Sludge Plants for Nitrogen Removal*. PhD thesis. Eindhoven University of Technology.
- Wanner, O., Kappeler, J. and Gujer, W. (1992) Calibration of an activated sludge model based on human expertise and on a mathematical optimization technique - A comparison. *Water Sci Tech.* 25(6): 141-148.
- Wentzel, M.C., Mbewe, A. and Ekama, G.A. (1995) Batch test for measurement of readily biodegradable COD and active organism concentrations in municipal waste waters. *Water SA*, 21, 117-124.
- Zhang, X., Hu, J., Spanjers, H., van Lier, J.B., (2014). Performance of inorganic coagulants in treatment of backwash waters from a brackish aquaculture recirculation system and digestibility of salty sludge. *Aquac. Eng.* 61: 9-16.



# ENSAYOS DE EMISIÓN DE GASES

Autores:

Kartik Chandran

Eveline I.P. Volcke

Mark C.M. van Loosdrecht

Revisores:

Peter A. Vanrolleghem

Sylvie Gillot

## 4.1 INTRODUCCIÓN

Las tecnologías de tratamiento de aguas residuales y los procesos biológicos de remoción de nutrientes (BNR, por sus siglas en inglés, *Biological Nutrient Removal*) son principalmente utilizados para mejorar la calidad del agua. Sin embargo, los procesos BNR son potenciales contribuidores a las emisiones de óxido nitroso ( $N_2O$ ) y metano ( $CH_4$ ), a la atmósfera, dependiendo de la configuración de la planta de tratamiento y de las condiciones de operación (Kampschreur, 2009). Para determinar la huella de carbono correspondiente al tratamiento de aguas residuales y los procesos BNR, debe medirse previamente el flujo de estos gases de efecto invernadero (GEIs) a la atmósfera. La liberación de metano y especialmente de óxidos nitrosos es motivo de preocupación porque el impacto invernadero del  $N_2O$  equivale a aproximadamente 300 veces el de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y es 34 veces mayor que el de  $CH_4$  (IPCC, 2013).

En los últimos decenios se han producido cada vez más intentos por (i) caracterizar las emisiones de gases (de efecto invernadero) emitidas por las plantas de tratamiento de aguas residuales, y (ii) desarrollar una metodología para recopilar datos completos sobre plantas

en muchas partes del mundo. En este capítulo se describen los enfoques aplicados en varios de estos estudios. Uno de los protocolos originales desarrollados por investigadores de los EE.UU., revisado y aprobado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés, *United States Environmental Protection Agency*), se presenta en detalle, así como los métodos de otros estudios en otros lugares. Se espera que los enfoques presentados en este capítulo permitan controlar y cuantificar las emisiones de gases de efecto invernadero de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) utilizando enfoques experimentales estandarizados. Debido a que el funcionamiento de las PTARs parece tener un papel clave en las emisiones de gases de efecto invernadero, los resultados de tales esfuerzos de seguimiento y cuantificación podrían conducir en última instancia a que las PTARs no sólo mejoren sus descargas acuosas sino a que también minimicen sus emisiones gaseosas. Este capítulo se centra en las emisiones del tratamiento de aguas residuales por lodos activados y procesos similares. Las mediciones de gas metano están bien establecidas como un método estándar, mientras que Rapson *et al.* (2014) han elaborado un resumen de todos los métodos de medición de óxido nitroso.

Las mediciones de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ) son una buena herramienta para evaluar el rendimiento de una PTAR. El contenido de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  en los gases que se producen en los procesos biológicos puede medirse con estrategias similares que las descritas aquí para los GEI. Una combinación de mediciones de gases y mediciones de titulación constituye una excelente manera de verificar los procesos biológicos (Pratt *et al.*, 2003; Gapes *et al.*, 2003). El agotamiento de oxígeno en las emisiones de gases es una medida de las velocidades de respiración y puede ser visto como un enfoque respirométrico (de planta a escala real), similar al descrito en el Capítulo 3. La producción de dióxido de carbono también está relacionada con los procesos de respiración aerobia y anóxica. Sin embargo, es más difícil de interpretar, ya que el cambio (generalmente una disminución neta) de la alcalinidad, también influye significativamente en el contenido de dióxido de carbono en el gas emitido (Hellings *et al.*, 1996). La medición de la conversión de oxígeno y dióxido de carbono podría ser de gran valor para un mejor seguimiento del proceso y manejo de datos (ver Capítulo 5), ya que permiten una mejor evaluación de los balances de masas en el proceso de tratamiento de aguas residuales (Puig *et al.*, 2008).

## 4.2 SELECCIÓN DE LA ESTRATEGIA DE MUESTREO

Una consideración importante para las mediciones de las emisiones de gases de las PTARs es un procedimiento de muestreo representativo. Dada la naturaleza biológica de la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  y su vinculación a procesos tales como la nitrificación y la desnitrificación, se espera una variabilidad espacial y temporal de los flujos de emisión medidos de estos gases. También podría esperarse una correlación con los constituyentes de aguas residuales tales como amoníaco, nitrito y nitrato, como se ha observado en casi todas las campañas de medición realizadas hasta la fecha. Dado que las emisiones de las PTARs a gran escala, especialmente de  $\text{N}_2\text{O}$ , han demostrado ser altamente dinámicas, los programas de monitoreo y muestreo deben definirse caso por caso (Daelman *et al.*, 2013). Las estrategias de muestreo empleadas durante las campañas de muestreo deben captar adecuadamente esta variabilidad. A continuación, se describen algunos factores que influyen en la estrategia de muestreo.

### 4.2.1 Rendimiento de la instalación

Uno de los resultados más significativos de estudios anteriores ha sido la consideración de que las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  de las PTARs están vinculadas a la acumulación global o local de especies de nitrógeno como el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). En aquellas instalaciones o plantas de tratamiento que no muestran un rendimiento estable de nitrificación o desnitrificación se hace especialmente necesario la caracterización de sus emisiones. Esa caracterización es importante dado que muchas instalaciones no están operadas o diseñadas para la remoción biológica de nutrientes (BNR). Bajo ciertas condiciones (tales como altas temperaturas durante el verano cuando estas instalaciones están sobrecargadas, exhiben una nitrificación incompleta), estas plantas pueden emitir más  $\text{N}_2\text{O}$  en comparación con plantas de BNR bien diseñadas y operadas. Por otra parte, es probable que en un proceso de lodos activados se produzcan emisiones de  $\text{CH}_4$  debido a la falta de control. Por ejemplo, un control deficiente de la aireación o del oxígeno disuelto (OD) en el proceso de lodos activados puede conducir a zonas anaeróbicas y a la producción de  $\text{CH}_4$  asociada. Además, el  $\text{CH}_4$  que se formó en el sistema de alcantarillado y entra en la planta con el afluente es probable que pueda ser emitido en el tanque de lodo activado, aunque también podría ser oxidado aeróbicamente. El  $\text{CH}_4$  en el tanque de lodo activado puede ser minimizado, mientras que su conversión biológica podría ser propiciada a través de un adecuado proceso de diseño y control (Daelman *et al.*, 2014).

### 4.2.2 Variaciones estacionales de las emisiones

El vínculo entre la temperatura y las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  o  $\text{CH}_4$  no es sencillo y debe considerarse en combinación con el diseño de la planta. Para las plantas que funcionan con un alto tiempo de retención de sólidos (TRS) y manteniendo una remoción completa de amonio durante todo el año, se pueden esperar mayores emisiones durante el verano, debido a la mayor actividad microbiana a altas temperaturas. Especialmente para las plantas que operan a flujo tubular o pistón a bajas temperatura, la emisión de gases puede ocurrir aguas más abajo de la instalación. También, a estas bajas temperatura la nitrificación es más lenta aguas abajo. Para plantas que no pueden nitrificar completamente a bajas temperaturas y producen concentraciones no



limitantes de  $\text{NH}_3$ , la emisión de gases emitidos puede ser mayor que a temperaturas más altas. En contraste, como estas plantas pueden lograr la nitrificación completa a temperaturas más altas, sus emisiones podrían ser más bajas. Las plantas de tratamiento de nitrificación estacional también podrían tener una mayor emisión.

### 4.2.3 Objetivo del muestreo

En la literatura se han descrito diversas estrategias de muestreo para la cuantificación de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ , como el muestreo en línea de 24 horas, el muestreo en línea de una semana, el muestreo semanal a gran escala y la toma de una única muestra. La diferencia en los métodos de muestreo puede explicar en parte la gran variabilidad de las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  reportadas, aparte de las diferencias en la emisión real, que está relacionada con el rendimiento de la planta y sus variaciones diurnas y estacionales.

La estrategia óptima de muestreo depende del objetivo de la campaña de muestreo. Daelman *et al.* (2013) aplicó varias estrategias de muestreo de  $\text{N}_2\text{O}$  reportadas en la literatura, al amplio conjunto de datos de una campaña de muestreo en línea ejecutado a largo plazo. Ellos mostraron que una determinación confiable de la emisión media real de  $\text{N}_2\text{O}$  requiere un muestreo a largo plazo, ya sea en línea o mediante toma directa de muestras, cubriendo todo el intervalo de temperatura que posiblemente se puede encontrar. El muestreo a corto plazo inevitablemente ignora la variación a largo plazo que pueda estar presente. Para el muestreo a largo plazo, las muestras nocturnas y de fin de semana contribuyen significativamente a una estimación más precisa. Un muestreo con mayor frecuencia (en línea) es indispensable para identificar las correlaciones entre las emisiones y las variables de proceso que inducen las emisiones y de esta manera obtener información sobre los mecanismos de formación de  $\text{N}_2\text{O}$  subyacentes. Daelman *et al.* (2013), presentaron, como guía para las campañas de muestreo, un método para obtener el número de muestras o la extensión del período de muestreo en línea, necesario para obtener una estimación suficientemente precisa de las emisiones en el que se equilibren los costos y la precisión.

## 4.3 EVALUACIÓN DE PLANTA Y RECOLECCIÓN DE DATOS

### 4.3.1. Preparación de la campaña de muestreo

Un programa de muestreo (o campaña) se lleva a cabo principalmente para (i) recopilar datos operativos de rutina relacionados con el desempeño general de la PTAR, (ii) adquirir información que puede ser usada para documentar el desempeño de una operación o proceso dado, (iii) recolectar datos que se pueden utilizar para implementar los nuevos programas propuestos para alcantarillado y PTAR, y (iv) obtener registros necesarios para reportar cumplimientos normativos. En general, esta información esta compuesta de:

- a. Caracterización del afluente.
- b. Balance de masas.
- c. Caracterización del lodo activado.
- d. Caracterización del efluente.
- e. Cualquier otra información necesaria.

Un plan de muestreo bien preparado no sólo debe proporcionar el tipo (por ejemplo, la demanda química de oxígeno, DQO; nitrógeno total Kjeldahl, NKT; fósforo total, PT) y la ubicación del punto de muestreo (por ejemplo, afluente, efluente o tanque de aireación). También indica cuál es la frecuencia de muestreo y cómo debe tomarse, manipularse, almacenarse y procesarse la muestra en el laboratorio para realizar mediciones analíticas. El objetivo de la planificación de la campaña es comunicar toda esta información al personal responsable de obtener las muestras (operadores o personal técnico de la planta) y al personal de laboratorio que analiza las muestras. Deben elaborarse esquemas que indiquen toda esta información, preferentemente en un único esquema. Asimismo, se debe desarrollar un diagrama de flujo de proceso que señale con precisión todos los puntos de medición definidos durante la planificación.

Al diseñar la campaña de muestreo se deben abordar al menos las siguientes preguntas prácticas:

1. POR QUÉ: ¿Cuál es el propósito de tomar las muestras?
2. QUÉ: ¿Qué parámetros se deben medir?
3. DÓNDE: ¿Dónde están los lugares de muestreo?

4. CUÁNDO: ¿Cuándo se toman las muestras?
5. CON QUÉ FRECUENCIA: ¿Cuál es la frecuencia para cada parámetro muestreado?
6. CÓMO: ¿Cómo se ejecutará el muestreo?
7. POR QUIÉN: ¿Quién tomará las muestras y quién las analizará?
8. EQUIPO: ¿Qué se utilizará para recolectar, almacenar y analizar las muestras?

Los seis criterios para obtener datos de calidad son:

1. Recolección de muestras representativas.
2. Formulación de los objetivos del programa de muestreo.
3. Manejo y conservación apropiados de las muestras.
4. Procedimientos adecuados de identificación de la cadena de custodia y de la muestra.
5. Garantía de la calidad del trabajo.
6. Análisis adecuado.

Para que cumpla con su propósito, la muestra debe ser representativa, reproducible, defendible y útil. También es importante darse cuenta de que una comprensión adecuada de los procedimientos de muestreo es crucial para el diseño y éxito del programa de muestreo. Esto no sólo debe ser realizado por quien está concibiendo el muestreo, sino también por todos los demás involucrados en el proyecto. Por lo tanto, se recomienda organizar una reunión pre-operacional para comunicar a todo el personal involucrado la planificación de la medición. Durante esta reunión, se debe indicar claramente cuál es el objetivo del proyecto, qué se hará con las mediciones específicas y también la importancia de adquirir información precisa. Es posible que sea necesario brindar algún tipo de formación en técnicas de toma de muestras.

Para asegurar que la planificación de la medición se comprenda y ejecute correctamente, el plan de medición debe relacionarse lo más que se pueda con las rutinas prácticas del personal de la planta y del laboratorio. Siempre que sea posible, se deben hacer referencias a rutinas estándar (prácticas). Por ejemplo, los lugares de medición en el diagrama de flujo del proceso deben indicarse de la misma manera que los utilizados por los operadores. Frecuentemente, el que diseña, tiene su propia manera preferida de indicar los flujos (por ejemplo, en un diagrama de flujo usando la numeración lógica  $Q_1$  a  $Q_n$  para indicar flujos en el balance de masas), para comunicar eficazmente esta información también

debe indicarse en todos los diagramas y tablas los nombres prácticos de las unidades de proceso y flujos.

Además, puede ocurrir que los nombres asignados para las mediciones analíticas no correspondan con las denominaciones y métodos prácticos aplicados en el laboratorio. Por lo tanto, el plan de medición también debe ser verificado con el personal del laboratorio y las rutinas de medición aplicadas (métodos y equipos analíticos).

A los efectos de una campaña, las muestras se deben tomar preferiblemente en condiciones de clima seco, a menos que se especifique lo contrario. En la práctica no siempre está claro cuando se cumplen estas condiciones. Normalmente se recomienda planificar un día de muestreo después de tres días sin lluvia (importante). Esto significa que la planificación de la medición nunca puede hacerse para una fecha exacta. Sin embargo, debe incorporar un período de varios días en el que la planificación se pueda ejecutar, dependiendo de las condiciones climatológicas.

Algunas de las muestras pueden realizarse automáticamente con dispositivos de toma de muestras, compuestas proporcionales al flujo, de manera continua durante 24 h (o casi continua). Estos muestreadores automáticos recolectan muestras durante un período de 24 horas y tienen que ser iniciados 24 h antes del tiempo propuesto, para proporcionar una muestra recogida en el día de muestreo deseado. Se debe tener en cuenta que los operadores tienen que ser notificados con un día de antelación para poder recoger las muestras a tiempo. Todas las demás muestras tomadas el día del muestreo serán fundamentalmente muestras puntuales (también llamadas muestras aleatorias, de captura, individuales, e instantáneas). Debido a que el programa de muestreo contiene múltiples puntos de medición y para cada punto de medición, se deben medir múltiples parámetros, la cantidad de envases requeridos para almacenar las muestras aumentará rápidamente. Por ejemplo, La cantidad de muestras necesarias para una campaña relativamente pequeña puede superar con facilidad las 100. Además, debe tenerse en cuenta que para cada punto de muestreo el volumen muestreado debe permitir mediciones analíticas, lavado de filtros y recipientes, posibles derrames y generalmente duplicados o triples mediciones en el laboratorio. Además, el laboratorio debe estar preparado para manejar esta gran cantidad de muestras en uno (o más) días. Algunas de las muestras

pueden almacenarse fácilmente para ser medidas en otro momento. Sin embargo, para otras mediciones es importante que las muestras sean pre-tratadas (por ejemplo, filtradas) antes de que sean almacenadas. Además, esto debe planificarse en cooperación con el personal del laboratorio para evitar una posible sobrecarga de trabajo y posibles resultados de medición inexactos.

### 4.3.2 Identificación de la muestra y hoja de datos

Como se señaló anteriormente, en el plan de medición de la muestra puede ser necesario analizar muchas muestras en un mismo día de muestreo. Esto claramente requiere una buena administración y la identificación de la muestra (ID de la muestra). Debe conservarse una lista de las muestras recolectadas. Las muestras se deben enumerar e incluir la información aclaratoria que se estime necesaria. Además, los recipientes de muestras individuales deben estar etiquetados en consecuencia.

Los requisitos de la etiqueta del envase son:

- a. Ubicación del sitio de muestra.
- b. Número de contenedor si hay más de un contenedor/muestra.
- c. Nombre del colector de muestras.
- d. Nombre/ubicación de la instalación.
- e. Fecha y hora de la recogida.
- f. Identificarla como puntual o compuesta.
- g. Parámetros a medir - lista de análisis a realizar.
- h. Preservante empleado (de ser requerido).

Para asegurar la calidad es necesario la administración adecuada del programa de muestreo. Se puede utilizar la siguiente lista de verificación para construir formularios de custodia que apoyen la campaña de medición. A menudo, las formas de este tipo ya existen disponibles y son utilizadas para los programas de muestreo regular. Puede ser útil averiguar si estas formas y también las formas en la campaña de medición están disponibles con anterioridad a la concepción de otras nuevas.

- a. Número del proyecto: asignar un número al episodio de muestreo de manera tal que se pueda utilizar para rastrear las muestras.
- b. La persona que toma la muestra debe imprimir y/o firmar su nombre.

- c. Nombre del proyecto: el nombre del proyecto y, si es necesario, la dirección del proyecto.
- d. Nombre del contacto del proyecto: el nombre de la persona que está a cargo del proyecto.
- e. Número de teléfono del proyecto: el número de teléfono donde la persona de contacto del proyecto puede ser contactada.
- f. Fecha de la muestra: indique las fechas de la toma de muestras (puntuales y compuestas).
- g. Tiempo de muestra: indique el tiempo de muestreo para cada muestra.
- h. Tipo de muestra: compuesta (recolectada durante un período de 24 horas) o puntual.
- i. Ubicación de la estación: el sitio donde se tomó la muestra.
- j. Número de contenedores: indique el número y tipo de contenedores para cada evento de muestreo.
- k. Análisis solicitado: enumerar el análisis necesario que sea compatible con los métodos oficiales.
- l. Observaciones: observar los requisitos especiales para las muestras para el laboratorio.
- m. Dividir muestras: cuando una muestra se divide en diferentes proporciones para el análisis, la parte receptora puede aceptar o rechazar las muestras y debe firmar esta casilla en el formulario de custodia

### 4.3.3 Factores que pueden limitar la validez de los resultados

Al evaluar los resultados del programa de muestreo, existen varios factores que pueden limitar la validez de los resultados, tales como:

- a. Valores faltantes.
- b. Frecuencias de muestreo que cambian durante el periodo de tiempo registrado.
- c. Múltiples observaciones dentro del período de muestreo.
- d. Incertidumbre en los procedimientos de conservación y medición de la muestra.
- e. Censura de las señales de medición.
- f. Tamaño pequeño de la muestra.
- g. Manejo inadecuado de datos.
- h. Inexactitudes del equipo.

Siempre es útil comprobar el procedimiento de muestreo y los resultados de la medición con respecto a los criterios anteriores.

### 4.3.4 Asesoramiento práctico para las mediciones analíticas

A continuación, son enumerados algunos errores típicos documentados, que se repiten en los casos de estudio durante el procedimiento de la muestra o en las mediciones analíticas:

- El método utilizado para las mediciones analíticas de los sólidos en suspensión de los lodos activados es diferente para las muestras concentradas y diluidas. Si la concentración está por encima de un cierto intervalo, ya no será posible la filtración, el secado y el pesado de los sólidos. En este caso se utiliza frecuentemente el método de masa seca (evaporación de la muestra). Esto incluye las sales solubles, en las que especialmente para las muestras de lodo de baja concentración, los resultados no serán representativos de los sólidos suspendidos totales. Esto debe tenerse especialmente en cuenta al medir los lodos activados, los lodos espesados y los flujos de agua residuales. Para los flujos de lodos más concentrados (> 20%), puede utilizarse el análisis de masa seca.
- Cuando se mida el filtrado de la muestra que contenga sólidos en suspensión, el papel de filtro no se debe lavar si no con la propia muestra y no con agua desmineralizada, lo que causará la dilución del filtrado medido.
- Cuando se manipulen muestras que contienen sólidos en suspensión, es importante tomar muestras homogéneas bien agitadas. Cabe señalar que las mediciones de SST son esenciales y al mismo tiempo son muy difíciles de muestrear con precisión. Se aconseja instruir a todo el personal sobre cómo tomar muestras fiables de SST.
- Al realizar la caracterización del lodo activado, todas las muestras deben tomarse del mismo recipiente, ya que es importante conocer la concentración relativa de SST, SSV, DQO, NKT y PT en la muestra. Esto no suele ser un procedimiento estándar y por lo tanto todo el personal, especialmente aquellos que trabajan en un laboratorio de análisis, debe ser bien instruido en este asunto.
- Un problema común conocido es la digestión de sólidos suspendidos, que es necesaria para medir analíticamente el PT (y también la DQO y el NKT). Cuando el procedimiento de digestión no es completo, las mediciones de fósforo serán menores que las de la concentración real. Especialmente cuando hay precipitados químicos (por ejemplo, como resultado de la dosificación de sales de hierro).

- Las mediciones de nitrato en muestras que contengan lodos activados (bacterias heterótrofas desnitrificantes) deben hacerse rápidamente antes de que ocurra la desnitrificación.
- La medición de ácidos grasos volátiles (AGV) en muestras que contienen lodos activados (bacterias heterótrofas desnitrificantes) es prácticamente imposible por la misma razón. Los AGVs son casi inmediatamente oxidados por los organismos vivos. Estos tipos de muestras son altamente poco fiables y no deben utilizarse. Es posible la medición de ácidos grasos volátiles en el afluente. Sin embargo, la muestra se debe filtrar inmediatamente después del muestreo y almacenarse bajo determinadas condiciones.

### 4.3.5 Metodología general para el muestreo

En general se ha desarrollado un procedimiento estándar de seis etapas para diseñar el seguimiento de los sistemas de calidad de aguas, el procedimiento para el programa de muestreo de las PTARs puede derivarse del mismo:

#### Etapa 1: Evaluación de la información existente

- Captación de aguas residuales y tratamiento.
  - Aguas residuales domésticas.
  - Efluentes industriales.
  - Sobrenadantes de alcantarillados combinados y estaciones de bombeo.
  - Plantas de tratamiento de aguas residuales.
- Investigaciones a escala de laboratorio y planta piloto.
  - Plantas de tratamiento de aguas residuales.
  - Redes de colección de aguas residuales.

#### Etapa 2: Expectativas de la evaluación de la información

- Metas de calidad de agua y objetivos.
- Problemas de calidad del agua y consecuencias.
- Metas de gestión y estrategia.
- Papel del monitoreo en la gestión.
- Metas del monitoreo (como hipótesis estadística).

#### Etapa 3: Definición de un criterio estadístico de diseño

- Característica estadística de la población que va a ser muestreada.
  - Variación de la calidad.
  - Impacto estacional.
  - Correlación (independencia).
  - Distribución de probabilidad aplicable.
- Entre muchas pruebas estadísticas, seleccionar la más apropiada.

**Etapa 4: Diseño de la red de seguimiento**

- Dónde muestrear (del papel del seguimiento en la gestión).
- Qué muestrear (de la meta de la calidad del agua y problemas).
- Cuándo muestrear (de las circunstancias específicas).
- Cuán frecuentemente muestrear (de las necesidades de las pruebas estadísticas).

**Etapa 5: Desarrollo de planes operacionales y procedimientos**

- Muestreo de rutas y puntos.
- Procedimiento de muestreo y análisis de campo.
- Preservación y transporte de muestras.
- Procedimientos de análisis de laboratorio.
- Procedimientos de control de calidad.
- Hardware de gestión y recuperación de datos y sistemas de gestión de bases de datos.
- Software de análisis de datos.

**Etapa 6: Desarrollar procedimientos para presentar informes**

- Tipo de formato de los informes.
- Frecuencia de publicación del informe.
- Distribución de informes (información).
- Evaluación de la capacidad del informe para satisfacer las expectativas iniciales de información

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede llevar a cabo un programa general de muestreo de aguas residuales y lodos siguiendo los pasos que se enumeran a continuación:

- Definición del propósito del muestreo.
- Determinación del tipo, alcance y exactitud requerida de los análisis a realizar.
- Definición del carácter de las muestras a recoger.
- Selección de las localidades y fuentes a ser muestreadas, y de los puntos de muestreo en estas localidades.
- Determinación de los parámetros hidráulicos y otros relativos al tema del programa de muestreo.
- Consideración de la seguridad e higiene laboral de quienes recogen las muestras.
- Preparación de un programa de muestreo óptimo.
- Selección del equipo de muestreo y medición adecuados a las fuentes a muestrear, y determinación de su estado.
- Selección de la técnica de muestreo más adecuada en función del programa definido y del equipo seleccionado para la fuente determinada, incluidas las preparaciones, las mediciones subsidiarias y las observaciones. Al implementar un programa de muestreo, las técnicas utilizadas deben cumplir con

una serie de requisitos generales tales como fiabilidad, economía, repetitividad y conservación.

- Selección de procedimientos apropiados, equipo de manipulación de muestras y herramientas, transporte del sitio de la toma de muestra hasta el laboratorio y almacenamiento.
- Consideración de los métodos de análisis más adecuados *in situ* y en el laboratorio, interpretación más rápida posible de los análisis, incluyendo comprobaciones de fiabilidad y posible repetición del muestreo y otros factores que puedan influir en la precisión o representatividad de los análisis.
- Uso de retroalimentación, siempre que sea posible, para modificar un programa de muestreo por otro mejor.
- Establecer las condiciones necesarias para el uso inmediato de los resultados y para su almacenamiento como fuente primaria de información en el futuro, ya sea para uso a corto o largo plazo.
- Selección de un sistema apropiado para el manejo de datos (manejo, procesamiento, transferencia y manipulación).
- Selección del método de documentación que se utilizará a lo largo del programa.

Logísticamente, realizar la campaña de medición durante el estudio de diseño es una tarea complicada y al mismo tiempo es el paso más importante y crítico. Por lo tanto, se recomienda preparar cuidadosamente la campaña de medición en todos los aspectos posibles. También es aconsejable realizar las primeras rondas de mediciones junto con todo el personal involucrado para asegurarse de que todas las instrucciones dadas en el plan de medición se desarrollan correctamente y según lo previsto, además de ser debidamente interpretadas por todo el personal. Los resultados analíticos de una muestra son tan exactos como la calidad de la muestra que se toma. Si la técnica para la recolección de muestras es incorrecta, no importa cuán precisos sean los procedimientos de laboratorio, los resultados no serán los deseados. Mediante el muestreo a partir de los procedimientos establecidos, se reduce la probabilidad de error y se aumenta la precisión de los resultados de la muestra. Debe tenerse en cuenta que para muchas muestras la campaña de medición es una oportunidad única. Recolectar una vez más las muestras en una etapa diferente a menudo no conducirá a resultados satisfactorios debido a que la planta de lodos activados es un sistema dinámico que está cambiando continuamente con el tiempo. Con esto en mente, para el estudio las muestras deben ser recolectadas simultáneamente, de tal manera que su información relativa pueda ser usada para



la evaluación de la planta. Por lo tanto, la toma de muestras individuales a menudo no serán representativas, lo que significa que las mediciones (faltantes o incorrectas) a menudo no pueden ser repetibles. En conclusión, la recolección de datos a través del muestreo en las PTARs es una actividad crítica que necesita un enfoque sistémico y profesional y el diseño de un programa de muestreo es a menudo tarea de un especialista experimentado.

### 4.3.6 Muestreo en el marco de las mediciones de las emisiones de gases

La fuerte relación que existe entre las emisiones de  $N_2O$  y las condiciones operacionales, hace crucial el desarrollo de un análisis preliminar de reconocimiento. Antes de la campaña de muestreo, los equipos de campo deben reunir datos operativos durante las reuniones con los operadores de la planta (y los ingenieros de proceso), la siguiente información general sobre el sitio de la evaluación se recopila típicamente:

- Una descripción general de la planta que incluye información general relacionada con su configuración, diagramas de flujo de líquidos y sólidos, criterios de diseño, equipos tecnológicos importantes de la documentación de diseño de la planta y/o manuales de operación y mantenimiento.
- Unidades de proceso y disposiciones que incluyen información sobre la configuración de las zonas anaerobias/aerobias/anóxicas, volúmenes de las zonas, puntos de ajuste operativos, cuencas en servicio, flujo y distribución de aireación, corrientes de reciclaje y caudales.
- Datos operativos de la planta, proporcionando idealmente un resumen de un mínimo de 3 meses de datos de la planta sobre los procesos de tratamiento relevantes para permitir la caracterización del afluente y el efluente, (O.D., TRMC, entre otros). Los datos operativos son necesarios para comprobar que la planta no se encontraba con dificultades antes y durante el período de investigación (muestreo).

Los datos e información recolectados pueden utilizarse para realizar análisis mediante técnicas convencionales, tales como el desarrollo de balances de

masa de sólidos y nitrógeno, así como mediante el uso de modelos de los procesos. Los detalles de la evaluación basada en modelos no se presentan en este capítulo y pueden encontrarse en otras publicaciones (Melger, 1999; Puig *et al.*, 2008; Rieger *et al.*, 2012).

Con el objetivo de recopilar los datos requeridos para la evaluación, es necesario determinar el flujo de afluente y su contenido de materia orgánica y nitrógeno, en preparación de la detallada campaña de medición de líquidos y aire en la PTAR. Para el muestreo inicial es necesario vigilar los siguientes parámetros en relación con el proceso de lodos activados:

- Caudales de flujo afluente (mínimo una vez por hora).
- Concentración del afluente y efluente de amonio (hasta ocho veces al día o continuamente).
- Nitrito y nitrato en afluente y efluente (hasta ocho veces al día o continuamente).
- DQO en afluentes y efluentes (comenzar con una vez por hora, puede reducirse dependiendo de la variabilidad observada).

Además, deben ser recolectados el rendimiento diario y los perfiles en tanque, en el momento del muestreo de  $N_2O$  en la fase gaseosa. En la medida de lo posible, todos los análisis en fase líquida deben estar de acuerdo con métodos y protocolos aprobados (por ejemplo, APHA *et al.*, 2012). Dado el importante efecto del nitrito en la emisión de  $N_2O$ , se aconseja prestar atención especial a este gas durante la campaña de muestreo. En la medida de lo posible, el equipo de muestreo debe trabajar con el personal del laboratorio de la planta para incluir información de los analizadores en línea presentes, para evitar la duplicación de esfuerzos en la recolección de datos. Además de los datos presentados en la Tabla 4.1, se deben recopilar los siguientes perfiles diarios y en el tanque (Tabla 4.2).

**Tabla 4.1** Resumen de los datos requeridos para la evaluación preliminar de una PTAR.

Muestra	Parámetro y frecuencia de muestreo (número de muestras por semana)												
	SST	SSV	cDBO <sub>5,tot.</sub> <sup>1</sup>	cDBO <sub>5,sol.</sub>	DQO <sub>tot.</sub> <sup>1</sup>	DQO <sub>sol.</sub>	DQO <sub>nit.floc.</sub>	Temp.	NKT <sup>1</sup>	NKT <sub>sol.</sub>	NH <sub>3</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N
Albañal sedimentado	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1
Efluente secundario	1	1	1	1	1	1 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>		1	1	1	1	1
SSLM en el reactor	1	1						1					
SSLM en la recirculación	1												
SSLM en el lodo de exceso	1 <sup>3</sup>												
Clarificador	SST en el manto de lodo (revise el lodo 1/d y promedio 1/semana)												
Separación del flujo y velocidad de flujo	Diferentes mediciones posibles												
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aproximadamente - usualmente sedimentar el agua en la entrada y permitir el régimen natural de flujo (si no hay información del intervalo de flujo).</li> <li>• Confirmar la división del flujo realizando un balance de masas y midiendo la concentración de SSLM</li> <li>• Alternativamente tomar mediciones del lodo activado en cada ocasión.</li> <li>• Use medición de densidad óptica para obtener los SST cada 2-3 horas para conocer la lectura promedio.</li> </ul>												
Zona anóxica de mezcla	Agitador mecánico o por aireación.												
Flujo del afluente	Variación del flujo diario a intervalos apropiados de tiempo (15 min para períodos de altos incrementos, 1 h para períodos estables).												
Flujo de recirculación	Semanalmente como promedio e indicar la localización y tipo de medición de flujo, y variabilidad..												
Flujo de la purga de lodo	Semanalmente como promedio e indicar la localización y tipo de medición de flujo, veces que se produce la descarga (si no es continua).												
Oxígeno disuelto	1/d (obtener valor semanal) indicar la localización del medidor de OD a lo largo de la longitud del reactor, y hora de la medición.												
Flujo de aireación	Diariamente como promedio, indicar la localización del medidor de aire y variabilidad en el transcurso del día.												
Dosificación de químicos	Diario, indicar el equivalente de cloruro férrico (y otros químicos) concentración, puntos de dosificación, y dosis en cada punto.												

<sup>1</sup> Homogenizar las sub-muestras antes de la medición 'total'. Deseche la muestra remanente- no la utilice para determinación de solubles o filtrados.

<sup>2</sup> Puede utilizarse DQO soluble en lugar de DQO coagulado y filtrado del efluente secundario

<sup>3</sup> Cuando la recirculación y la extracción son de la misma corriente, la medición de los SST en una de ellas es suficiente.

**Tabla 4.2** Requerimiento de datos complementarios preferiblemente acompañando las mediciones de las emisiones de gases.

Muestra	Parámetro (número de muestras por día)													
	SST	SSV	cDBO <sub>5,tot.</sub>	cDBO <sub>5,sol.</sub>	DQO <sub>tot.</sub> <sup>1</sup>	DQO <sub>sol.</sub>	DQO <sub>nit.floc.</sub>	NKT <sup>1</sup>	NKT <sub>sol.</sub>	pH	Alc	NH <sub>3</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N
Agua sedimentada	8	2	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Efluente secundario	8		8	8	8	8 <sup>2</sup>	8 <sup>2</sup>	8	8	8	8	8	8	8
SSLM en recirculación	8													
SSLM en el exceso	8 <sup>3</sup>													
Flujo del afluente	Variación del flujo diario a intervalos apropiados de tiempo (15 min para períodos de altos incrementos, 1 h para períodos estables).													
Flujo de recirculación	Diario como promedio e indicar la localización y tipo de medición de flujo, y variabilidad.													
Flujo de la purga de lodo	Diario como promedio e indicar la localización y tipo de medición de flujo, y variabilidad.													
Oxígeno disuelto	1/h, indicar la localización del medidor de OD a lo largo de la longitud del reactor, y hora de la medición.													
Velocidad de aireación	Diariamente como promedio, indicar la localización del medidor de aire y variabilidad en el transcurso del día.													
Perfiles en tanque	SST	SSV	pH	OD	REDOX	Temp.	DQO <sub>nit.floc.</sub>	Alc.	NH <sub>3</sub> -N	NO <sub>3</sub> -N	NO <sub>2</sub> -N			
	8/d	2/d	8/d	8/d	8/d	8/d	8/d	8/d	8/d	8/d	8/d	8/d	8/d	8/d

La recolección de muestras de aguas residuales convencionales para el análisis de los parámetros en la Tabla 4.2 debe ser realizada preferentemente por el personal de la instalación que normalmente recolecta muestras operacionales. Antes de cada evento de muestreo, el equipo que conduce las campañas de seguimiento debe consultar con el personal del laboratorio para asegurar que las muestras para los parámetros convencionales sean recogidas durante el seguimiento de los GEI para cumplir con los requisitos del diseño de la investigación y los procedimientos de operación del laboratorio de la PTAR.

Siempre se deben utilizar para cada campaña de muestreo de campo los requisitos de manejo y custodia de las muestras de la planta. Para confirmar la adecuación de la manera de trabajar, deben revisarse los procedimientos para el manejo de muestras de campo y la cadena de custodia con el equipo del proyecto aproximadamente dos semanas antes de la prueba a gran escala. En ese momento, deben definirse y documentarse

los ajustes en el protocolo de muestreo específico para el lugar.

### 4.3.7. Protocolo de pruebas y mediciones

En la tabla 4.3 se presentan ejemplos del lugar donde se origina la muestra, el parámetro químico, el preservante y el tiempo de conservación de las muestras de aguas residuales que deben recogerse durante las mediciones. Este ejemplo es un punto de partida y se puede personalizar y expandir según sea necesario para la planta específica donde se realiza el muestreo. Para las pruebas de campo en plantas reales, el laboratorio de la planta seguirá sus procedimientos operativos estándar específicos de laboratorio para cada parámetro. Los procedimientos operativos estándar de los laboratorios participantes deben ser revisados para ver si son adecuados y consistentes antes de las campañas de medición.

**Tabla 4.3** Ejemplos de especificaciones de muestreo para acompañar monitoreo de emisiones de gases.

Parámetro	Clasificación de la medición			Localización de la muestra	Volumen de muestra (mL)	Preservación de la muestra	Tiempo máximo
	Tipo	Frecuencia	Equipo para muestra				
pH	C	NA	NA, <i>in situ</i>	Reactor	NA	NA	ninguno, en línea
DQO: Colorimétrico	I, C	2/7 d	35 mL vial de vidrio	Reactor, efluente	8	4 °C	1 d
NH <sub>3</sub> -N: Potenciométrico (ISE)	I, C	2/7 d	200 mL botella de vidrio	Efluente	80	4 °C <sup>2</sup>	1 d
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N: Espectrofotométrico	I, C	2/7 d	200 mL botella de vidrio	Efluente	40	4 °C <sup>2</sup>	2 d
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N: Potenciométrico (ISE)	I, C	2/7 d	200 mL botella de vidrio	Efluente	40	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH < 2	28 d
N <sub>2</sub> O	C	1/7 d	Equipo muestreo de gases	Espacio libre del reactor	NA	NA	NA
NO <sub>x</sub>	C	1/7 d	Equipo muestreo de gases	Espacio libre del reactor	NA	NA	NA
OD	C	NA	NA, <i>in situ</i>	Reactor	NA	NA	Ninguno, en línea

<sup>1</sup>El volumen tabulado de muestra es el doble que el que se requiere para análisis duplicados de rutina y es suministrado en dos contenedores de muestras. El volumen adicional se recolecta para determinar la calidad del control de la medición, tal como la exactitud (análisis de muestras aisladas), precisión (análisis duplicados) y para cuantificar la potencial pérdida de muestra durante la manipulación o análisis.

C: medición continua; I: medición intermitente; La frecuencia de la medición solamente es aplicable a mediciones continuas

<sup>2</sup>Almacenaje a 4 °C. Nota: la biomasa es removida de la muestra mediante centrifugación a 3 500 g durante 10 min. La remoción de biomasa "captura" parte de la oxidación bioquímica de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N.

## 4.4 MEDICIÓN DE LAS EMISIONES

En la tabla 4.4 se resumen diferentes métodos de medición de los gases emitidos durante las actividades de investigación y en la práctica de rutina. Si la planta de tratamiento está cubierta, las concentraciones se pueden

medir fácilmente en el aire de ventilación. La combinación de mediciones de concentración con mediciones de flujo de aire, por ejemplo usando un tubo Pitot (Klopfenstein, 1998), puede ayudar a obtener una estimación directa de los flujos de gases emitidos (Daelman *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayoría de las

plantas de tratamiento están abiertas directamente al aire y la recolección de las emisiones de gases es un problema que requiere una atención especial para que el muestreo sea representativo. Esto puede ser resuelto ya sea utilizando campanas de gas para la recogida de gases o la medición en la pluma del gas emitido. El primero es el enfoque más común y, por lo tanto, se presenta en detalle en este capítulo.

Cuando es difícil realizar las mediciones de gases que se emiten (por ejemplo, en tanques abiertos o cuando la existencia de aireadores superficiales dificulten la colocación de cámaras o cajones para flujo), las emisiones pueden calcularse a partir de la medición de las concentraciones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O disueltas. Estos pueden complementarse con mediciones de coeficientes de transferencia de masa en cálculos de balance de masa

en la estimación de los flujos de emisión (Foley *et al.*, 2010). Para el N<sub>2</sub>O disuelto, se pueden usar microelectrodos para medir en línea la concentración en la fase acuosa (Foley *et al.*, 2010, Sección 4.7.1), pero también es posible el muestreo y el análisis por cromatografía de gases. Para este propósito, se ha demostrado que un método preciso y fiable es el muestreo de la fase líquida y enriqueciendo la salida de los gases solubles para analizarlos como un gas (Daelman *et al.*, 2012, Sección 4.7.3).

Las concentraciones de gases disueltos, tales como N<sub>2</sub>O, pueden medirse de manera continua basándose en mediciones en la fase gaseosa, de acuerdo con un método de separación de gases propuesto por Mampaey *et al.* (2015) (Sección 4.7.4).

**Tabla 4.4** Comparación de diferentes técnicas y métodos de medición de las emisiones de gases.

Método	Fase líquida	Fase gaseosa	Ventajas	Desventajas
Medición directa de gases en tanques cubiertos	Muestreo en dependencia de la accesibilidad a los tanques de tratamiento	Continuo	Método bien desarrollado y fácil de aplicar. Da la carga de emisión integral de la planta de tratamiento, con variaciones temporales.	Necesidad de tanques cubiertos. Dificultad en la determinación de variaciones espaciales dentro del tanque.
Cámara de flujo para tanques con superficie abierta	Muestreo puntual, sensor de N <sub>2</sub> O, O equipo de evacuación con medidor de gas	Monitoreo continuo	Protocolos bien desarrollados y de extenso uso. Los mecanismos y procesos que contribuyen a la emisión pueden interferir por consideraciones de mediciones espaciales y temporales (también por mediciones en zonas específicas).	Necesidad de múltiples mediciones para detectar variabilidad espacial y temporal y para obtener la carga total de emisiones de la planta.
Mediciones de emisión en la pluma de gases emitidos por la planta de tratamiento	No se muestrea	Continuo	Cuando los gases están totalmente mezclados, el análisis de los datos y los cálculos son directos. Los cambios de la pluma de gases en la dirección a favor del viento son detectados instantáneamente y las mediciones ajustadas en consecuencia. Flexibilidad de traslado del equipo. Capacidad para detectar emisiones en puntos candentes. Cuantificación de todas las emisiones de la planta.	Se necesita operador experimentado. Depende de condiciones favorables del viento y vías de acceso. Monitoreo solamente posible en condiciones favorables del viento. Muy limitada resolución espacial.

Una tercera alternativa para medir la emisión de toda una planta de tratamiento de aguas residuales es la detección de las concentraciones de CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O en la pluma de viento formada por las emisiones de la planta, en la propia dirección del viento. Esto requiere un equipo muy especializado, como la espectroscopía fotoacústica (Yoshida *et al.*, 2014, Rapson *et al.*, 2014) y, por lo tanto, solo posible ser utilizada por especialistas. La ventaja es que el seguimiento se puede hacer fuera de los límites de la planta, y pueden medirse las emisiones de todas las

unidades de la planta. Pueden identificarse puntos de gran interés con respecto a las emisiones de gases. Sin embargo, no es posible una resolución espacial precisa para, por ejemplo, los tanques de aireación. Dado el costo del equipo, el seguimiento es con frecuencia, económicamente inviable a largo plazo. El método es adecuado para llevar a cabo el seguimiento con equipos móviles de vertedores donde las emisiones solo son medidas unos pocos días al año.

## 4.5 MEDICIÓN DE N<sub>2</sub>O EN TANQUES ABIERTOS

El procedimiento general para medir los flujos de gases que se emiten desde la superficie de los tanques abiertos de lodos activados puede involucrar una cámara de flujo, utilizado por la mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha. Esto funciona para la mayoría de las instalaciones, excepto para los sistemas con aireadores superficiales. Cuando se cubre el espacio de la superficie aireada, puede medirse la composición del gas en el aire de ventilación (y su caudal). Cuando los aireadores están abiertos al aire, hay que acudir y confiar en el uso de los balances de N<sub>2</sub>O o CH<sub>4</sub> en la fase líquida (Foley *et al.*, 2010, Sección 4.7). La principal ventaja de utilizar una cámara de flujo es que puede facilitar el monitoreo de la variabilidad espacial de las emisiones a través de diferentes zonas, o de todo el reactor de un proceso de lodos activados. Por otra parte, es intensivo desde el punto de vista operacional, debido a la necesidad de múltiples lugares de muestreo para obtener mediciones representativas. En los Estados Unidos, el método de medición de las emisiones de gases es una variante de los métodos trazadores del EPA / 600 / 8-86 / 008 y del South Coast Air Quality Management District (SCAQMD). Esta variante se desarrolló para medir fuentes que tienen una relativamente alta velocidad de flujo superficial en comparación con la difusión.

Para medir flujos de nitrógeno gaseoso procedentes de reactores de lodos activados se usan réplicas comercialmente disponibles de la cámara de aislamiento de flujo de emisión de superficie de la EPA de los Estados Unidos (SEIFC por sus siglas en inglés, *Surface Emission Isolation Flux Chamber*)(Figuras 4.1-4.3). El SEIFC consiste en un espacio cerrado flotante del cual pueden ser captadas las emisiones de gases como muestras continuas o puntuales. Debido a que se puede medir el área superficial bajo el SEIFC, se puede determinar indirectamente el flujo específico del compuesto gaseoso de interés. El SEIFC 'flota' sobre la superficie del tanque de lodo activado, y pueden ser tomadas varias mediciones en diferentes lugares en un solo tanque, así como de diferentes tanques (nitrificación, desnitrificación) a lo largo de una línea de tratamiento.

El SEIFC está equipado con un mezclador (mezclador físico o por circulación de gas) para garantizar una mezcla de gases adecuada, y de manera ideal, con una sonda en línea para medir la temperatura. El SEIFC es actualmente

uno de los pocos dispositivos aceptados por la EPA de EE.UU. para medir flujos gaseosos (Tata *et al.*, 2003). Los análisis continuos en fase gaseosa se realizan por radiación infrarroja (N<sub>2</sub>O / CH<sub>4</sub>). Aunque no se discute en este capítulo, el gas también podría ser utilizado en el proceso de tratamiento de aguas residuales para cuantificar oxígeno y dióxido de carbono para medir las conversiones biológicas.

En general, el muestreo en tanques abiertos debe realizarse en múltiples puntos a lo largo de todo el proceso de lodos activados, en cada una de las unidades y sistemas que participan en el tratamiento. Estos lugares incluyen zonas aerobias, anóxicas y anaerobias, dependiendo de la configuración de la instalación. En las zonas no aireadas se utiliza un gas de barrido para producir un flujo de gas a través de la cámara de flujo. Durante el curso del muestreo en la fase gaseosa, también se deben recoger muestras en la fase líquida cercanos a la ubicación de la campana para registrar compuestos disueltos tales como amonio, nitrito y nitrato. Las muestras deben filtrarse inmediatamente después de la recolección en el campo y pueden analizarse utilizando métodos de campo fácilmente disponibles (como por ejemplo, kits analíticos portátiles) y métodos estándar analíticos de laboratorio (APHA *et al.*, 2012). Esto permite relacionar los datos de gas medidos con las concentraciones reales de compuestos relevantes en el punto de medición. La comparación de los datos con las mediciones en el afluente y efluente o las mediciones en otros puntos en el tanque podría dar una correlación sesgada entre las muestras de gas y de la fase líquida.

En los tanques de superficie abierta, los lugares específicos seleccionados comúnmente se encuentran próximos a los extremos de los sistemas, como son las entradas y salidas de cada zona anóxica o aerobia demarcada en la PTAR. La medición continua en cada una de estas ubicaciones específicas se realiza típicamente durante un período mínimo de 24 horas o más.

Los trenes o líneas de tratamiento en plantas de tratamiento de aguas residuales que realizan nitrificación y desnitrificación se caracterizan con base en las concentraciones y especies de nitrógeno presentes en la fase líquida y gaseosa. Las pruebas se llevan a cabo en diferentes puntos durante una campaña de muestreo en la cual se lleva a cabo el seguimiento de la fase gaseosa de manera continua y en tiempo real mientras que el seguimiento en la fase líquida se realiza mediante muestreo discreto. También se determinan las tendencias



y variaciones de las emisiones gaseosas y de la especiación. Este esfuerzo de muestreo está destinado a ayudar en el desarrollo de criterios operativos que minimicen las emisiones de nitrógeno en fase gaseosa y en fase líquida de las instalaciones de tratamiento de aguas residuales. El análisis de los compuestos GEI de nitrógeno y sus precursores, tanto en el aire como en la fase líquida se complementa con el análisis de los parámetros de aguas residuales convencionales.

El monitoreo de las fases líquida y gaseosa puede llevarse a cabo en regímenes estacionalmente distintos, por ejemplo, en condiciones de temperatura cálida (es decir, en verano o a principios de otoño) y fría (en invierno) para tener en cuenta la variabilidad anual.

El procedimiento general para medir los flujos de  $N_2O$  y  $CH_4$  desde la superficie de los tanques de lodos activados implica llevar a cabo una variante de los métodos de trazadores EPA/600/8-86/008 y SCAQMD. Los análisis en la fase gaseosa se pueden realizar a través de analizadores infrarrojos ( $N_2O/CH_4$ ).

En ausencia de un método estandarizado para la determinación de  $N_2O$  en aire o agua, puede ser necesario introducir modificaciones de métodos para medir las emisiones de  $N_2O$ . En un estudio reciente (Ahn *et al.*, 2010a), con el objetivo de evaluar el desempeño de la medición de los flujos de  $N_2O$  se realizaron simultáneamente tres eventos de monitoreo en una PTAR con BNR con alimentación por etapas. Además del protocolo de investigación estándar, se llevaron a cabo simultáneamente dos monitoreos adicionales (Tabla 4.5).

Los ingenieros de investigación de la planta midieron los flujos utilizando la cámara de aislamiento de flujo de la EPA y el método del trazador SCAQMD, y usaron un analizador fotoacústico para determinar directamente el  $N_2O$ . Los consultores usaron la cámara de aislamiento de flujo de la EPA y el método de dilución del trazador SCAQMD para medir el flujo, y los siguientes métodos analíticos para determinar los precursores de ozono y los GEI. Estas pruebas simultáneas no fueron diseñadas para validar el enfoque analítico modificado para establecer una metodología aprobada. Sin embargo, ellos proporcionaron una verificación independiente de que con ese enfoque se pueden medir con precisión las emisiones de GEI de nitrógeno para cumplir con los objetivos de ese estudio, para las zonas donde se realizó la medición

paralela simultánea. Este estudio fue parte del proyecto original de la Fundación de Investigación del Medio Ambiente y del Agua (*Water Environment Research Federation*, WERF, de sus siglas en inglés), dentro del cual se desarrolló este protocolo.

**Tabla 4.5** Comparación adicional de metodologías analíticas para medir las emisiones de gases de efecto invernadero de PTARs

Método/Especies	Técnica	Aplicación
Método ASTM 1946-análisis permanente de gases	GC/TCD	Gases relevantes: $CH_4$ , $CO$ , $CO_2$ , y helio (He) como análisis separado
NIOSH 6600	FTIR	$N_2O$

Sobre la base de esta comparación simultánea, se recomendó además que los estudios posteriores deberían considerar el método del trazador de helio (He) (basado en el método ASTM D1946) para medir el caudal de gas de la cámara de flujo (Ahn *et al.*, 2010b).

### 4.5.1 Protocolo para medir el flujo superficial de $N_2O$

El siguiente protocolo tiene como objetivo proporcionar a los investigadores y equipos de muestreo de campo una descripción detallada de la metodología de recolección de datos y los requisitos de los análisis que permitan el cálculo de los flujos de nitrógeno gaseoso de diferentes zonas de la secuencia de los procesos de una instalación de lodos activados en una PTAR.

#### 4.5.1.1 Equipos, materiales y suministros

El siguiente equipamiento es necesario para realizar el protocolo; los proveedores y fabricantes pueden variar:

1. Cámara de aislamiento de flujo de emisiones superficiales (comercialmente disponible de los vendedores o construida a medida según las especificaciones de la EPA de los Estados Unidos (Kienbusch, 1986)).
2. Monitor Teledyne API  $N_2O$  Modelo 320E (Teledyne API, San Diego, CA).
3. Gas cero (que contiene cero ppm de  $N_2O$  y  $CH_4$ ), y estándares de gas  $N_2O$  y  $CH_4$  (Tech Air, White Plains, NY).
4. Manómetros digitales Dwyer serie 475 Mark III para medir la presión de la cámara de flujo de 0 a 1" (2.54

- cm de columna de agua) (alta sensibilidad) y 0 a 100" (baja sensibilidad) de una columna de agua (Dwyer Instruments Inc., Michigan City, IN).
5. Rotámetro para medir la velocidad de flujo del gas de barrido, 0 - 30 L min<sup>-1</sup> (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ).
  6. Bomba de aire ajustable, 0-10 L min<sup>-1</sup> (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) para proporcionar un flujo de gas de barrido a la cámara de flujo.
  7. Bomba de vacío, 0-30 L min<sup>-1</sup> (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) para el bombeo activo de gas de la cámara de flujo, si fuese necesario.
  8. Filtros de cartucho de 0.2 µm, conjunto de 10 (Millipore, Ann Arbor, MI) para evitar que partículas finas ingresen en los analizadores de gases.
  9. Columna de sílice gel para capturar la humedad (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ).
  10. Trampa de agua de vidrio que consiste en una botella de vidrio de 100 mL colocada en hielo dentro de una caja de Styrofoam®.
  11. Tubería de Teflon® (aproximadamente 0.5") y accesorios.
  12. Cable de extensión de 100-300' y tira de alimentación.
  13. Ordenador personal portátil (con al menos 512 MB de RAM) con programas de adquisición de datos para analizadores de N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> preinstalados.
  14. Conjunto de diversas herramientas de mano incluyendo llaves ajustables, destornilladores de diferentes tamaños y alicates ajustables.

#### 4.5.1.2 Procedimiento experimental

El procedimiento general para medir los flujos de N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> desde el espacio superior de los tanques de lodos activados implica una variante de los métodos de trazadores EPA/600/8-86/008 y South Coast Air Quality Management District (SCAQMD), que permiten el muestreo de emisiones gaseosas en sistemas con un alto flujo superficial.

Esta variante se ha desarrollado para medir aquellas fuentes que tienen una velocidad de flujo superficial relativamente alta en comparación con la difusión. Esto facilita un mayor muestreo en plantas de compostaje y de tratamiento de aguas residuales.

Se utilizan réplicas comercialmente disponibles de la cámara de aislamiento de flujo de emisión de superficie (SEIFC) de la EPA de EE.UU. para medir flujos de N gaseosos procedentes de reactores de lodos activados. La

US EPA SEIFC consiste esencialmente en un espacio cerrado flotante a través del cual se alimenta un gas portador (típicamente nitrógeno o argón) a un caudal fijo y se recoge el gas emitido de una manera en tiempo real o de forma discreta. Puesto que se puede calcular o medir el área superficial bajo el SEIFC, puede así determinarse el flujo específico del compuesto gaseoso de interés. Dado que el SEIFC 'flota' sobre la superficie del tanque de lodos activados, se pueden tomar varias réplicas en diferentes lugares en un solo tanque, así como de diferentes tanques (nitrificación, desnitrificación) a lo largo de toda la secuencia de tratamiento. El SEIFC también está equipado para mezclar (con un mezclador físico o mediante la circulación del gas de barrido) para garantizar el gas adecuado y, en algunos casos, una sonda de temperatura en línea. El SEIFC es actualmente uno de los pocos dispositivos aceptados por la EPA de EE.UU. para medir flujos gaseosos (Tata *et al.*, 2003). Los análisis en fase gaseosa se realizan a través de métodos infrarrojos (N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>).

En general, el muestreo se realiza en diferentes zonas en las diversas etapas que constituyen el proceso de lodos activados. Estas zonas pueden ser aerobias, anóxicas y anaerobias, dependiendo de la configuración de la instalación de que se trate. Adicionalmente, para poder registrar cualquier variación en el flujo de gases resultante de variaciones en el mezclado o cambios en el régimen de flujo, debe muestrearse en múltiples puntos dentro de cada zona (aproximadamente tres, pero nunca en menos de dos).

El incremento excesivo de la presión se puede minimizar equipando la cámara de flujo con múltiples respiraderos o una ventilación de tamaño variable y supervisando continuamente la caída de presión a través de la campana, mediante un manómetro. El caudal de gas debe medirse en todos los puntos de muestreo y de interés, usando una técnica con gas trazador y controlando, en caso de ser necesario, la presión a través de la cámara de flujo. Alternativamente puede usarse la velocidad de aireación que aparece registrada en los controles de la planta (como una verificación del orden de magnitud del valor). La configuración modificada de la cámara de flujo utilizada en este estudio se muestra en las Figuras 4.1-4.3.

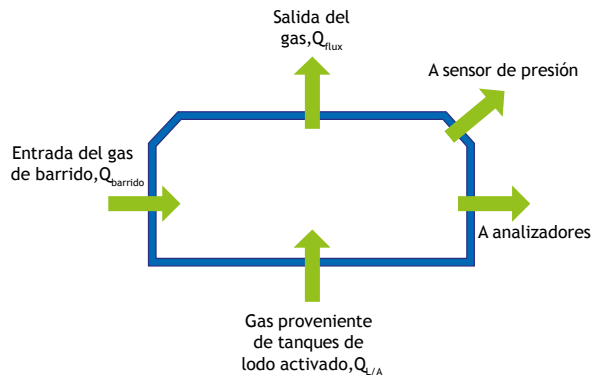


Figura 4.1 Esquema de cámara de aislamiento de flujo de emisión de la US EPA (modificado por Tata *et al.*, 2003).

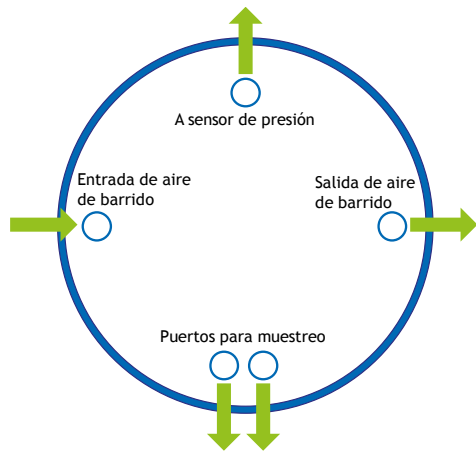


Figura 4.2 Esquema modificado de la cámara de flujo.

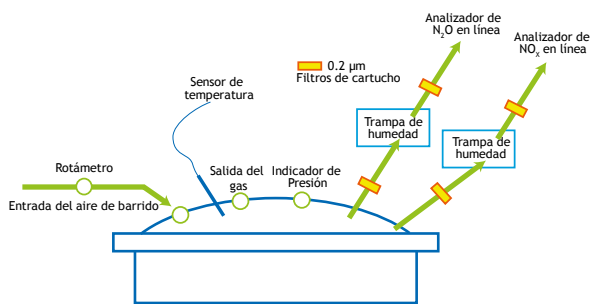


Figura 4.3 Esquema de la configuración de una cámara de flujo para las mediciones de flujos de gases.

Durante el transcurso del muestreo de la fase gaseosa, las muestras de la fase líquida se recogen en un punto cercano a la campana. Las muestras deben ser filtradas inmediatamente después de su recolección y analizarse por el personal de la planta para determinar la concentración de amoníaco, nitrito y nitrato, utilizando

métodos fácilmente disponibles en el lugar (como por ejemplo, métodos analíticos portátiles). Como el objetivo primario de estas mediciones es conocer la presencia de las diferentes especies de nitrógeno, sin tener en cuenta la precisión de las mediciones de su concentración, para mediciones preliminares podrá utilizarse el método de campo más sencillo de que se disponga.

### 4.5.1.3 Métodos de muestreo de emisiones de gases de nitrógeno de efecto invernadero

#### Método de muestreo de la fase gaseosa en zonas aerobias

1. Sellar todas las salidas de la cámara de flujo, excepto una, y conectar un manómetro de alta sensibilidad en la abertura restante.
2. Descender la cámara de flujo en la zona aerobia (el borde de la parte inferior de la cámara debe quedar debajo de la superficie del agua por 2.5-5.0 cm como mínimo).
3. Esperar a que el analizador de  $N_2O$  se equilibre, basados en el indicador de estabilidad ( $<0.03$ ).
4. Extraer la cámara de flujo de la superficie del agua. Abrir dos respiraderos y conectar el analizador de gas. Las otras aberturas deben dejarse abiertas a la atmósfera.
5. Registrar la temperatura del gas contenido en la cámara de flujo usando un medidor de temperatura digital (Fisher Scientific número 15-077-8 o una alternativa adecuada).
6. Se debe tener cuidado de que el flujo que fluye entre los dos analizadores no exceda el caudal de gas de la cámara de flujo. De lo contrario, será aspirado el aire atmosférico a través de las aberturas en la cámara de flujo.

#### Determinación del caudal de gas de la cámara de flujo en zonas aerobias

1. Desconectar los analizadores de gas y conectar un respiradero de salida a la línea de entrada de un cromatógrafo de gases portátil o de campo equipado con un detector de conductividad térmica. Cerrar el otro respiradero.
2. Introducir el gas trazador (10% de helio, 90% de aire cero) en la cámara de flujo a través de una entrada de aire, a un caudal conocido (por ejemplo  $1 \text{ L min}^{-1}$ ).
3. Medir la concentración de gas de helio que sale de la cámara de flujo (vea el protocolo en la Sección 4.6).
4. Basándose en las concentraciones de helio medidas, calcular el caudal del gas en el espacio superior del

tanque de aireación que ingresa en la cámara de flujo (Ec. 4.1, Sección 4.6).

#### Método de muestreo de fase gaseosa en zonas anóxicas

1. Sellar todas las salidas de la cámara de flujo, excepto una, y conecte un manómetro de alta sensibilidad en la abertura abierta.
2. Descender la cámara de flujo a la superficie del líquido en la zona anóxica, con un mínimo de 1-2 pulgadas de inmersión.
3. Esperar a que el analizador de  $N_2O$  se equilibre, teniendo en cuenta los valores del indicador de estabilidad ( $<0.03$ ).
4. Extraer la cámara de flujo de la superficie del agua. Abrir dos conductos de ventilación y conectar el analizador de gas y la bomba de gas de barrido (Nota: el gas de barrido sólo se utiliza durante el muestreo en zonas anóxicas). Las otras aberturas deben dejarse abiertas a la atmósfera.
5. Registrar la temperatura del gas en la cámara de flujo usando un medidor de temperatura digital (por ejemplo, el Fisher Scientific número 15-077-8 o una alternativa adecuada).
6. Se debe tener cuidado de no permitir que el flujo que fluye a los dos analizadores exceda la velocidad del gas de barrido, o el aire de dilución será aspirado a través de una abertura en la cámara.

#### Determinación del flujo de gas en la cámara de flujo en la zona anóxica

1. Desconectar los analizadores de gas y conectar un respiradero de salida a la línea de entrada de un cromatógrafo de gas equipado con un detector de conductividad térmica. Cerrar el otro respiradero.
2. Introducir el gas de barrido en la cámara a un caudal de  $4 \text{ L min}^{-1}$  y esperar 6 min para que alcance estado estacionario.
3. Introducir un gas trazador (10% de He, 90% de aire cero) a través de una entrada de aire en la cámara de flujo, a un caudal conocido (por ejemplo  $1 \text{ L min}^{-1}$ ).
4. Medir la concentración de gas He que sale de la cámara de flujo.
5. Sobre la base de las concentraciones medidas de He, calcular el flujo del gas que ingresa en la cámara de flujo, procedente del espacio superior del tanque de aireación (Ec. 4.1, Sección 4.6).

La Tabla 4.6 resume la lista de parámetros que se requieren para la configuración y operación de la cámara de flujo. Se pueden añadir parámetros adicionales según sean los casos específicos.

**Tabla 4.6** Lista de parámetros requeridos para la configuración y operación de la cámara de flujo para su empleo en campo.

Medición	Lugar 1 de muestreo	Lugar 2 de muestreo	Lugar 3 de muestreo
Presión en cámara de flujo			
Velocidad de flujo de gas desde cámara de flujo			
Temp. del gas en cámara de flujo			
Temp. del agua residual			
Velocidad de flujo de bomba de aire			

#### Medición del gas de manera continua y en tiempo real

1. Encender la alimentación presionando el interruptor de encendido/apagado en el panel. La pantalla se encenderá y el LED verde (de la muestra) parpadeará, indicando que el instrumento ha entrado en la condición o modo HOLD-OFF (APAGADO-ESPERA). La modalidad de muestreo puede indicarse inmediatamente pulsando el botón EXIT (SALIDA) en el panel frontal. La luz roja de "advertencia" también se encenderá mientras que los flujos, las temperaturas y los voltajes estén dentro de los límites de operación. Borrar los mensajes de fallo o error. Después del calentamiento, revisar los valores de la función TEST (ENSAYO O PRUEBA) en la pantalla del panel presionando el botón TEST (ENSAYO) a la izquierda de la pantalla.
2. Activar el software (programa) de adquisición de datos DAS y ajuste la frecuencia de muestreo a 1 muestra por minuto.
3. Iniciar la adquisición de datos.
4. Conectar firmemente el tubo de entrada del analizador a la tubería de salida del SEIFC utilizando un conector de conexión de compresión estándar de 1/4".
5. Adquirir datos durante unos 20 minutos en zonas anóxicas y unos 10 minutos en zonas aerobias

- después de obtener lecturas estables, como lo indica el indicador de estabilidad en el analizador de  $N_2O$ .
6. Detener el software DAS y guardar inmediatamente los datos adquiridos.
  7. Repetir los pasos 2 a 5 para cada punto de muestreo en los diferentes lugares de muestreo (tanques individuales).
  8. Tener en cuenta que el intervalo de medición es de 0-1000 ppm.
  9. Antes de cada prueba de muestreo, calibrar el instrumento utilizando "gas cero" y gas  $N_2O$  estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Principios o esquemas para medición de $N_2O$ y $CH_4$ en tiempo real

Las mediciones continuas de  $N_2O$  y  $CH_4$  se realizan a través de la correlación filtro de gas-infrarrojo (IR), que se basa en la absorción a longitudes de onda apropiadas, de la radiación IR por moléculas de  $N_2O$  y  $CH_4$ . Como parte del proceso de medición, se genera un haz IR de amplia longitud de onda dentro del instrumento y se pasa a través de una rueda giratoria de filtro de gas, lo que hace que el haz pase alternativamente a través de una celda de gas llena de nitrógeno (una celda de medición), y otra con una mezcla de  $N_2O/N_2$  (celda de referencia) a una frecuencia de 30 ciclos por segundo. Las concentraciones de  $N_2O$  se deducen basándose en la cantidad de absorción de IR. En última instancia, el haz 'descompuesto' incide sobre el detector, que es un foto-conductor en estado sólido enfriado termo-eléctricamente. Este detector, junto con su preamplificador, convierte la señal luminosa en una señal de tensión modulada.

#### 4.5.1.4 Medición directa del contenido de $N_2O$ en la fase líquida

1. Extraer de los reactores de ensayo una muestra de aproximadamente 20 mL en tubos de centrífuga cónicos de 50 ml o alternativamente recipientes similares (se aceptan recipientes de plástico o de vidrio).
2. Extraer el microsensor de la cámara de calibración (que contiene agua des-ionizada), enjuagar con agua des-ionizada y secar con un paño.
3. Sumergir el microsensor en las muestras. Después de obtener la muestra proceda con la mayor rapidez posible.

4. Registrar los números de la pantalla en el picoamperímetro. Los números de medición deben estabilizarse en un minuto.
5. Extraer el microsensor, enjuagarlo o y colocarlo en la cámara de calibración.
6. Repetir los pasos 1 al 5 para cada punto de muestreo y ubicación.

El esfuerzo de muestreo debe coordinarse estrechamente entre todos los participantes. Los datos en tiempo real de los analizadores o sondas deben descargarse automáticamente en un ordenador o grabarse en libros de laboratorio. Todos los datos electrónicos deben ser revisados frecuentemente, y cuando sea factible ser almacenados en una unidad de disco temporal durante los eventos de pruebas de campo (además de la unidad de disco duro del PC).

## 4.6 MEDICIÓN DE FLUJO DE GASES EMITIDOS EN TANQUES ABIERTOS

Esta sección describe un protocolo para la medición de los flujos de las emisiones de gases mediante el empleo de un gas trazador como el helio (según el método D1946 de ASTM). Tanto para la medición y reporte de emisiones como para la estimación de balances de masas, se requiere medir las concentraciones y los flujos totales de gases. Mientras que las concentraciones de  $N_2O$  y  $CH_4$  gaseosas en la superficie se pueden medir en línea, frecuentemente no es práctico realizar mediciones del flujo advectivo de gas en línea o incluso discretas durante todo el día. A pesar de que los datos operacionales de un soplador pueden usarse para estimar el flujo advectivo, usualmente solo se miden el tiempo de operación y el consumo de electricidad, lo que produce una incertidumbre considerable. Además, este enfoque contiene otras incertidumbres al relacionar el flujo global de aire del soplador y la distribución real en las diferentes zonas aireadas. Una mejor opción es la medición directa del flujo de gas en las tuberías de aireación. En tanques cerrados, frecuentemente se puede medir el flujo de las emisiones de gases. Para tanques abiertos se puede usar un método de trazador de helio, aunque no de manera continua debido a problemas asociados al costo y de accesibilidad a la planta. En este punto, la única manera de superar esta limitación en sistemas abiertos y de reducir la variabilidad inherente de extrapolar los datos de flujo obtenidos con unas pocas mediciones discretas a mediciones continuas,



es medir el flujo advectivo con mayor frecuencia usando el método de trazador de He y emplear un análisis de correlación para transformar las mediciones discretas de la cámara de flujo a valores de mediciones continuas.

#### 4.6.1 Protocolo para zona aerobia o aireada

El flujo de gas a través de la cámara de flujo ( $Q_{\text{emisión}}$ ) en zonas aireadas se mide usando una modificación del método ASTM D1946. En la cámara de flujo se introduce de manera rápida, un gas trazador que consta de 100 000 ppmv ( $C_{\text{helio-trazador}}$ ) de helio a un caudal conocido,  $Q_{\text{trazador}}$  (Ec. 4.2). Las concentraciones de helio en las emisiones de gases de la cámara de flujo ( $C_{\text{helio-FC}}$ ) pueden medirse usando un cromatógrafo de gases de campo equipado con un detector de conductividad térmica (GC-TCD). La emisión  $Q_{\text{emisión}}$  puede ser calculada usando la ecuación 4.1.

##### Pasos del protocolo

1. Activar el cromatógrafo de gases (CG) de campo un breve instante antes de las mediciones reales de helio, para permitir que el detector de conductividad térmica (TCD) y la columna de CG alcancen las temperaturas deseadas.
2. Después de medir las concentraciones en fase gaseosa, desconectar los analizadores de gas y conectar un respiradero de salida a la línea de entrada del CG. Cerrar el otro respiradero.
3. Introducir gas trazador (10% de helio, 90% de aire cero) a través de un respiradero de entrada en la cámara de flujo a un caudal conocido (por ejemplo 1 L min<sup>-1</sup>).
4. Medir la concentración de gas de helio que sale de la cámara de flujo (según el método ASTM D1946).
5. Sobre la base de las concentraciones de helio medidas, calcular el caudal del gas que entra en la cámara de flujo, procedente del espacio libre superior del tanque de aireación (Ec. 4.1).

$$Q_{\text{trazador}} \cdot C_{\text{helio-trazador}} = (Q_{\text{trazador}} + Q_{\text{emisión}}) \cdot C_{\text{helio-GC}}$$

$$Q_{\text{emisión}} = \frac{Q_{\text{trazador}} \cdot (C_{\text{helio-trazador}} - C_{\text{helio-GC}})}{C_{\text{helio-GC}}}$$

Ec. 4.1

6. Repetir los pasos del 1 al 5 al menos tres veces para cada lugar de muestreo.

#### 4.6.2 Protocolo para zonas no aireadas

Para medir el caudal de emisiones procedentes de zonas no aireadas la única modificación al protocolo es la introducción del gas de barrido (aire) o gas portador a un caudal conocido ( $Q_{\text{barrido}}$ ), además del gas trazador de helio a través de la cámara de flujo. La correspondiente emisión  $Q$  se calcula usando la Ecuación 4.2. Se necesita el suministro de gas de barrido para promover la mezcla del contenido de SEIFC, debido al bajo flujo de gas advectivo desde el espacio libre superior de la zona anóxica. Siempre deben medirse y comprobarse las concentraciones de  $N_2O$  y  $CH_4$  en el aire de barrido para asegurar que permanezcan por debajo de los límites de detección de los analizadores de  $N_2O$  o  $CH_4$ .

##### Pasos del protocolo

1. La única modificación del protocolo para adaptarlo para medir el flujo de emisiones de la zona anóxica es la introducción del gas de barrido.
2. Introducir el gas de barrido en la cámara a un caudal de 4 L min<sup>-1</sup> y esperar 6 min para alcanzar el estado estacionario.
3. Seguir los pasos 2-6 como se describió anteriormente para la determinación del caudal de emisión de las zonas aerobias.
4. Calcular el flujo de emisión de la zona anóxica usando la ecuación 4.2.

$$Q_{\text{trazador}} \cdot C_{\text{helio-trazador}} = (Q_{\text{trazador}} + Q_{\text{barrido}} + Q_{\text{emisión}}) \cdot C_{\text{helio-GC}}$$

$$Q_{\text{emisión}} = \frac{Q_{\text{trazador}} \cdot (C_{\text{helio-trazador}} - C_{\text{helio-GC}})}{C_{\text{helio-GC}}} - Q_{\text{barrido}}$$

Ec. 4.2

Cada campaña de muestreo consiste en mediciones discretas y continuas de  $N_2O$ . Durante las mediciones de  $N_2O$  discretas, se debe determinar la  $Q_{\text{emisión}}$  en cada lugar de la planta de tratamiento donde se mida el  $N_2O$ . Durante las mediciones continuas de  $N_2O$ , la  $Q_{\text{emisión}}$  debe determinarse varias veces al día en correspondencia con las mediciones en la fase líquida.

En el caso de los tanques con aireación superficial en el que se miden los caudales reales de gas, los flujos reales de GEI son normalmente una tarea aún más difícil. En estos casos, las emisiones se pueden estimar mejor a partir de mediciones en la fase líquida y de balances en la fase líquida.

## 4.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE N<sub>2</sub>O Y CH<sub>4</sub> EN EL MEDIO ACUOSO

Las concentraciones acuosas de óxido nitroso pueden medirse directamente mediante electrodos de oxígeno que se polarizan de manera diferente que para la medición de oxígeno. Para condiciones anaerobias o anóxicas estrictas (es decir, en ausencia de oxígeno), estos electrodos, pueden ser utilizados directamente una vez adaptados. Para medir las concentraciones de N<sub>2</sub>O en una fase acuosa aerobia puede aplicarse de manera exitosa un sensor tipo Clark miniaturizado con una referencia interna y un cátodo de protección (Foley *et al.*, 2010). El sensor está equipado con una protección contra oxígeno para evitar que este último gas interfiera con las mediciones de N<sub>2</sub>O. Este método se describe en la Sección 4.7.1. Para el metano no se dispone de medición de la fase gaseosa disuelta.

Las concentraciones de N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> en una muestra líquida pueden determinarse expulsando el gas disuelto hacia la fase gaseosa. En una muestra simple esto se puede hacer enriqueciendo artificialmente los gases en el espacio superior del tubo que contiene la muestra (mediante el incremento de la salinidad), y analizando la fase gaseosa en un CG (Sección 4.7.3). Con un dispositivo de extracción de gas es posible dar seguimiento continuamente a las concentraciones de gases disueltos (Sección 4.7.4).

### 4.7.1 Protocolo para la medición de N<sub>2</sub>O disuelto usando electrodos polarográficos

#### 4.7.1.1 Equipo

1. Microsensor de óxido nitroso N2O25 (Unisense, Aarhus, Dinamarca).
2. Picoamétrico de dos canales PA2000 (Unisense, Aarhus, Dinamarca).
3. Cámara de calibración CAL300 (Unisense, Aarhus, Dinamarca).
4. Gas aire cero y estándar de N<sub>2</sub>O (Tech Air, White Plains, NY).
5. Tubería de Teflon®, tubos de silicona y accesorios.
6. Agua des-ionizada.
7. Paño para secar.
8. Tubos para centrifugación tipo BD Falcon de 50 mL.

#### 4.7.1.2 Procedimiento experimental

El microsensor de óxido nitroso Unisense es un sensor de tipo Clark miniaturizado con una referencia interna y un cátodo de protección. Además, el sensor está equipado con una protección contra el oxígeno, que evita que el oxígeno interfiera con las mediciones de óxido nitroso. El sensor se conecta a un picoamperímetro de alta sensibilidad y el cátodo está polarizado contra la referencia interna. Impulsado por la presión parcial externa, el óxido nitroso medio penetrará a través de las membranas del sensor y se reducirá en la superficie del cátodo metálico. El picoamperímetro convierte la corriente de reducción resultante en una señal. El cátodo de protección interna también se polariza y recoge el oxígeno del electrolito, minimizando así el tiempo de corriente cero y de pre-polarización.

Los pasos para la medición son los siguientes:

- a. Encender el interruptor situado en el panel frontal del picoamperímetro.
- b. Comprobar que el tornillo “ganancia” (“Gain”) del Canal 1 esté completamente girado hacia la izquierda (en contra de las manecillas del reloj).
- c. Girar el interruptor de la pantalla, situado en el centro del panel, a 'Señal 1' y comprobar que la pantalla muestre 'cero'. En caso contrario, ajustar el compensador (offset), según las instrucciones del fabricante.
- d. Girar el interruptor de la pantalla a 'Pol. 1'. Comprobar si la tensión de polarización muestra -0.8 V. Si no es así, ajustar el interruptor de voltaje y polaridad.
- e. Conectar los conductores del microsensor "polarizado previamente" al medidor en el siguiente orden: (1) Cable de señal (negro) a 'Entrada' del Canal 1 en el panel frontal. (2) Cable de protección (amarillo) a 'Guard' del canal 1.
- f. Enjuagar el sensor con agua des-ionizada y absorber la humedad con papel de seda.
- g. Colocar el sensor en la cámara de calibración, que contiene agua des-ionizada.
- h. Seleccionar el ajuste 'Normal' para el interruptor 'Modo' en el panel frontal, a menos que necesite una respuesta extremadamente rápida.
- i. Seleccionar el intervalo de medición apropiado usando el interruptor “Intervalo” (“Range”) en el panel. Normalmente se selecciona 200 pA, pero si

- no es adecuado, seleccionar un intervalo alternativo disponible.
- j. Retirar aproximadamente 20 mL de muestra de los reactores de ensayo en tubos cónicos de centrífuga de 50 mL o alternativamente recipientes similares (es posible que sean recipientes de plástico o de vidrio).
  - k. Extraer el microsensor de la cámara de calibración (que contiene agua des-ionizada), enjuagar con agua des-ionizada y secar con un paño.
  - l. Sumergir el microsensor en las muestras. Para (j) y (k), proceder lo más rápidamente posible después de recibir la muestra.
  - m. Registrar los números de la pantalla en el picoamperímetro. Los números de medición deben ser estables en un minuto.
  - n. Extraer el microsensor, enjuagar y colocar en la cámara de calibración.
  - o. Repetir los pasos (j) a (n) para cada punto de muestreo y ubicación.
  - p. Cuando las mediciones estén completas, desconectar los cables del sensor en el orden inverso al que fueron conectados.

El intervalo de medición es ajustable, 0-0.616 ppmv- $N_2O$  (con un estándar de 500 ppm de gas  $N_2O$ ).

Si el sensor es nuevo o no se ha accionado durante varios días, debe ser polarizado durante al menos 2 horas y hasta 12 horas antes de que pueda ser calibrado y/o utilizado, de la siguiente manera:

- a. Asegurar que el sensor de óxido nitroso esté sumergido en agua libre de óxido nitroso.
- b. Girar el interruptor de la pantalla a 'Pol. 1' y ajustar la polarización a -1.30 V.
- c. Girar el interruptor de la pantalla a 'Señal 1' y ajustar el tornillo 'Gain' completamente hacia la izquierda. Ajustar la pantalla a cero en el dial 'Offset', si es necesario.
- d. Conectar el cable de señal (negro) del microsensor a la terminal "entrada" ('Input').
- e. Después de 5 min, ajustar la polarización a -0.8 V y luego conectar el cable de protección (amarillo) al terminal 'Guard'.
- f. Pre-polarizar durante 12 h (si es posible) para obtener la máxima estabilidad.

Después que el sensor ha sido polarizado, debe calibrarse con aire cero y con estándares de gas  $N_2O$ .

Normalmente, se utilizan para la calibración estándares de gas  $N_2O$  de 500 ppm. Tenga en cuenta que los estándares de gas  $N_2O$  son artículos especializados y pueden comprarse a vendedores como TechAir.

Para ser consistentes en términos de unidades para  $N_2O$  en fase líquida y en fase gaseosa, los resultados de este estudio se expresan en términos de  $N_2O$ . Alternativamente, las concentraciones de  $N_2O$  en fase líquida y en fase gaseosa también pueden expresarse como 'N' para estimar la fracción de nitrógeno afluente descargado como  $N_2O$ .

#### 4.7.2 Protocolo para la medición de gases disueltos mediante el empleo de cromatografía gaseosa

Tanto el óxido nitroso como el metano pueden analizarse fácilmente por cromatografía de gases (Weiss, 1981). Para las muestras líquidas, esto puede realizarse tomando una muestra y transfiriéndola directamente a una botella o tubo cerrado de volumen conocido. En la botella se establecerá un equilibrio de los compuestos volátiles, entre la fase gaseosa y la líquida. Una vez establecido el equilibrio, puede medirse la concentración en la fase gaseosa. Con el coeficiente de Henry (corregido para la temperatura y la fuerza iónica) se puede calcular la concentración de metano o el óxido nitroso en el líquido. Con el uso de estas concentraciones y los volúmenes conocidos de gas y líquido de la botella de muestra, puede conocerse la masa total del compuesto en la botella y la concentración original en la muestra. Este método es propenso a muchas mediciones e incertidumbres, como por ejemplo el valor verdadero del coeficiente de Henry para la composición del fluido real.

Por lo tanto, es más fiable llevar todos los gases solubles a la fase gaseosa incrementando artificialmente la concentración. Esto ha sido descrito en detalle por Daelman *et al.* (2012) basado en el método de incremento artificial de la concentración en la fase gaseosa mediante la disminución de la solubilidad por incremento de la salinidad de la fase líquida, descrito por Gal'chenko *et al.*, (2004). El protocolo de medición se describe a continuación.

### 4.7.3 Protocolo de medición de gases disueltos mediante el método de salinización

Antes del inicio de cada ronda de muestreo, botellas de suero de 120 mL se llenan con 20 g de NaCl. En los diferentes puntos de muestreo en la PTAR, las muestras se recogen con un vaso de muestreo. A partir de este vaso, se añaden 50 mL de la muestra cuidadosamente a una botella de suero llena de sal, usando una jeringa con una punta de catéter y un tubo de silicona de 10 cm. Mientras se vierte la jeringa dentro de la botella, el tubo de silicón se mantiene bajo la superficie del líquido con el fin de mantener la interfase gas-líquido tan pequeña como sea posible para evitar la evacuación de los gases de la fase líquida a la atmósfera. Inmediatamente después de añadir el contenido de la jeringa, se sella la botella con un tapón de goma y una tapa de aluminio. La botella sellada se agita vigorosamente para acelerar la disolución de la sal. A 20°C, la solubilidad de NaCl en agua es aproximadamente de 360 g L<sup>-1</sup>, por lo que estas muestras, que contienen 400 g de NaCl L<sup>-1</sup>, están sobresaturadas. Como consecuencia de la alta concentración de sales, se detiene la actividad microbiana en las muestras de lodo y escapan de la fase líquida los gases disueltos. El metano disuelto, y los otros gases disueltos tales como el dióxido de carbono escapan de la fase líquida al espacio superior de las botellas de suero. Esto produce una acumulación de gases y aumento de presión en el espacio superior. Antes de muestrear en la fase gaseosa del espacio superior de las botellas para analizar con cromatografía de gases (CG), la presión necesita equilibrarse con la presión atmosférica, permitiendo que el gas en el espacio libre superior se expanda en una jeringa sumergida graduada. El aumento del volumen de gas se utiliza para calcular la acumulación de presión en el espacio libre superior. Después que la presión del gas en el espacio libre se lleva a presión atmosférica, el espacio libre se muestrea con una jeringa de gas y se analiza según el procedimiento convencional, por cromatografía de gases. La cantidad de metano en el espacio superior antes de la expansión se calcula a partir de la concentración, el volumen medido del espacio superior de la botella sellada y la presión del espacio libre después del incremento de presión que se calcula a partir de la expansión de volumen del espacio superior. Antes de saturar la muestra con sal, esta cantidad de metano, en la fase gaseosa, debió haberse disuelto completamente en la muestra líquida. Al dividir esta cantidad por el volumen

de muestra (50 mL), se puede establecer la concentración original de metano en el líquido.

#### 4.7.3.1 Equipo

El equipo necesario para el desarrollo de este protocolo es el siguiente:

- Vaso de muestreo.
- Jeringa graduada con una punta de catéter y un tubo de ca. 15 cm.
- Botella de suero de ca. 120 mL.
- Tapón de goma.
- Sello de aluminio.
- Rizador para sellos de aluminio.
- 20 g de NaCl.
- Vaso de precipitados.
- Jeringa graduada (o bureta) con punta de catéter y sin émbolo.
- Tubo de 30 cm.
- Aguja hipodérmica.

#### 4.7.3.2 Procedimiento de muestreo

- Antes de comenzar el muestreo, añadir 20 g de NaCl a la botella de suero.
- Tomar una muestra de la superficie del líquido del reactor o de la válvula de un tubo usando un vaso de precipitados
- Introducir 50 mL ( $V_{\text{muestra}}$ ) de la muestra del vaso de muestreo en la jeringa con la punta y el tubo del catéter.
- Vertir el contenido de la jeringa en la botella de suero, manteniendo el extremo del tubo por bajo del nivel de la superficie del líquido.
- Sellar la botella de suero con el tapón de goma y el sello de aluminio.
- Agitar la botella vigorosamente.

#### 4.7.3.3 Procedimiento de medición

##### Medición de la expansión de volumen debido al incremento de presión en la botella

- a. Colocar la jeringa graduada (o bureta) en un vaso de precipitados con agua.
- b. Conectar la jeringa graduada (o bureta) con la punta del catéter a la aguja con un tubo.
- c. Asegurar que el extremo abierto de la jeringa esté sumergido en el agua del vaso de precipitado.
- d. Registrar el volumen del espacio superior en la jeringa  $V_0$ .

- e. Perforar el tapón de goma de la botella de suero con la aguja conectada a la jeringa (Figura 4.4).
  - f. El volumen del espacio superior de la jeringa se expandirá.
  - g. Llevar el nivel de agua en la jeringa hasta el nivel del agua en el vaso para anular la presión de la columna de agua.
  - h. Registrar el nuevo volumen del espacio superior en la jeringa  $V_1$ .
  - i.  $V_1 - V_0 = V_s$  donde  $V_s$  es la expansión de volumen debido al aumento de presión en la botella de suero.
- b. Marcar la parte inferior del tapón de goma.
  - c. Vaciar y enjuagar la botella.
  - d. Llenar la botella con agua limpia hasta la marca del nivel del líquido.
  - e. Registrar el peso de la botella después de realizado el paso d,  $W_0$ .
  - f. Agregar agua limpia a la botella hasta la marca del tapón.
  - g. Registrar el peso de la botella después de realizado el paso f,  $W_1$ .
  - h.  $(W_1 - W_0) \times \rho = V_{HS}$ , donde  $\rho$  es la densidad del agua y  $V_{HS}$  el volumen del espacio libre de la botella de suero.



**Figura 4.4** Medición del volumen de expansión debido al aumento de presión causado por la salinización del líquido y evacuación de los gases (foto: van Dongen, 2015).

#### Medición de la concentración de metano y óxido nítrico en el espacio libre superior

Extraer del espacio superior de la botella de suero, con una jeringa una muestra de gas y analizar con un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama (*Gas Chromatography Flame Injection Detector*, GCFID por sus siglas en inglés), según el método apropiado para medir metano.

#### Medición del espacio libre superior de la botella de suero

- a. Marcar el nivel de la muestra saturada en NaCl en la botella de suero.

#### 4.7.3.4 Cálculos

##### Volumen

$$V = V_s + V_{HS} \quad \text{Ec. 4.4}$$

Donde,  $V$  es el volumen expandido del espacio libre superior ( $m^3$ ),  $V_s$  es la expansión de volumen debido a la acumulación de presión ( $m^3$ ), y  $V_{HS}$  es el volumen libre de la botella de suero antes de la expansión ( $m^3$ ).

##### Cantidad de metano

$$n = \frac{P \cdot V}{R \cdot T} \quad \text{Ec. 4.5}$$

Donde,  $n$  es la cantidad de metano en el espacio libre expandido de la botella de suero (mol),  $P$  es la presión atmosférica (Pa),  $V$  es el volumen expandido del espacio libre ( $m^3$ ),  $R$  es la constante de los gases ideales:  $8.314 \text{ m}^3 \text{ Pa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  y  $T$  es la temperatura (K).

##### Concentración

$$C = \frac{n}{V_{\text{muestra}}} \quad \text{Ec. 4.6}$$

Donde,  $C$  es la concentración (M), ( $n$ ) es la cantidad de metano en el espacio libre expandido de la botella de suero (mol), y  $V_{\text{muestra}}$  es el volumen de la muestra (L).

#### 4.7.4 Protocolo de medición de gases disueltos por el método de evacuación

##### 4.7.4.1 Principio de funcionamiento

Este método fue publicado por primera vez por Mampaey *et al.* (2015). Mediante el uso de un dispositivo de



evacuación de gas, es posible dar seguimiento de manera continua a los gases disueltos (como por ejemplo, de N<sub>2</sub>O). Se puede calcular la concentración del gas en el líquido en un dispositivo de evacuación a partir de la concentración del gas emitido en la fase gaseosa. El

método propuesto se basa en un sistema que ayuda a expulsar o evacuar los gases de la fase líquida. El sistema consiste en un matraz de evacuación y un matraz con una trampa de espuma, como se muestra en la Figura 4.5.

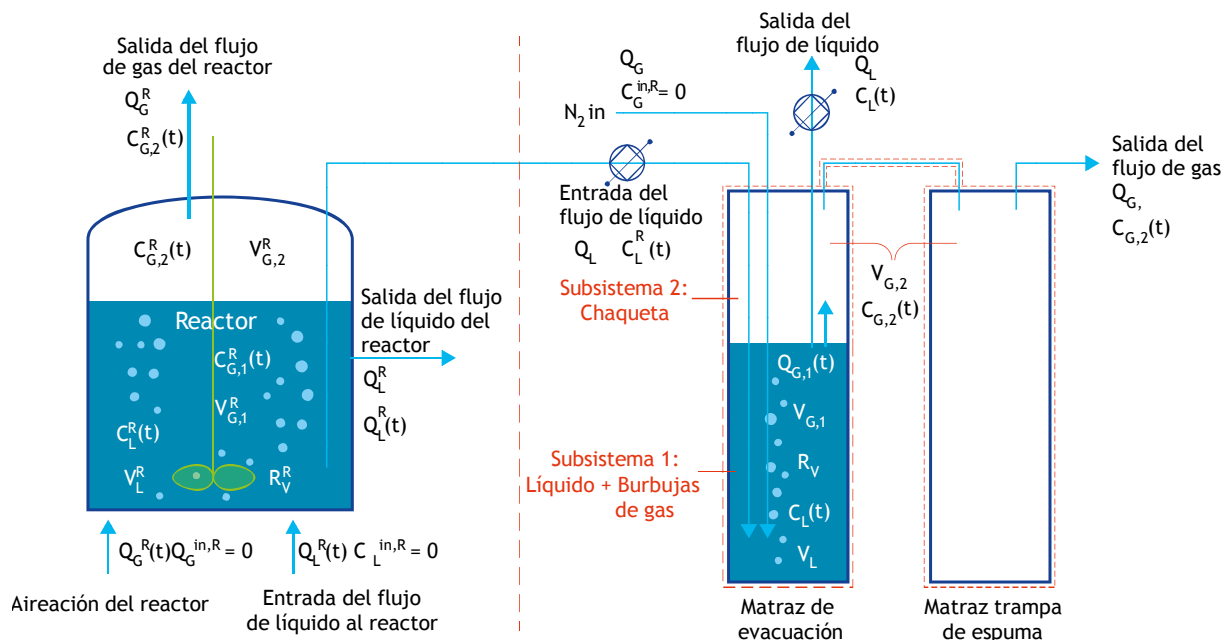


Figura 4.5 Conjunto de reactor (izquierda) y el dispositivo de evacuación (derecha) para monitorear gases disueltos (Mampaey *et al.*, 2015).

Se suministra continuamente un flujo líquido del reactor en estudio al matraz de evacuación a un flujo constante  $Q_L$ , manteniendo constante el volumen de líquido  $V_L$  en ese matraz. El matraz que sirve de trampa es una botella vacía que recoge la espuma generada y arrastrada del frasco de evacuación. Se utiliza nitrógeno como gas para expulsar o evacuar los otros gases, a través de un suministro con burbujas finas a un flujo constante  $Q_G^{in}$ . El flujo de salida de gas del dispositivo de evacuación se analiza mediante un analizador en línea en la fase gaseosa. La concentración disuelta en el reactor,  $C_L^R(t)$ , se calcula a partir de la concentración medida de gas  $C_{G,2}(t)$  de acuerdo con la Ec. 4.7.

$$C_L^R(t) = \frac{Q_G}{Q_L} \cdot \left( 1 + \frac{Q_L}{a_3 \cdot V_L} \right) \cdot C_{G,2}(t) - \frac{Q_G}{Q_L} \cdot a_1 \tag{Ec. 4.7}$$

Los parámetros  $a_1$  y  $a_3$  se determinan a partir de un ensayo de evacuación en batch. Durante este ensayo, el matraz de evacuación se llena con una muestra líquida del reactor bajo estudio de la que el N<sub>2</sub>O disuelto posteriormente es expulsado con N<sub>2</sub>. El perfil de concentraciones en la fase gaseosa  $C_{G,2}(t)$  del dispositivo de evacuación puede describirse mediante la Ec. 4.8.

$$C_{G,2}(t) = a_1 + a_2 \cdot \exp(-a_3 \cdot t) - a_4 \cdot \exp(-a_5 \cdot t) \tag{Ec. 4.8}$$

El dispositivo de evacuación del gas proporciona un método adecuado para medir indirectamente los gases disueltos (N<sub>2</sub>O u otros gases) en la fase líquida, tanto en condiciones aireadas como no aireadas, a partir de variaciones tanto en el tiempo como en el espacio. Su aplicación a un reactor intermitentemente aireado (on / off) de nitrificación parcial (SHARON) fue demostrada por

Mampaey *et al.* (2015). Castro-Barros *et al.* (2015) aplicó el método a un reactor de nitrificación-anammox parcial en una etapa, alternando la aireación alta y baja. En ambos casos, el método de balance de masas en el que se basa el método de medición de concentración de  $N_2O$  en el líquido también permitió determinar la velocidad de formación de  $N_2O$ .

#### 4.7.4.2 Equipo

El diseño detallado del dispositivo de evacuación de gas se muestra en la Figura 4.6 y consta de:

- Matraz de evacuación: un cilindro de plástico graduado de 250 ml con un difusor de gas (de acuario) y un tapón de caucho, para sellar el matraz, con cuatro conexiones (entrada del gas de evacuación, salida del gas de evacuación, entrada del líquido muestreado y salida del líquido), para sellar el matraz. El líquido se introduce en la parte inferior del matraz, junto al distribuidor de gases para una mezcla intensa. El líquido se extrae 10 cm por debajo del tapón de goma, lo que resulta en un volumen líquido constante  $V_L$  de 100 ml. Un volumen de líquido mayor tiende a aumentar la sensibilidad ( $K$ ) del dispositivo, pero disminuye la frecuencia de las mediciones (o disminuye la posibilidad de observar cambios rápidos en las concentraciones).
- Frasco trampa: una botella de 2 L para recoger cualquier espuma arrastrada.
- Bomba de muestreo de líquido: una bomba peristáltica con un tubo con un diámetro interior de 3.1 mm (tamaño de tubo Masterflex L / S = 16), que produce un caudal de líquido de  $85 \text{ ml min}^{-1}$ . Se aconseja mantener la longitud del tubo de alimentación de líquido lo más corto posible. Un mayor caudal de líquido ( $Q_L$ ) aumenta la sensibilidad del dispositivo.
- Bomba de descarga de líquido: una bomba peristáltica con un tubo con un diámetro interior de 6.4 mm (tamaño de tubo Masterflex L / S = 17), que produce un caudal de líquido de  $245 \text{ mL min}^{-1}$ .
- Gas para evacuación: El analizador requiere un flujo de gas de evacuación ( $Q_G$ ) de  $1.2 \text{ NL min}^{-1}$ . Se pueden utilizar los siguientes dos gases para la evacuación: (i) un cilindro de gas  $N_2$  equipado con un controlador de flujo de masas para controlar el flujo de gas de extracción (a  $1.2 \text{ NL min}^{-1}$ ), y (ii) el aire ambiental también se puede utilizar como gas de evacuación. Se puede utilizar una bomba de diafragma en combinación con un controlador de flujo de masas para proporcionar el caudal de gas requerido ( $1.2 \text{ NL min}^{-1}$ ).

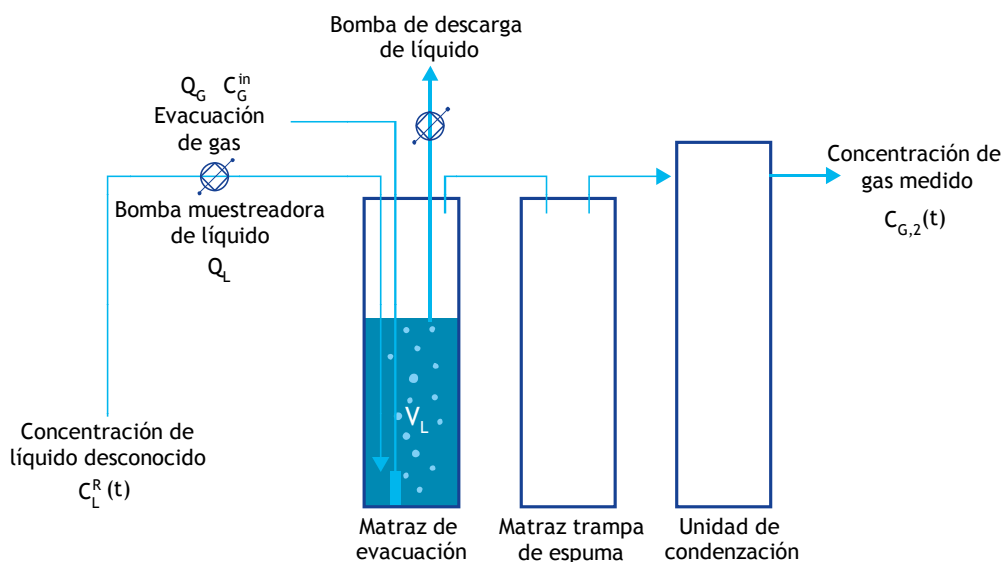


Figura 4.6 Conjunto del equipo de evacuación.

- f. Columna de condensación/unidad de secado de gas para la eliminación de la humedad del aire.
- g. Tubos: se recomienda utilizar tubos de neopreno para evitar la difusión de O<sub>2</sub>.
- h. Caja resistente a la intemperie para proteger la parte electrónica de la configuración.

La fase gaseosa se mide mediante un dispositivo de medición en fase gaseosa como el descrito en la Sección 4.5.

### 4.7.4.3 Calibración del ensayo en batch

Los parámetros a<sub>1</sub> y a<sub>3</sub> son característicos del dispositivo de evacuación y se determinan a partir de un ensayo de evacuación en batch. Durante este ensayo, el matraz de evacuación se llena con una muestra líquida del reactor estudiado (que contiene N<sub>2</sub>O disuelto), y se enjuaga con el gas de evacuación (típicamente N<sub>2</sub>). El perfil del gas al que se le hace seguimiento C<sub>G,2</sub>(t) del dispositivo de evacuación se describe a continuación mediante un perfil doble exponencial (Ec. 4.9):

$$C_{G,2}(t) = a_1 + a_2 \cdot \exp(-a_3 \cdot t) - a_4 \cdot \exp(-a_5 \cdot t) \quad \text{Ec. 4.9}$$

La Ec. 4.9 se ajusta a la medida del ensayo en batch, para obtener los valores de los coeficientes. Un ejemplo de calibración se muestra en la Figura 4.7.

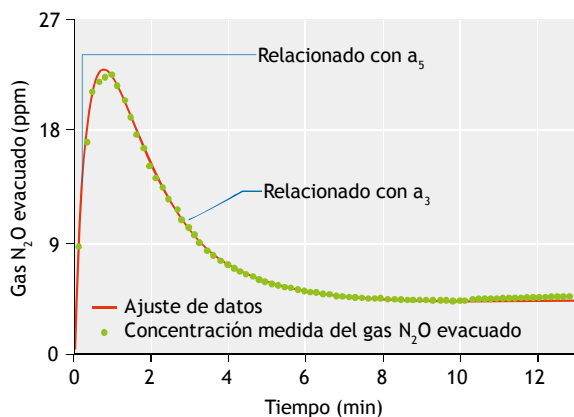


Figura 4.7 Ejemplo de ensayo de calibración en batch con ajuste de datos.

El parámetro a<sub>1</sub> está relacionado con la velocidad de conversión (de N<sub>2</sub>O) en el matraz de evacuación, la concentración en el gas de evacuación a<sub>3</sub> está relacionada con la velocidad de transferencia en la interfase en el

matraz de evacuación, y a<sub>5</sub> está relacionada con el retardo del gas por la trampa. El significado exacto de estos parámetros se puede encontrar en Mampaey *et al.* (2015).

### 4.7.4.4 Precisión de las mediciones

La sensibilidad de la configuración se puede calcular a partir de la Ec. 4.6. En la configuración actual, se consigue una precisión para C<sub>L</sub><sup>R</sup>(t) de 0.03 g N m<sup>-3</sup>. Los cambios más rápidos medibles en (C<sub>L</sub><sup>R</sup>(t)) son estimados de la Ec. 4.11, dados como una frecuencia de muestreo (f<sub>muestra</sub>).

$$K = \frac{a_3}{a_3 + D_L} \cdot \frac{Q_L}{Q_G} \quad \text{Ec. 4.10}$$

$$f_{\text{muestra}} > a_3 + D_L \quad \text{Ec. 4.11}$$

El parámetro a<sub>3</sub> es el término exponencial decreciente en la prueba de calibración en batch (Ec. 4.8), D<sub>L</sub> = Q<sub>L</sub> / V<sub>L</sub> es la relación de dilución del líquido, Q<sub>G</sub> es el flujo de evacuación del gas (1.2 NL min<sup>-1</sup>), Q<sub>L</sub> es el flujo de la muestra líquida (84 ml min<sup>-1</sup>), y V<sub>L</sub> es el volumen de líquido en el matraz de evacuación (100 mL).

### 4.7.4.5 Cálculo de la velocidad de formación de N<sub>2</sub>O en el dispositivo de evacuación

La formación de N<sub>2</sub>O puede producirse en el matraz de evacuación y se refleja en el parámetro a<sub>1</sub>. La velocidad de formación de N<sub>2</sub>O en el dispositivo de evacuación se calcula a partir de la Ec. 4.12. C<sub>G</sub><sup>in</sup> es la concentración de N<sub>2</sub>O en el gas fresco evacuado o expulsado de la fase líquida; si no hay N<sub>2</sub>O presente, C<sub>G</sub><sup>in</sup> = 0.

$$R_V = (a_1 - C_G^{\text{in}}) \cdot \frac{Q_G}{V_L} \quad \text{Ec. 4.12}$$

La velocidad de formación en el cuerpo de agua estudiado se calcula como la suma de la emisión de gases y el cambio en el N<sub>2</sub>O disuelto, a través de un balance de masa (Ec. 4.13).

$$R_V(t) = \frac{\Delta C_L^R(t)}{\Delta t} + \text{Emission} \quad \text{Ec. 4.13}$$

## 4.8 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

### 4.8.1 Determinación de flujos

El flujo neto de N<sub>2</sub>O o CH<sub>4</sub> gaseoso (kg m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) se puede calcular a partir del flujo de gas de la cámara de flujo (Q<sub>emisión</sub>, m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup>), la concentración de gas (C, kg m<sup>-3</sup>), y el área de la sección transversal del SEIFC (A, m<sup>2</sup>) (Ec. 4.14).

$$\text{Flujo} = \frac{Q_{\text{emisión}} \cdot C}{A} \quad \text{Eq. 4.14}$$

El flujo calculado debe ser corregido para reflejar la temperatura estándar (20 °C) y la presión (1 atm).

### 4.8.2 Determinación de las fracciones de emisión agregadas

Como se ha descrito anteriormente, los lugares específicos seleccionados para medir las concentraciones gaseosas y acuosas de N<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub> pueden estar cerca del extremo del afluente o el efluente de cada zona anóxica o aerobia de la PTAR o, alternativamente, en lugares donde se pudiera inferir que se producen estos dos gases (a partir de un estudio inicial de las concentraciones de las variables del proceso). Usando mediciones en estos puntos y suponiendo que estas concentraciones medidas son uniformes en una zona dada, se pueden calcular las emisiones de cualquier zona dada a partir de la siguiente manera:

Emisiones de la zona *i* en la PTAR = Emisiones de SEIFC × (Área de la zona *i*/Área de SEIFC).

Para cualquier planta, las mediciones de emisiones deben repetirse en diferentes zonas. Entonces las emisiones totales de la planta se calculan sumando las emisiones de cada una de las zonas medidas durante un período de 24 horas (como mínimo). El flujo superficial calculado a partir de la Ecuación 4.14 se traduce en el flujo de una zona dada multiplicado por el área de la zona. Para cada PTAR las fracciones de las emisiones de N<sub>2</sub>O (masa/masa) en un momento determinado se pueden calcular normalizando el flujo medido de cada zona de la instalación en función de la carga total de nitrógeno total Kjeldahl (NKT) diaria de acuerdo con la Ec. 4.15. Correspondientemente, para el metano, el flujo medido

podría normalizarse en función de la carga afluente de DQO. Las fracciones de emisión son promediadas durante el transcurso del período de muestreo diario y se reportan como el promedio ± desviación estándar para cada proceso individual muestreado.

Durante cada campaña, para complementar las mediciones de la fase gaseosa las concentraciones de las especies de nitrógeno y de DQO de las aguas residuales, incluyendo las concentraciones del afluente, biorreactor y concentraciones del efluente, se miden simultáneamente seis veces al día, según APHA *et al.* (2012). Las mediciones discretas se promediarán para estimar las fracciones de emisión descritas en la Ec. 4.15.

$$\text{Fracción de emisión} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{flujo}_i \times \text{Área}_i \text{ (kg N}_2\text{O-N)}}{\text{carga diaria entrada NKT (kg-N)}} \quad \text{Ec. 4.15}$$

Donde, flujo<sub>*i*</sub> es el flujo de emisión de N<sub>2</sub>O calculado a partir de la zona *i* (kg N<sub>2</sub>O-N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>), Área<sub>*i*</sub> es la superficie de la zona *i* (m<sup>2</sup>), *n* es el número de zonas en una instalación dada desde donde son captados los flujos de N<sub>2</sub>O, y la carga de NKT diaria de la entrada (afluente) es la carga media del afluente (flujo del afluente multiplicado por la concentración de NKT) durante el transcurso de 24 h. Debe tenerse en cuenta que los cálculos anteriores reflejan el factor de emisión calculado a partir de mediciones de N<sub>2</sub>O discretas. En las plantas donde existe una variabilidad diaria significativa, dicha variabilidad será tenida en cuenta por una combinación de medidas hechas en zonas seleccionadas y por la producción de modelos matemáticos de los flujos de N<sub>2</sub>O de las zonas restantes.

Para el metano se pueden utilizar ecuaciones virtualmente idénticas, con la única distinción de que se debe normalizar en función de las cargas totales de DQO en el afluente o, en su caso, de la velocidad de eliminación de la masa de DQO.

Como promedio, se recomienda la caracterización de aguas residuales alrededor de seis veces al día en cada lugar de muestreo de gas, así como en el afluente y el efluente del tanque. En instalaciones donde el análisis no es tan frecuente (por ejemplo, de las muestras de afluentes y efluentes), se pueden usar mediciones diarias compuestas. Alternativamente, para facilitar la caracterización de las aguas residuales, en algunas instalaciones también se pueden usar dispositivos en

línea (para medir pH, OD, potencial de oxidación-reducción (REDOX) y especies de N seleccionadas, incluyendo  $\text{N-NH}_4^+$  y  $\text{N-NO}_3^-$ ) en diferentes lugares del tanque de lodo activado.

### 4.8.3 Cálculo de los factores de emisión

Para comparar directamente los resultados de las campañas de monitoreo de gases con valores sugeridos por la EPA y el IPCC, resulta necesario resumir los resultados de la campaña de monitoreo en términos de factores de emisión. Tales factores pueden calcularse normalizando el flujo total de  $\text{N}_2\text{O}$  o  $\text{CH}_4$  del reactor al

del flujo del equivalente poblacional (100 gal hab<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, o su equivalente, 378.5 L hab<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, en los EE.UU., EPA de EE.UU., 2012). Los flujos de emisiones resultantes se expresan en unidades consistentes con el informe de inventario de la EPA de EE.UU. (g  $\text{N}_2\text{O}$  o  $\text{CH}_4$  hab<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (US EPA, 2012). A pesar de que la variabilidad dinámica de las emisiones de gases de las PTAR hace que el uso de factores de emisión puntuales (como los presentados por la EPA y el IPCC) sea algo limitado, la etapa adicional de calcular los factores de emisión podría ser útil para una comparación de las emisiones estimadas y las que se miden realmente.

## Referencias

- Ahn, J.-H., Kim, S., Pagilla, K., Katehis, D., and Chandran, K. (2010a). Spatial and temporal variability in  $\text{N}_2\text{O}$  generation and emission from full-scale BNR and non-BNR processes. *Water Environment Research*. 82: 2362-2372.
- Ahn, J. H., Kim, S., Park, H., Rahm, B., Pagilla, K., and Chandran, K. (2010b).  $\text{N}_2\text{O}$  Emissions from Activated Sludge Processes, 2008-2009: Results of a National Monitoring Survey in the United States. *Environmental Science & Technology*. 44: 4505-4511.
- APHA, AWWA and WEF, (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22<sup>nd</sup> edition. Eaton, A.D., Clesceri, L.S., and Greenberg, A.E. (eds.) Washington DC.
- Castro-Barros C.M., Daelman, M.R.J., Mampaey, K.E., van Loosdrecht M.C.M., Volcke, E.I.P. (2015). Effect of aeration regime on  $\text{N}_2\text{O}$  emission from partial nitrification-anammox in a full-scale granular sludge reactor. *Water Res.* 68: 793-803.
- Daelman, M.R.J., van Voorthuizen E.M., van Dongen, U.G.J.M., Volcke, E.I.P., and van Loosdrecht M.C.M., (2012). Methane emission during municipal wastewater treatment. *Water Res.* 46: 3657-3670.
- Daelman, M.R., de Baets, B., van Loosdrecht, M.C.M., and Volcke, E.I. (2013). Influence of sampling strategies on the estimated nitrous oxide emission from wastewater treatment plants. *Water Res.* 47(9): 3120-3130.
- Daelman, M., van Eynde, T., van Loosdrecht, M.C.M., Volcke, E.I.P. (2014) Effect of Process design and operating parameters on aerobic methane oxidation in municipal WWTP. *Water Res.* 66, 308-319.
- Foley, J., de Haas, D., Yuan, Z., and Lant, P. (2010). Nitrous oxide generation in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *Water Res.* 44(3): 831-844.
- Gal'chenko, V.F., Lein, A.Y., and Ivanov, M.V. (2004). Methane content in the bottom sediments and water column of the Black Sea. *Microbiology*. 73(2): 211-223.
- Gapes, D., Pratt, S., Yuan, Z., and Keller, J. (2003). Online titrimetric and off-gas analysis for examining nitrification processes in wastewater treatment. *Water Res.* 37(11): 2678-2690.
- Hellinga, C., Vanrolleghem, P., Van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (1996). The potential of off-gas analyses for monitoring wastewater treatment plants. *Water Sci Tech.* 33(1): 13-23.
- IPCC (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Chapter 8: Anthropogenic and Natural Radiative Forcing.
- Kampschreur, M.J., Tan, N.C.G., Kleerebezem, R., Picioreanu, C., Jetten M.S.M., and van Loosdrecht M.C.M. (2008a). Effect of Dynamic Process Conditions on Nitrogen Oxides Emission from a Nitrifying Culture. *Environmental Science and Technology*. 42: 429-435.
- Kampschreur, M.J., Temmink H., Kleerebezem, R., Jetten, M.S.M., and van Loosdrecht M.C.M. (2009). Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Res.* 43: 4093-4103.
- Kampschreur, M. J., van der Star W.R.L., Wielders H.A., Mulder J.W., Jetten M.S.M., and van Loosdrecht M.C.M. (2008b). Dynamics of nitric oxide and nitrous oxide emission during full-scale reject water treatment. *Water Res.* 42: 812-826.
- Kienbusch, M. (1986). Measurement of Gaseous Emissions Rates from Land Surfaces using an Emission Isolation Flux Chamber, User's Guide, EPA Users Guide. United States Environmental Protection Agency.
- Klopfenstein Jr,R. (1998). Air velocity and flow measurement using a Pitot tube. *ISA transactions*. 37(4): 257-263.
- Mampaey, K. E., van Dongen, U. G., van Loosdrecht, M.C.M., Volcke, E.I. (2015). Novel method for online monitoring of dissolved  $\text{N}_2\text{O}$  concentrations through a gas stripping device. *Environmental Technology*. 36(13): 1680-1690.
- Melcer, H. (1999). Methods for Wastewater Characterization in Activated Sludge Modelling. Water Environment Research Foundation, Alexandria, VA.
- Puig, S., van Loosdrecht, M.C.M., Colprim, J., Meijer, S.C.F. (2008). Data evaluation of full-scale wastewater treatment plants by mass balance. *Water Res.* 42(18): 4645-4655.
- Pratt, S., Yuan, Z., Gapes, D., Dorigo, M., Zeng, R.J., and Keller, J. (2003). Development of a novel titration and off-gas analysis (TOGA) sensor for study of biological processes in wastewater treatment systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 81(4): 482-495.



- Rapson, T.D., Dacres, H. (2014). Analytical techniques for measuring nitrous oxide. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 54: 65-74.
- Rieger, L., Gillot, S., Langergraber, G., Ohtsuki, T., Shaw, A., Tak, I., and Winkler, S. (2012). Guidelines for using activated sludge models. *Water Intelligence Online*, 11, 9781780401164.
- Tata, P., Witherspoon J., and Lue-Hing C. (Eds). (2003). *VOC Emissions from Wastewater Treatment Plants*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- USEPA. 2012. *Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2006*, EPA 430-R-08-005. Washington, D.C.
- Weiss, R.F. (1981). Determinations of carbon dioxide and methane by dual catalyst flame ionization chromatography and nitrous oxide by electron capture chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 19(12): 611-616.

# MANEJO DE DATOS Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS

Autores:

Gürkan Sin

Krist V. Gernaey

Revisores:

Sebastiaan C.F. Meijer

Juan A. Baeza

## 5.1 INTRODUCCIÓN

La modelación es una de las herramientas clave a disposición de los profesionales de hoy día, investigadores e ingenieros del tratamiento de aguas residuales. La modelación permite estudiar y comprender fenómenos complejos que subyacen en el rendimiento físico, químico y biológico de las plantas de tratamiento de aguas residuales a diferentes escalas temporales y espaciales.

En las plantas de tratamiento de aguas residuales a escala real (EDARs), la modelación mecanística utilizando el marco y el concepto ASM (por ejemplo Henze *et al.*, 2000) se ha convertido en una herramienta de ingeniería importante para los ingenieros de procesos, facilitando el diseño de las plantas, su operación, la optimización y el control. El uso de los modelos también se ha incrementado para ayudar a la toma de decisiones sobre problemas complejos, que incluyen la selección de procesos y/o de tecnología para la adaptación, así como la validación del control y de las estrategias de optimización (Gernaey *et al.*, 2014; Mauricio-Iglesias *et al.*, 2014; Vangsgaard *et al.*, 2014; Bozkurt *et al.*, 2015).

Los modelos también se han utilizado como parte integral para el análisis e interpretación de datos obtenidos en diversos métodos experimentales a nivel de laboratorio, así como de estudios a escala piloto para caracterizar y estudiar plantas de tratamiento de aguas residuales. En este sentido, los modelos ayudan a explicar adecuadamente varios parámetros cinéticos para diferentes grupos microbianos y sus actividades en las EDARs, mediante el uso de técnicas de estimación de parámetros. De hecho, la estimación de parámetros es una parte importante del desarrollo y aplicación de modelos (Seber y Wild, 1989; Ljung, 1999; Dochain y Vanrolleghem, 2001; Omlin y Reichert, 1999; Brun *et al.*, 2002; Sin *et al.*, 2010), y en general puede definirse de la siguiente manera:

*Dado un modelo y un conjunto de datos y/o mediciones de un sistema experimental en cuestión, la estimación de parámetros consiste en estimar todos o algunos de los parámetros del modelo utilizando un método estadístico apropiado.*

El objetivo de este capítulo es proporcionar un conjunto de herramientas y técnicas necesarias para

estimar parámetros cinéticos y estequiométricos de los procesos de tratamiento de aguas residuales, utilizando datos obtenidos a partir de pruebas experimentales de actividad en batch. Estos métodos y herramientas están destinados principalmente a aplicaciones prácticas, de consultores, ingenieros y profesionales en general. Sin embargo, también se espera que sean útiles tanto para la docencia de posgrado, así como punto de partida para los investigadores académicos que desean expandir su interés teórico en el tema. En este capítulo los modelos seleccionados para interpretar los datos experimentales, son aquellos disponibles de la literatura que se basan principalmente en el marco del Modelo de Lodos Activados (ASM, de sus siglas en inglés) y sus extensiones apropiadas (Henze *et al.*, 2000).

El capítulo brinda una visión general de los métodos más utilizados para la estimación de parámetros a partir de datos experimentales en pruebas en batch, como por ejemplo para: (i) manejo y validación de datos, (ii) estimación de parámetros: métodos de estimación de máxima verosimilitud (EMV) y de bootstrap, (iii) análisis de incertidumbre: propagación lineal de errores y método de Monte Carlo, y (iv) análisis de sensibilidad e identificación.

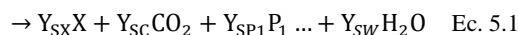
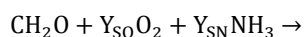
## 5.2 TEORÍA Y MÉTODOS

### 5.2.1 Manejo y validación de datos

#### 5.2.1.1 Análisis sistemático de datos para procesos biológicos

La mayoría de los procesos de lodos activados pueden estudiarse usando modelos estequiométricos simplificados de los procesos, que se basan en una descripción de "caja negra" del metabolismo celular usando datos de medición de las concentraciones de reactivos (contaminantes) y productos, por ejemplo de CO<sub>2</sub>, especies intermedias oxidadas de nitrógeno, etc. De igual manera, el Modelo de Lodos Activados (ASM) (Henze *et al.*, 2000) se basa en una descripción desde una perspectiva de caja negra de las actividades heterótrofas aerobias y anóxicas, nitrificación, hidrólisis y procesos de decaimiento de la biomasa.

Una formulación estequiométrica general del modelo del proceso que describe la conversión de sustrato a biomasa y productos metabólicos (para el metabolismo del carbono) se puede expresar como:



La Ecuación 5.1 representa, en una manera general, una simplificación de la compleja "maquinaria" metabólica de la actividad celular. Esta ecuación simplificada permite calcular los rendimientos del proceso, que incluyen: Y<sub>SO</sub> (rendimiento de oxígeno por unidad de sustrato), Y<sub>SN</sub> (rendimiento de nitrógeno por unidad de sustrato), Y<sub>SX</sub> (rendimiento de biomasa por unidad de sustrato), Y<sub>SC</sub> (rendimiento de CO<sub>2</sub> por unidad de sustrato), Y<sub>SP1</sub> (rendimiento del producto intermedio P1 por unidad de sustrato) y Y<sub>SW</sub> (rendimiento de agua por unidad de sustrato).

Los coeficientes de esta ecuación se escriben sobre la base de 1 C-mol de sustrato de carbono. Esto incluye el rendimiento de crecimiento para la biomasa, Y<sub>SX</sub>, rendimiento de consumo de sustrato (amoníaco), Y<sub>SN</sub>, rendimiento de consumo de oxígeno, Y<sub>SO</sub>, rendimiento para producción de CO<sub>2</sub>, Y<sub>SC</sub> y rendimiento para agua, Y<sub>SW</sub>. La biomasa, X, también se considera sobre la base de 1 C-mol y se supone que tiene una composición típica de CH<sub>a</sub>O<sub>b</sub>N<sub>c</sub>. La composición de biomasa se puede medir experimentalmente, siendo CH<sub>1.8</sub>O<sub>0.5</sub>N<sub>0.2</sub> un valor típico. Algunos de los rendimientos también se miden experimentalmente a partir de las relaciones observadas en el proceso, de consumo y producción de componentes, de la siguiente forma:

$$Y_{ji} = \frac{r_i}{r_j} = \frac{q_i}{q_j} \quad \text{y} \quad Y_{ji} = Y_{ij}^{-1} \quad \text{Ec. 5.2}$$

Donde, q<sub>i</sub> se refiere a la relación de conversión volumétrica o producción del componente i, es decir, la masa del componente i por unidad de volumen del reactor por unidad de tiempo (Masa i Volumen<sup>-1</sup> Tiempo<sup>-1</sup>), r<sub>i</sub> se refiere a la velocidad o tasa de reacción medida de la masa del componente i por unidad de tiempo por unidad de masa de la biomasa (Masa i Tiempo<sup>-1</sup> Masa biomasa<sup>-1</sup>) y Y<sub>ji</sub> es el rendimiento del componente i por unidad de componente j. En el caso de la biomasa, x, ésta se referiría a la velocidad específica de crecimiento μ:

$$\mu = r_x = \frac{q_x}{x} \quad \text{Ec. 5.3}$$

Una de las ventajas de utilizar esta estequiometría de proceso es que permite establecer balances elementales para C, H, N y O y asegurar que la estequiometría del proceso esté equilibrada. Para la estequiometría de proceso dada en la ecuación 5.1, se mantendrá el

siguiente balance elemental para el carbono, asumiendo que se midan todos los rendimientos relevantes:

$$C - \text{balance: } -1 + Y_{sx} + Y_{sc} + Y_{sp_i} = 0 \quad \text{Ec. 5.4}$$

De forma similar al balance de carbono, también se puede realizar el balance elemental para N, O y H. Por lo general, en los estudios de procesos biológicos se ignora el coeficiente de rendimiento para el agua,  $Y_{sw}$ , porque la producción de agua es insignificante en comparación con los altos caudales típicamente tratados en las EDARs. Por esta razón, los balances de H y O y la estequiometría del proceso al que están vinculados en aplicaciones de aguas residuales, generalmente no están cerrados. Sin embargo, el balance para el cálculo del grado de reducción en los procesos de tratamiento de aguas residuales es cerrado. En este marco se desarrolla el modelo ASM. El grado de reducción del balance es relevante ya que la mayoría de las reacciones biológicas implican reacciones de conversión química de tipo reducción-oxidación (redox) asociadas al metabolismo microbiano.

### 5.2.1.2 Análisis del grado de reducción

Un proceso biológico convertirá un sustrato, es decir, la entrada a una vía metabólica, en un producto que está en una forma reducida u oxidada con respecto al sustrato original. Para realizar el análisis redox en un proceso biológico, se requiere de un procedimiento para calcular el potencial redox de sustratos y productos. En el marco ASM y otras aplicaciones biotecnológicas (Heijnen, 1999; Villadsen *et al.*, 2011), se utiliza la siguiente metodología:

- 1) Defina un estándar para el estado redox para los elementos para los que se llevan a cabo los balances, típicamente para C, O, N, S y P.
- 2) Seleccione el  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ ,  $H_2SO_4$  y  $H_3PO_4$  como compuestos de referencia redox neutros para calcular el estado redox de los elementos O, C, N, S y P, respectivamente. Más aún, una unidad de redox se define como  $H = 1$ . Con estas definiciones, se obtienen los siguientes niveles redox de los cinco elementos indicados:  
 $O = -2$ ,  $C = 4$ ,  $N = -3$ ,  $S = 6$  y  $P = 5$ .
- 3) Calcule el nivel redox del sustrato y los productos utilizando los niveles redox estándar de los elementos. A continuación, se ofrecen varios ejemplos:
  - a) Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ):  
 $6 \cdot 4 + 12 \cdot 1 + 6 \cdot (-2) = 24$ .  
 Así, cada 1 C-mol, el nivel redox de glucosa es:

$$\gamma_g = 24/6 = 4 \text{ mol e}^- \text{ C-mol}^{-1}.$$

b) Ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ):

$$2 \cdot 4 + 4 \cdot 1 + 2 \cdot (-2) = 8.$$

Cada 1 C-mol, el nivel redox del HAC:

$$\gamma_a = 8/2 = 4 \text{ mol e}^- \text{ C-mol}^{-1}.$$

c) Ácido propiónico ( $C_3H_6O_2$ ):

$$3 \cdot 4 + 6 \cdot 1 + 2 \cdot (-2) = 14.$$

Cada 1 C-mol, el nivel redox del HPr:

$$\gamma_p = 14/3 = 4.67 \text{ mol e}^- \text{ C-mol}^{-1}.$$

d) Etanol ( $C_2H_6O$ ):

$$2 \cdot 4 + 6 \cdot 1 + 1 \cdot (-2) = 12.$$

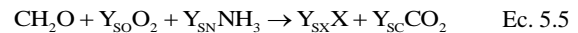
Cada 1 C-mol, el nivel redox del EtOH es:

$$\gamma_e = 12/2 = 6 \text{ mol e}^- \text{ C-mol}^{-1}.$$

- 4) Realice el balance del nivel de reducción en un proceso estequiométrico definido (ver Ejemplo 5.1).

#### Ejemplo 5.1 Balance elemental y análisis del grado o nivel de reducción para la oxidación aerobia de la glucosa

La estequiometría general del proceso de oxidación aerobia de glucosa a biomasa puede describirse como:



Asumiendo que la composición de la biomasa X es  $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$ . El grado de reducción para la biomasa se calcula asumiendo que la fuente de nitrógeno es el amoníaco (de ahí que el estado de oxidación del nitrógeno sea -3),

$$\gamma_X: 4 + 1.8 + 0.5 \cdot (-2) + 0.2 \cdot (-3) = 4.2 \text{ mol e}^- \text{ C-mol}^{-1}$$

Ahora se pueden realizar los balances del nivel de reducción del C y N para el proceso estequiométrico como sigue:

$$\text{Balance de carbono: } -1 + Y_{sx} + Y_{sc} = 0 \quad \text{Ec. 5.6}$$

$$\text{Balance de nitrógeno: } -Y_{sn} + 0.2 \cdot Y_{sx} = 0 \quad \text{Ec. 5.7}$$

Balance redox:

$$-1 \cdot \gamma_g - \gamma_{O_2} \cdot Y_{SO} - \gamma_{NH_3} \cdot Y_{SN} + \gamma_X \cdot Y_{SX} + \gamma_{CO_2} \cdot Y_{SC} = 0$$

$$-1 \cdot \gamma_g - \gamma_{O_2} \cdot Y_{SO} - 0 \cdot Y_{SN} + \gamma_X \cdot Y_{SX} + 0 \cdot Y_{SC} = 0$$

Ec. 5.8.

En estas ecuaciones de balance, hay cuatro incógnitas ( $Y_{SN}$ ,  $Y_{SO}$ ,  $Y_{SX}$ ,  $Y_{SC}$ ). Dado que existen tres ecuaciones, sólo es necesaria una medición de un valor de rendimiento para calcular todas las demás. Por ejemplo, en aplicaciones de ASM, el rendimiento de crecimiento de la biomasa se asume generalmente como un valor

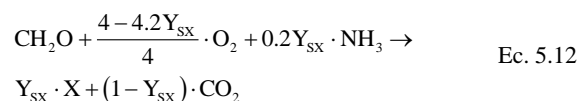
medido o conocido, por lo tanto, los otros rendimientos restantes se pueden calcular como sigue:

$$\text{Rendimiento de CO}_2: Y_{SC} = 1 - Y_{SX} \quad \text{Ec. 5.9}$$

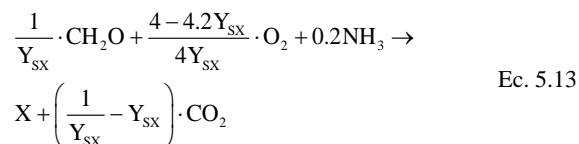
$$\text{Rendimiento de NH}_3: Y_{SN} = 0.2Y_{SX} \quad \text{Ec. 5.10}$$

$$\text{Rendimiento de O}_2: Y_{SO} = \frac{\gamma_g - \gamma_x \cdot Y_{SX}}{\gamma_{O_2}} = \frac{4 - 4.2Y_{SX}}{4} \quad \text{Ec. 5.11}$$

Con estos coeficientes conocidos, el modelo estequiométrico del proceso para 1 C-mol de consumo de glucosa puede reformularse como:



En el marco del modelo ASM, la estequiometría del proceso se calcula utilizando como referencia la producción unitaria de biomasa. Por lo tanto, los coeficientes de la Ec. 5.12 se pueden arreglar de la manera siguiente:



La conversión unitaria de C-mol a gramos sobre la base de la DQO, que es la unidad de los modelos ASM, se define utilizando el O<sub>2</sub> como compuesto de referencia. Por consiguiente, 1 g de DQO se define como -1 g de O<sub>2</sub>. A partir del nivel de reducción de oxígeno, la conversión a DQO a partir de una unidad redox (mol e) se calcula como sigue:

$$\frac{\text{Masa molecular del O}_2}{\text{Grado de Reducción del O}_2} = \frac{MM_{O_2}}{\gamma_{O_2}} = \frac{32}{4} = 8gDQOL^{-1} (mol e^{-})^{-1} \quad \text{Ec. 5.14}$$

Para convertir el C-mol a g en base a DQO, la unidad redox necesita ser multiplicada por el nivel de reducción del sustrato como se describe a continuación:

$$\left( \frac{mol e^{-}}{C - mol e^{-}} \right) \cdot \left( \frac{g DQO}{mol e^{-}} \right) = \gamma_g \cdot 8 \frac{g DQO}{C - mol} \quad \text{Ec. 5.15}$$

### 5.2.1.3 Verificación de la consistencia de los datos experimentales

La importancia de realizar balances elementales con datos recolectados de experimentos con procesos biológicos es obvia: confirmar la consistencia de los datos con la primera ley de la termodinámica, que afirma que la energía (en forma de materia, calor, etc.) se conserva. Un requisito primario y obvio para la realización de balances elementales es que el modelo es verificado y consistente. Los datos experimentales deben ser verificados para detectar errores considerables (de medición) que pueden ser causados por una incorrecta calibración o mal funcionamiento de los instrumentos, equipos y/o sensores.

La inconsistencia en los datos puede comprobarse a partir de la suma de los elementos que constituyen los sustratos consumidos en la reacción (por ejemplo, glucosa, amoníaco, oxígeno, etc.). Esto debe ser igual a la suma de los elementos (productos) producidos en la reacción (por lo tanto, véase también la Ec. 5.4 para el balance de carbono). La desviación de este balance elemental indica una incorrecta descripción del sistema, inconsistencia del modelo y/o errores de medición.

Además de los balances elementales, el balance del nivel de reducción proporciona información sobre si están incluidos todos los compuestos adecuados o si falta algún compuesto en la estequiometría del proceso. La adición de este control es útil y consistente con los principios bioenergéticos de los procesos biológicos (Roels, 1980; Heijnen, 1999; Villadsen *et al.*, 2011).

En el marco de los ASM, se incluyen los controles o chequeos de consistencia y los balances elementales (además de los balances de carga) como una matriz de conservación para verificar la consistencia interna de los coeficientes de rendimiento (Henze *et al.*, 2000).

La composición elemental y el grado de reducción pueden determinarse sistemáticamente usando la siguiente ecuación genérica de balance para probar la consistencia de los datos medidos:

$$\sum_{j=1}^N e_{sj} q_{sj} + e_x q_x + \sum_{j=1}^M e_{pj} q_{pj} = 0 \quad \text{Ec. 5.16}$$



La ecuación anterior está formulada para un proceso biológico con  $N$  sustratos y  $M$  productos metabólicos. En la ecuación,  $e$  es la composición elemental (C, H, O y N) de un componente, y  $q$  la velocidad volumétrica de producción (o consumo) de sustratos ( $q_{sj}$ ), biomasa ( $q_x$ ) y productos metabólicos ( $q_{pj}$ ). Por lo tanto, el balance elemental puede formularse de la siguiente manera:

$$E \cdot q = 0 \quad \text{Ec. 5.17}$$

En esta ecuación,  $E$  es la matriz de conservación y sus columnas se refieren a cada elemento y propiedad conservados, por ejemplo, C, H, O, N,  $\gamma$ , etc. Cada fila de la matriz  $E$  contiene valores de una propiedad conservada relacionada con sustratos, productos y biomasa;  $q$  es un vector columna que incluye las velocidades volumétricas medidas para cada compuesto, sea este sustrato, así como los productos y la biomasa.

El número total de columnas de  $E$  es el número de compuestos, que es la suma de sustratos ( $N$ ), productos ( $M$ ) y biomasa, de ahí  $N + M + 1$ . El número total de restricciones es 5 (C, H, O, N y  $\gamma$ ). Esto significa que  $N + M - 4$  es el número de grados de libertad que necesitan ser medidos o especificados para calcular todas las velocidades, tasas de reacción o relaciones.

Típicamente, no todas las velocidades o relaciones son o pueden medirse en experimentos en batch. Por lo tanto, supongamos que  $q_m$  es el conjunto de velocidades volumétricas medidas, y que  $q_u$  el conjunto de velocidades no medidas que deben calcularse. En este caso la Ec. 5.17 puede reformularse de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} E_m q_m + E_u q_u &= 0 \\ q_u &= -(E_u)^{-1} E_m q_m \end{aligned} \quad \text{Ec. 5.18}$$

Partiendo del supuesto que existe la inversa de  $E_u$  ( $\det(E_u) \neq 0$ ), la Ec. 5.18 proporciona un cálculo o estimación de las relaciones no medidas en un proceso biológico. Estas velocidades o relaciones estimadas son valiosas por sí mismas, pero también, si se dispone de réplicas, pueden utilizarse para fines de validación. Este método sistemático de verificación de la consistencia de los datos se destaca en el Ejemplo 5.2.

Todos estos cálculos ayudan a verificar y validar los datos experimentales y la medición del rendimiento del proceso. Los datos verificados se pueden utilizar para el análisis cinético y la estimación de parámetros adicionales.

## 5.2.2 Estimación de parámetros

Aquí se debe tener presente un modelo formal espacio-tiempo para describir el sistema de interés. Sea  $y$  un vector de valores resultante del modelo dinámico  $f$ , usando el vector de parámetros,  $\theta$ ; el vector de entradas,  $u$ ; y las variables de estado,  $x$ :

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= f(x, \theta, u, t); \quad x(0) = x_0 \\ y &= g(x, \theta, u, t) \end{aligned} \quad \text{Ec. 5.19}$$

La ecuación anterior describe un sistema (ya sea una configuración en batch o una EDAR completa) en términos de una ecuación diferencial ordinaria (EDO), y un sistema algebraico de ecuaciones usando un formalismo espacio-tiempo.

El enunciado del problema para la estimación de parámetros se lee de la siguiente manera: para un conjunto dado de mediciones, conociendo la imprecisiones o interferencias de las mediciones, y dada la estructura del modelo dada en la Ec. 5.19, estime los parámetros ( $\theta$ ) desconocidos del modelo.

La metodología de solución a este problema puede ser enmarcada dentro del método manual de prueba y error, y los métodos estadísticos formales.

### 5.2.2.1 El método manual de prueba o tanteo y error

Este método o procedimiento no tiene una base científica formal, sino que está dado por una motivación práctica que tiene que ver con la obtención de un buen modelo de ajuste a los datos. Funciona de la manera siguiente: el usuario elige un parámetro dentro del conjunto de parámetros del modelo y lo modifica gradualmente (lo aumenta o disminuye alrededor de su valor nominal) hasta que, con los datos originalmente medidos del parámetro y el valor supuesto, se obtiene un ajuste razonable del modelo. El mismo proceso puede ser iterado para otro parámetro. El proceso de ajuste se termina cuando el usuario considera que el ajuste del modelo a los datos es bueno. Esto frecuentemente se determina por limitaciones prácticas y/o de tiempo porque este procedimiento nunca conducirá a un ajuste óptimo del modelo a los datos medidos. Además, se pueden obtener múltiples conjuntos diferentes de valores de parámetros que pueden no tener necesariamente un significado físico. El éxito de este procedimiento depende de la experiencia del investigador para

seleccionar los parámetros apropiados, para adaptarse a ciertos aspectos de los datos medidos. Aunque este enfoque es en gran parte subjetivo y no llega a ser óptimo, el enfoque sigue siendo ampliamente utilizado en la industria, así como en el ámbito académico y de investigación. Aspectos prácticos de calidad de los datos no siempre permiten la determinación precisa de los parámetros. Además, no todas las plataformas (comerciales) de software de modelado proporcionan las rutinas estadísticas apropiadas para la estimación de los parámetros. Existen procedimientos automatizados para la calibración de modelos utilizando algoritmos tales como técnicas de muestreo estadístico, algoritmo de optimización, etc. (Sin *et al.*, 2008). Sin embargo, estos procedimientos se centran en la obtención de un buen ajuste a los datos experimentales y no necesariamente en la identificación y/o estimación de un parámetro de un conjunto de datos. Esto se debe a que esto último requiere un uso adecuado de la teoría estadística.

### 5.2.2.2 Métodos estadísticos formales

Para estos métodos, se utiliza un marco apropiado para sugerir el problema, que entonces se resuelve matemáticamente utilizando estrategias apropiadas de solución numérica, por ejemplo algoritmos de minimización o algoritmos de muestreo. Bajo esta categoría, generalmente se emplean los siguientes procedimientos estadísticos:

- Procedimientos estadísticos que toman en consideración la frecuencia de ocurrencia (máxima verosimilitud, mínimos cuadrados, regresión no lineal, etc.).
- Procedimiento estadístico Bayesiano (Metropolis-Hasting, Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), muestreo de importancia, etc.).
- Procedimiento pragmático/híbrido (empleando algunos elementos de las dos escuelas anteriores de pensamiento, por ejemplo el método bootstrap, filtración de Monte Carlo, etc.).

Los métodos estadísticos anteriores están entre los más comúnmente usados y recomendados. En particular, el presente capítulo se centrará en los métodos de frecuencia y de bootstrap, ya que son los más adecuados para el propósito de este capítulo.

#### Método de frecuencia-teoría de máxima verosimilitud

En el problema de la estimación de parámetros, usualmente se definen parámetros de estimación,  $\hat{\theta}$ , para distinguirlos de los verdaderos parámetros del modelo,  $\theta$ .

En el contexto de la estimación estadística, los parámetros del modelo se definen como desconocidos y se utilizan métodos estadísticos para inferir su valor real. Esta diferencia es sutil pero importante para entender e interpretar los resultados de la estimación de parámetros, independientemente del método utilizado.

El método de la máxima verosimilitud es un procedimiento general para encontrar valores estimados,  $\hat{\theta}$ , a partir de un conjunto dado de mediciones, ( $y$ ). En este enfoque, los parámetros ( $\theta$ ) del modelo se tratan como verdaderos valores fijos, pero sus estimados correspondientes ( $\hat{\theta}$ ) se tratan como variables aleatorias. La razón es que los estimados dependen de las mediciones, que se supone que son un proceso estocástico:

$$y = f(\theta) + \varepsilon \quad \text{donde} \quad \varepsilon \in N(0, \sigma) \quad \text{Ec. 5.20}$$

Las medidas de los errores,  $\varepsilon$ , se definen a través de una distribución de probabilidades, por ejemplo la distribución normal,  $N$ , con cero valor medio y desviación estándar ( $\sigma$ ). Con estas suposiciones, la función de verosimilitud ( $L$ ) para la estimación de parámetros es la siguiente (Seber y Wild, 1989):

$$L(y, \theta) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(y - f(\theta))^2}{2\sigma^2}\right) \quad \text{Ec. 5.21}$$

La estimación más probable de  $\theta$  se encuentra entre los valores de los parámetros que maximizan la función de verosimilitud:

$$\hat{\theta} = \min_{\theta} L(y, \theta) \quad \text{Ec. 5.22}$$

La solución a este problema (Ecuación 5.24) se encuentra a menudo en algoritmos de optimización como el simplex, de punto interior, algoritmos genéticos, etc. Los parámetros obtenidos al calcular la máxima verosimilitud (Ecuación 5.21) son los mismos que los parámetros obtenidos calculando la función de mínimo costo en la Ecuación 5.23.

#### Método de los mínimos cuadrados

Este es un caso particular del método de máxima verosimilitud en el que se supone que las mediciones son independientes e idénticamente distribuidas con errores de medición que tienen una desviación estándar  $\sigma$  (Gaussiana) conocida. La función de verosimilitud es

equivalente a minimizar la función de costo (u objetivo) siguiente,  $S(y, \theta)$  (Seber y Wild, 1989):

$$S(y, \theta) = \sum \frac{(y - f(\theta))^2}{\sigma^2} \tag{Ec. 5.23}$$

Donde  $(y)$  representa el conjunto de mediciones efectuadas,  $f(\theta)$  representa las predicciones del modelo y  $\sigma$  representa la desviación estándar de los errores de las mediciones. La solución de la función objetivo (Ecuación 5.24) se encuentra mediante algoritmos de minimización (por ejemplo el método de Newton, pendiente del gradiente, punto interior, Nelder-Mead, simplex, algoritmo genético, etc.).

$$\hat{\theta}: \min_{\theta} S(y, \theta) \tag{Ec. 5.24}$$

$$\left. \frac{\partial}{\partial \theta} S(y, \theta) \right|_{\hat{\theta}} = 0$$

La solución al problema de optimización anterior proporciona la mejor estimación de los valores de los parámetros. El paso siguiente es evaluar la calidad de los estimados de los parámetros. Este paso requiere la estimación del intervalo de confianza de los valores obtenidos de los parámetros y la correlación lineal por pares entre los parámetros.

**La matriz de covarianza de los estimadores de los parámetros**

Como resultado de la medición estocástica, los estimadores tienen un grado de incertidumbre. En el marco del pensamiento diario, la probabilidad se define en términos de la frecuencia de la ocurrencia de los resultados. Por lo tanto, en este método la incertidumbre de los estimadores de los parámetros se define por un intervalo de confianza del 95% interpretado como el intervalo en el que 95 veces de 100 es probable que se encuentren los valores estimados de los parámetros. Esto se puede explicar como si uno realizara la misma medida 100 veces, y luego realiza la estimación de parámetros en estos 100 conjuntos y observa lo siguiente: 95 ocurrencias de los valores del estimador están en el intervalo de confianza, mientras que 5 ocurrencias están fuera de este intervalo.

Para estimar el intervalo de confianza, es necesario primero estimar la matriz de la covarianza ( $cov(\hat{\theta})$ ), que contiene información completa sobre la incertidumbre de los valores de los parámetros que necesitan ser estimados. Un procedimiento para obtener ( $cov(\hat{\theta})$ ), es utilizar un método de aproximación lineal a través de la

estimación de la matriz Jacobiana ( $F$ ) del problema de estimación de parámetros (Seber y Wild, 1989):

$$cov(\hat{\theta}) = s^2 (F' \cdot F)^{-1} \text{ donde } F = \left. \frac{\partial f(\theta)}{\partial \theta} \right|_{\theta = \hat{\theta}} \tag{Ec. 5.25}$$

Donde,  $s^2$  es la estimación no sesgada de  $\sigma^2$  obtenida a partir de los residuos de la estimación de parámetros:

$$s^2 = \frac{S_{\min}(y, \hat{\theta})}{n - p} \tag{Ec. 5.26}$$

Aquí,  $n$  es el número total de mediciones,  $p$  es el número de parámetros estimados,  $n - p$  son los grados de libertad,  $S_{\min}(y, \hat{\theta})$  es el valor mínimo de la función objetivo y  $F$  es la matriz Jacobiana, que corresponde a la derivada de primer orden de la función del modelo,  $f$ , con respecto al vector  $\theta$  evaluado en  $\theta = \hat{\theta}$ .

La matriz de covarianza es una matriz cuadrada con dimensiones  $(p \times p)$ . Los elementos de la diagonal de la matriz son la varianza de los estimadores de los parámetros, mientras que los elementos no diagonales son la covarianza entre cualquier par de estimadores de los parámetros.

Ahora puede aproximarse el intervalo de confianza de 95 % de los parámetros de estimación. Suponiendo un valor de  $n$  grande, los intervalos de confianza (la diferencia entre los parámetros de estimación y los valores reales de los parámetros), siguen una distribución  $t$  de Student, el intervalo de confianza con un 100  $(1-\alpha)$  %, de significancia puede estimarse como:

$$\hat{\theta}_{1-\alpha} = \hat{\theta} \pm t_{N-p}^{\alpha/2} \sqrt{diag \ cov(\hat{\theta})} \tag{Ec. 5.27}$$

Donde,  $t_{N-p}^{\alpha/2}$  es el percentil  $\alpha/2$  superior de la distribución  $t$  con  $N-p$  grados de libertad, y  $diag(cov(\hat{\theta}))$ , representa los elementos de la diagonal de la matriz de covarianza de los parámetros.

La correlación lineal por pares entre los estimadores de los parámetros,  $R_{ij}$ , puede obtenerse calculando la matriz de correlación a partir de la estandarización unitaria de la matriz de covarianza:

$$R_{ij} = \frac{\text{cov}(\theta_i, \theta_j)}{\sigma_{\theta_i} \times \sigma_{\theta_j}} \quad \text{Ec. 5.28}$$

Esta correlación lineal estará en el intervalo comprendido entre [-1 1] e indicará si el estimador de los parámetros es únicamente identificable (si el coeficiente de correlación es bajo) o correlacionado (si el coeficiente de correlación es alto).

### El método bootstrap

Una de las hipótesis clave para usar el método de estimación de máxima verosimilitud (EMV), (MLE, de sus siglas en inglés), así como su versión simplificada, el método de mínimos cuadrados no lineales, es que se supone que la distribución de errores sigue una distribución normal (Gaussiana).

Sin embargo, en muchas aplicaciones prácticas esta condición se satisface raras veces. Por lo tanto, teóricamente, el método EMV para la estimación de parámetros no puede aplicarse sin comprometer sus suposiciones, lo que puede conducir a una sobre o subvaloración de los errores de estimación de parámetros y su estructura de covarianzas.

Una alternativa a este enfoque es el método bootstrap desarrollado por Efron (1979), que elimina el supuesto de que los residuos siguen una distribución normal. En cambio, el método bootstrap trabaja con la distribución real de los errores de medida, los cuales se propagan a los errores de estimación de parámetros utilizando un esquema de Monte Carlo apropiado (Figura 5.1).

El método bootstrap utiliza el conjunto de datos originales  $D(0)$  con sus  $N$  puntos de datos, para generar cualquier número de conjuntos de datos sintéticos  $D^S(1)$ ;  $D^S(2)$ , también con  $N$  puntos de datos. El procedimiento consiste simplemente en extraer  $N$  puntos de datos con sustituciones del conjunto  $D(0)$ . Debido a la sustitución, se obtienen conjuntos en los que una fracción aleatoria de los puntos medidos originales, típicamente  $1/e = 37\%$ , se reemplaza por puntos originales duplicados. Esto se ilustra en la Figura 5.1.

La aplicación del método bootstrap para la estimación de parámetros en el campo del tratamiento de aguas residuales requiere un ajuste, debido a la

naturaleza de los datos debido a su dependencia del tiempo. Por lo tanto, el muestreo no se realiza desde los puntos de datos originales (que son las series temporales e indican una tendencia particular). En su lugar, el muestreo se realiza a partir de los errores residuales y luego se suma a los resultados del modelo simulado (obtenidos utilizando la estimación de parámetros de referencia) (Figura 5.1). Esto es razonable porque los errores de la medición son lo que se supone como estocásticos y no la tendencia principal de los puntos de datos medidos, que son producidos por procesos y/o mecanismos biológicos. Teniendo esto en cuenta, los antecedentes teóricos del método bootstrap se describen a continuación.

Definamos un modelo no lineal simple donde  $y_i$  es la  $i$ -ésima medida,  $f_i$  es la  $i$ -ésima predicción del modelo,  $\theta$  es un vector de parámetros (de longitud  $p$ ) y  $\varepsilon_i$  es el error de medición de  $y_i$ :

$$y_i = f_i(\theta) + \varepsilon_i \quad \text{donde} \quad \varepsilon_i \sim F \quad \text{Ec. 5.29}$$

La distribución de errores,  $F$ , no se conoce. Esto es diferente en el método de la EMV, donde la distribución se asume *a priori*. Dado  $y$ , utilice la minimización por mínimos cuadrados, para  $\hat{\theta}$ :

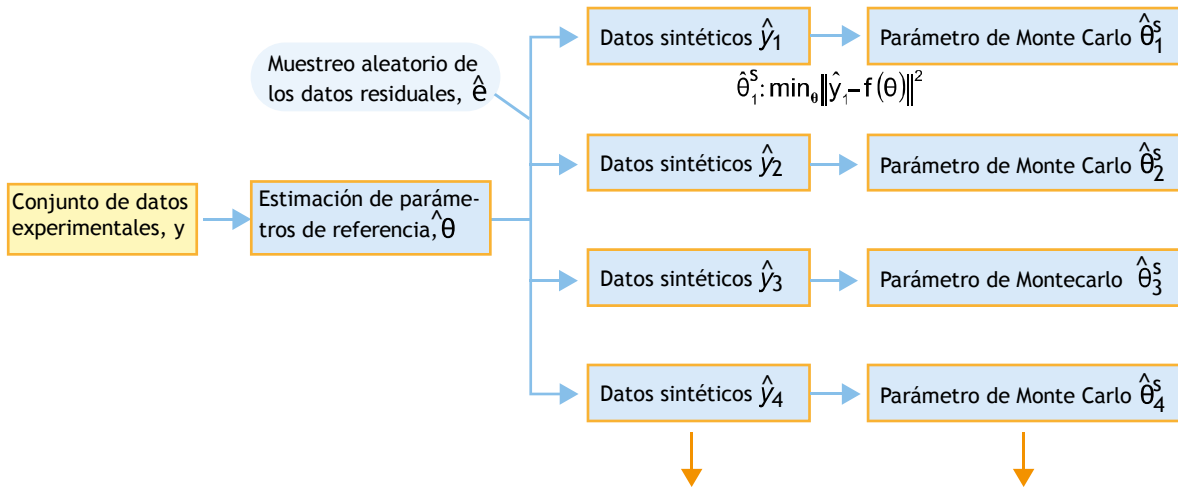
$$\hat{\theta} : \min_{\theta} \|y - f(\theta)\|^2 \quad \text{Ec. 5.30}$$

El método bootstrap define  $F$  como la distribución de probabilidades  $\varepsilon$  de la muestra de la manera siguiente:

$$\hat{F} = \frac{1}{n} \text{ (densidad)} \quad \varepsilon_i = (y_i - f_i(\theta)) \quad i = 1, 2, \dots, n \quad \text{Ec. 5.31}$$

La densidad es la probabilidad de la  $i$ -ésima observación. En una distribución uniforme, cada observación (en este caso el error de medición,  $\varepsilon_i$ ) tiene una probabilidad de ocurrencia igual, donde la densidad se estima a partir de  $1/n$ . La muestra bootstrap,  $y^*$ , dados  $(\hat{\theta}, \hat{F})$ , se genera de la manera siguiente:

$$y_i^* = f_i(\hat{\theta}) + \varepsilon_i^* \quad \text{donde} \quad \varepsilon_i^* \sim \hat{F} \quad \text{Ec. 5.32}$$



**Figura 5.1** El método bootstrap: se generan conjuntos de datos sintéticos mediante muestras de Monte Carlo (muestreo aleatorio con remplazo) de la referencia EMV. Para cada conjunto de datos, se realiza el mismo procedimiento de estimación, obteniendo M conjuntos diferentes de estimaciones de los parámetros:  $\hat{\theta}^s_{(1)}, \hat{\theta}^s_{(2)}, \dots, \hat{\theta}^s_{(M)}$ .

La determinación del error de medición en cada método bootstrap  $\epsilon^*$ , se simula mediante el muestreo aleatorio con sustitución de los residuos originales, lo que asigna a cada punto un peso uniforme (probabilidad). Mediante la realización de un muestreo aleatorio con un reemplazo y añadiéndolos a la predicción del modelo (Ec 5.31), se genera un nuevo conjunto de datos sintéticos,  $D^s(1) = y^*$ .

Repitiendo el procedimiento de muestreo anterior M veces, se generan M conjuntos de datos:  $D^s(1), D^s(2), D^s(3), \dots, D^s(M)$ .

Cada conjunto de datos sintéticos,  $D^s(j)$ , hace posible obtener un nuevo estimador de parámetros  $\hat{\theta}(j)$  mediante el mismo método de minimización de mínimos cuadrados que se repite M veces:

$$\hat{\theta}_j: \min_{\theta} \|D^s(j) - f(\theta)\|^2 \text{ donde } j = 1, 2, \dots, M \quad \text{Ec. 5.33}$$

El resultado de esta iteración es una matriz de estimadores de parámetros  $\hat{\theta}(M \times p)$ , (M es el número de muestras de datos sintéticos de Monte Carlo y p es el número de parámetros estimados). Por lo tanto, cada estimador de parámetros ahora tiene un vector columna con valores. Este vector de valores puede ser representado en un histograma e interpretado usando parámetros frecuentes como la media, la desviación estándar y el percentil 95%. La matriz de covarianza y correlación se pueden calcular usando  $\hat{\theta}(M \times p)$ . Esto

proporciona efectivamente toda la información necesaria sobre la calidad de los estimadores de parámetros.

Para errores de medición que siguen una distribución normal, tanto EMV como el método bootstrap proporcionarán esencialmente los mismos resultados. Sin embargo, si la distribución de las mediciones se desvía significativamente de una distribución normal, se espera que el método bootstrap proporcione un mejor análisis del intervalo de confianza de los estimadores.

### 5.2.3 Análisis de incertidumbre

#### 5.2.3.1 Propagación de errores lineales

En la propagación lineal de errores, la matriz de covarianza de los estimadores de parámetros,  $cov(\hat{\theta})$ , se utiliza para transmitir errores de medición al modelo de predicción de errores y para calcular errores estándar e intervalos de confianza de las estimaciones de los parámetros. Por lo tanto, la matriz de covarianza de las predicciones del modelo,  $cov(y)$ , se puede estimar empleando la  $cov(\hat{\theta})$  como se muestra a continuación (Seber y Wild, 1989):

$$cov(y) = (F \cdot F) cov(\hat{\theta}) (F \cdot F)^{-1} \quad \text{Ec. 5.34}$$

Similarmente, el intervalo de confianza  $1-\alpha$  de las predicciones, y, puede aproximarse de la manera siguiente:



$$y_{1-\alpha} = y \pm t_{N-p}^{a/2} \sqrt{\text{diag cov}(y)} \quad \text{Ec. 5.35}$$

Esto concluye la estimación de parámetros, los intervalos de confianza y la incertidumbre de la predicción, desde el punto de vista del análisis frecuencial.

### 5.2.3.2 El método de Monte Carlo

El método de Monte Carlo (MC) se utilizó originalmente para calcular integrales multidimensionales y su uso sistemático comenzó en la década de 1940 con “la Escuela de matemáticos y físicos de Los Álamos”, entre ellos, Von Neumann, Ulam, Metropolis, Kahn, Fermi y sus colaboradores. El término fue acuñado por Ulam en 1946 en honor de un familiar que estaba interesado en los juegos de azar (Metropolis y Ulam, 1949).

En el contexto del análisis de incertidumbre, que concierne a la estimación de la propagación de errores desde un conjunto de entradas a un conjunto de resultados (predicciones) del modelo, el interés fundamental es el cálculo de la media y la varianza de los resultados del modelo que son en sí mismas integrales multidimensionales (la dimensión está determinada por la longitud del vector de los parámetros de entrada):

$$I = \int f(x) dx = \int f(u_1, \dots, u_d) d^d x \quad \text{Ec. 5.36}$$

Algunos autores consideran la integral de la función  $f(x)$  con  $x$  como el vector de entrada  $x = (u_1, \dots, u_d)$ . Por tanto, la integral se toma sobre las  $d$  variables  $u_1, \dots, u_d$  sobre el hipercubo unitario  $[0, 1]^d$ . En la estimación de parámetros, estas variables de entrada son parámetros del modelo que tienen un cierto intervalo con límites inferiores y superiores. Asumimos que  $f$  es un cuadrado integrable, lo que significa que existe un valor real de la solución en cada punto de integración. Como notación se denotará un punto en el hipercubo unitario por  $x = (u_1, \dots, u_d)$  y la función evaluada en ese punto por  $f(x) = f(u_1, \dots, u_d)$ , y entonces la operación de integración multidimensional estará dada por:

$$E = \frac{1}{N} \sum_1^N f(x_N) \quad \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_1^N f(x_N) = I \quad \text{Ec. 5.37}$$

La ley de los grandes números asegura que la estimación de MC ( $E$ ) converge al valor verdadero de esta integral. Sin embargo, como la mayor parte del tiempo  $N$  es finito (un número de muestreo del espacio de entrada  $u$  con dimensión  $dx$ ), habrá un error en la integración de Monte Carlo de funciones

multidimensionales. Este error de integración Monte Carlo se escala como  $1/\sqrt{N}$ . Por lo tanto, el error medio de integración de Monte Carlo viene dado por  $MCert = \sigma(f)/\sqrt{N}$ , donde  $\sigma(f)$  es la desviación estándar del error, que puede ser aproximada usando la varianza de la muestra:

$$\sigma^2(f) \approx s^2(f) = \frac{1}{N-1} \sum_1^N (f(x_N) - E)^2 \quad \text{Ec. 5.38}$$

Por simplicidad de notación, consideramos el modelo simple siguiente  $y = f(x)$ : donde la función  $f$  representa el modelo en estudio,  $x: [x_1; \dots, x_d]$  es el vector de las entradas del modelo y la  $y: [y_1; \dots, y_n]$  es el vector de las predicciones del modelo.

El objetivo de un análisis de incertidumbre es determinar la incertidumbre en los elementos de  $y$  que resulta de la incertidumbre en los elementos de  $x$ . Dada la incertidumbre en el vector  $x$  caracterizada por las funciones de distribución  $D = [D_1, \dots, D_d]$ , donde  $D_1$  es la función de distribución asociada con  $x_1$ , la incertidumbre en  $y$  se puede describir con la Ecuación 5.39.

$$\begin{aligned} \text{var}(y) &= \int ((y) - f(x))^2 dx \\ E(y) &= \int f(x) dx \end{aligned} \quad \text{Ec. 5.39}$$

Donde,  $\text{var}(y)$  y  $E(y)$  son la varianza y el valor esperado, respectivamente, de un vector de variables aleatorias,  $y$ , que se calculan mediante la técnica de muestreo de Monte Carlo. Además de la varianza y los valores medios, también se puede calcular fácilmente un percentil para  $y$ , incluyendo los límites superior e inferior del 95%.

## 5.2.4 Análisis de sensibilidad local y análisis de identificación

### 5.2.4.1 Análisis de sensibilidad local

La mayoría de los resultados de análisis de sensibilidad reportados en la literatura son de naturaleza local, y estos también se llaman métodos de un factor a la vez (OAT por sus siglas en inglés, *one factor at a time*). En los métodos OAT, cada variable de entrada es cambiada (también llamada perturbación) una a la vez alrededor de su valor nominal, y se mide el efecto sobre el resultado. Los resultados del análisis de sensibilidad de estos métodos son útiles y válidos en estrecha proximidad con los parámetros analizados, de ahí el nombre local. Además, las funciones de sensibilidad de

los parámetros dependen de los valores nominales utilizados en el análisis. Métodos alternativos, como los métodos regionales o globales, amplían el análisis desde un punto del espacio del parámetro para cubrir un intervalo más amplio, pero esto está más allá del alcance de este capítulo (los lectores interesados pueden consultar ciertos artículos científicos publicados por Saltelli *et al.*, 2000; Sin *et al.*, 2009).

La medida de la sensibilidad local se define comúnmente utilizando la derivada de primer orden de una salida,  $y = f(x)$ , con respecto a un parámetro de entrada,  $x$ :

$$\text{Sensibilidad absoluta: } sa = \frac{\partial y}{\partial x} \quad \text{Ec. 5.40}$$

(efecto sobre  $y$ , creando una perturbación  $x$ , alrededor de su valor nominal  $x^0$ ).

$$\text{Sensibilidad relativa: } sr = \frac{\partial y}{\partial x} \frac{x^0}{y^0} \quad \text{Ec. 5.41}$$

(efecto relativo de  $y$  producido por una perturbación  $x$  con una fracción fija de su valor nominal  $x^0$ ).

Las funciones de sensibilidad relativa son adimensionales con respecto a las unidades y se utilizan para comparar los efectos entre sí de las entradas del modelo.

Estas derivadas de primer orden se pueden calcular analíticamente, por ejemplo, utilizando el software de herramientas de manipulación simbólica de Maple o Matlab. Alternativamente, las derivadas pueden obtenerse numéricamente mediante simulación de modelos con una pequeña perturbación positiva o negativa,  $\Delta x$ , de las entradas del modelo en torno a sus valores nominales,  $x^0$ . Dependiendo de la dirección de la perturbación, el análisis de sensibilidad puede ser aproximado usando los métodos de diferencia directa, inversa o central:

Perturbación directa:

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{f(x^0 + \Delta x) - f(x^0)}{\Delta x} \quad \text{Ec. 5.42}$$

Perturbación inversa:

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{f(x^0) - f(x^0 - \Delta x)}{\Delta x} \quad \text{Ec. 5.43}$$

Diferencia central:

$$\frac{\partial y}{\partial x} = \frac{f(x^0 + \Delta x) - f(x^0 - \Delta x)}{2\Delta x} \quad \text{Ec. 5.44}$$

Cuando se selecciona un intervalo pequeño de perturbación,  $\Delta x$  (usualmente un factor de perturbación,  $\epsilon = 10^{-3}$ , por lo que  $\Delta x = \epsilon \cdot x$ ), los tres métodos proporcionan exactamente los mismos resultados.

Una vez calculadas las funciones de sensibilidad, las mismas pueden utilizarse para evaluar la significación del parámetro al determinar las predicciones del modelo. Típicamente, valores absolutos grandes indican una alta importancia del parámetro, mientras que un valor cercano a cero implica que no existe efecto alguno del parámetro sobre la salida o resultado del modelo (por lo tanto, el parámetro no influye). Esta información es útil en el diseño de experimentos, para evaluar los problemas de identificación de parámetros.

### 5.2.4.2 Análisis de identificación utilizando el índice de colinealidad

El primer paso en la estimación de parámetros es determinar qué conjuntos de parámetros se pueden seleccionar para la estimación. Este problema es objeto del análisis de identificación o identificabilidad, que se ocupa de identificar qué subconjuntos de parámetros se pueden identificar de forma única a partir de un conjunto dado de mediciones. Por lo tanto, se supone que un modelo puede tener un número de parámetros. Aquí el término unívoco es importante y debe entenderse de la siguiente manera: una estimación de parámetros es única cuando su valor puede estimarse independientemente de otros valores de parámetros y con una precisión suficientemente alta (es decir, una incertidumbre pequeña). Esto significa que el coeficiente de correlación entre cualquier par de parámetros debe ser bajo (por ejemplo inferior a 0.5) y el error estándar de las estimaciones de parámetros debe ser bajo (por ejemplo el error relativo de la estimación del parámetro  $\sigma_\theta/\theta$ , inferior a 25%). Por el contrario, un problema *se define* como mal condicionado cuando el número de condición de una función / matriz es muy alto, lo cual es causado por problemas de multicolinealidad. En los problemas de regresión, el número de condición se utiliza como una herramienta de diagnóstico para identificar problemas de identificación de parámetros. Dichos diagnósticos de regresión son útiles para generar candidatos potenciales de los subconjuntos de parámetros para la estimación que el usuario puede seleccionar.

Hay varias pruebas de identificabilidad sugeridas en la literatura que se basan totalmente en las funciones de sensibilidad de los parámetros en los resultados o predicciones. Aquí se utiliza el procedimiento de dos etapas de Brun *et al.*, 2002. En este sentido, el procedimiento funciona de la siguiente manera: (i) evaluación del nivel de significación, importancia o influencia de parámetros, (ii) análisis de colinealidad (análisis de dependencia de las funciones de sensibilidad de parámetros en un subconjunto de parámetros):

**Paso 1.** Clasificar la influencia de los parámetros:  $\delta^{\text{msqr}}$

$$\delta^{\text{msqr}} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i^N (sr_i)^2} \quad \text{Ec. 5.45}$$

Donde,  $sr$  es un vector de sensibilidad no dimensional de valores,  $sr = i \dots N$ .

**Paso 2.** Calcular el índice de colinealidad de un subconjunto de parámetros  $K$ ,  $\gamma_K$

$$\gamma_K = \frac{1}{\sqrt{\min \lambda_K}} \quad \text{Ec. 5.46}$$

$$\lambda_K = \text{eigen}(\text{snorm}_K^T \text{snorm}_K) \quad \text{Ec. 5.47}$$

$$\text{snorm} = \frac{sr}{\|sr\|} \quad \text{Ec. 5.48}$$

Donde,  $K$  indica un subconjunto de parámetros,  $\text{snorm}$  es la función de sensibilidad no dimensional normalizada utilizando la norma euclidiana, y  $\lambda_K$  representa los valores propios de la matriz de sensibilidad normalizada para el subconjunto de parámetros  $K$ .

En el paso 1, los parámetros que tienen una influencia insignificante o casi nula en los resultados o predicciones del modelo, se eliminan de la consideración para la estimación de parámetros. En el segundo paso, para cada subconjunto de parámetros (todas las combinaciones de los subconjuntos de parámetros que incluyen parámetros 2, 3, 4, ...,  $m$ ) se calcula el índice de colinealidad. El índice de colinealidad es la medida de la similitud entre cualquiera de los dos vectores de las funciones de sensibilidad. Los subconjuntos que tienen funciones de sensibilidad muy similares tenderán a tener un número muy grande ( $\gamma_K \sim \text{inf}$ ), mientras que los vectores independientes tendrán un valor menor  $\gamma_K \sim 1$  que es deseable. En el análisis de identificabilidad, se utiliza generalmente un valor umbral o de referencia de 5-20

(Brun *et al.*, 2001, Sin y Vanrolleghem, 2007, Sin *et al.*, 2010). Se observa que este valor de  $\gamma_K$  debe utilizarse como guía para seleccionar subconjuntos de parámetros como candidatos para la estimación de parámetros. La mejor práctica es iterar y probar la serie de subconjuntos de mayor rango.

## 5.3 METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

### 5.3.1 Comprobación de la consistencia de los datos utilizando un balance elemental y un análisis de grado de reducción

El siguiente procedimiento de trabajo consiste en realizar un balance elemental y un análisis de reducción de grado:

**Paso 1.** Formular una estequiometría de proceso siguiendo el concepto de caja negra para el proceso biológico. En esta etapa se identifican y anotan los reactivos y productos más relevantes consumidos y producidos en el proceso biológico. El resultado es una lista de reactivos y productos para el paso 2.

**Paso 2.** Componer las matrices de composición elemental ( $E_m$  y  $E_u$ ). En primer lugar, establecer qué variables de interés se miden y luego definir las matrices de la siguiente manera:  $E_m$  incluye la composición elemental y el grado de las reducciones para estas variables medidas, mientras que  $E_u$  incluye los de las variables no medidas. Para calcular el grado de reducción, utilice el procedimiento indicado en la Sección 5.2.1.2.

**Paso 3.** Calcular las velocidades de reacción no medidas de las especies ( $q_u$ ). Usando  $E_m$  y  $E_u$  junto con el vector de las velocidades medidas ( $q_m$ ), las velocidades no medidas ( $q_u$ ) se calculan a partir de la solución del conjunto lineal de ecuaciones en Ec. 5.18.

**Paso 4.** Calcular los coeficientes de rendimiento. En esta etapa, ya que todas las especies consumidas/producidas son conocidas, los coeficientes de rendimiento se pueden calcular usando la Ec. 5.2 y la estequiometría de proceso puede escribirse utilizando los valores del coeficiente de rendimiento.

**Paso 5.** Verificar el balance elemental.

En este paso, se realiza un simple chequeo para verificar si el balance elemental y el grado de reducción están cerrados. De no ser así, el procedimiento debe iterarse

asumiendo una hipótesis diferente con respecto a la formación de los subproductos.

### 5.3.2 Flujo de trabajo para la estimación de los parámetros para el método de mínimos cuadrados no lineales

Este procedimiento de trabajo supone que para describir los datos se utiliza un modelo matemático apropiado y consistente. Este modelo confirma el balance elemental y el grado de reducción (ver el flujo de trabajo en la Sección 5.3.1). Por lo general, estos modelos están disponibles en la literatura. La mayoría de ellos se modifican a partir de modelos tipo ASM con simplificaciones y/o adiciones apropiadas que reflejan las condiciones del experimento en batch.

**Paso 1.** Inicialización. En este paso, se especifican las condiciones iniciales para las variables del modelo, así como un conjunto nominal de parámetros para el modelo. Las condiciones iniciales para el modelo se especifican de acuerdo con las condiciones experimentales (por ejemplo 10 mg  $\text{NH}_4\text{-N}$  añadido en el tiempo 0,  $k_{\text{LA}}$  tiene un cierto valor, se especifica la saturación de oxígeno a una temperatura dada, etc.). Una estimación inicial de los parámetros del modelo se toma de la literatura.

**Paso 2.** Seleccionar los datos experimentales y un subconjunto de parámetros para la estimación. En este paso, se revisan los datos experimentales para la estimación de parámetros y se definen aquellos parámetros que se deben estimar. Esto puede hacerse utilizando el criterio del experto o, más científicamente, un análisis de sensibilidad e identificación (ver Sección 5.3.4).

**Paso 3.** Definir y resolver el problema de estimación de parámetros. En este paso, el problema de estimación de parámetros se define como un problema de minimización y se resuelve utilizando algoritmos de optimización (por ejemplo *fminsearch* en Matlab).

**Paso 4.** Estimar la incertidumbre de los estimadores de parámetros y resultados del modelo. En este paso, se calcula la matriz de la covarianza de los estimadores de parámetros y se calculan los intervalos de confianza de los parámetros, así como la matriz de correlación de parámetros. Dada la matriz de covarianza de los estimadores de parámetros, se estima la matriz de

covarianza de los resultados o predicciones del modelo por propagación lineal de errores.

**Paso 5.** Revisar y analizar los resultados. En este paso, se revisan los valores de los valores de los parámetros, que deben estar dentro del intervalo de valores obtenidos de la literatura. Además, se inspeccionan los intervalos de confianza de los estimadores de parámetros. Intervalos de confianza muy grandes implican que el parámetro en cuestión no se puede estimar con fiabilidad y debe ser excluido del subconjunto.

Además, se deben graficar y revisar los resultados que proporcionen el mejor ajuste o correlación. Generalmente, los datos y las predicciones del modelo deben ajustar bien.

Si los resultados (ambos valores de los parámetros) y la solución que proporciona el mejor ajuste de los datos no son satisfactorios, debe iterarse según corresponda volviendo al Paso 1 o Paso 2.

### 5.3.3 PROCEDIMIENTO DE TRABAJO PARA LA ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS POR EL MÉTODO BOOTSTRAP

El procedimiento de trabajo del método bootstrap se desarrolla a partir de los Pasos 1, 2 y 3 del método de mínimos cuadrados no lineales.

**Paso 1.** Realizar una estimación de parámetros de referencia utilizando el método de mínimos cuadrados no lineales. Este paso básicamente es una ejecución de los pasos 1, 2 y 3 del procedimiento de la técnica de mínimos cuadrados no lineales. El resultado es un vector residual que se pasa al siguiente paso. El vector residual se grafica y revisa. Si los residuos siguen un patrón sistemático (debe ser aleatorio) o contienen valores atípicos, esto debe revisarse con atención ya que puede implicar que el método bootstrap no es adecuado para esta aplicación.

**Paso 2.** Generar datos sintéticos mediante el muestreo bootstrap y repetir la estimación de parámetros. Los datos sintéticos se generan usando las Ecuaciones 5.29-5.32 realizando el muestreo bootstrap (muestreo aleatorio con sustitución) del vector residual y añadiéndolo a la predicción del modelo obtenido en el paso 1. Para cada dato sintético, se repite la estimación de parámetros en el paso 1 y los resultados (es decir, los valores de los estimadores de parámetros) se registran en una matriz.

**Paso 3.** Revisar y analizar los resultados. En este paso, la media, la desviación estándar y la matriz de correlación de los estimadores de los parámetros se calculan a partir de los datos de la matriz registrados en el paso 2. Además, la función de distribución de los estimadores de los parámetros se puede estimar y trazar utilizando el vector de los valores de parámetros que se obtuvieron en la Etapa 2.

Al igual que en el paso 5 del procedimiento de trabajo en el método de mínimos cuadrados no lineales, los resultados se interpretan y evalúan utilizando información de la literatura y de la ingeniería de procesos.

### 5.3.4 PROCEDIMIENTO DE TRABAJO PARA EL ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD E IDENTIFICABILIDAD LOCAL

El esquema de trabajo de este procedimiento comienza con la suposición de que existe un modelo matemático disponible y listo para ser utilizado para describir un conjunto de datos experimentales.

**Paso 1.** Inicialización. Se establece un marco para el análisis de sensibilidad definiendo las condiciones experimentales (las condiciones iniciales para los experimentos de las pruebas batch), así como un conjunto de valores nominales para el análisis del modelo. El modelo se resuelve con estas condiciones iniciales y las predicciones del modelo se grafican y revisan antes de realizar el análisis de sensibilidad.

**Paso 2.** Calcular las funciones de sensibilidad. Definir qué predicciones han sido medidas y cuales por lo tanto deben incluirse en el análisis de sensibilidad. Defina los puntos de datos experimentales (cada 1 min versus cada 5 min).

Calcule las funciones de sensibilidad de los parámetros en las predicciones utilizando una diferencia numérica, por ejemplo utilizando una perturbación o diferencia directa, inversa o central. Trazar, revisar y analizar los resultados.

**Paso 3.** Clasificar el intervalo de significación del parámetro. Calcule la medida del cuadrado medio delta,  $\delta^{msqr}$ , y clasifique los parámetros de acuerdo con esta medida. Excluya cualquier parámetro que tenga un impacto cero o insignificante sobre las predicciones.

**Paso 4.** Calcular el índice de colinealidad. Para todas las combinaciones de parámetros (por ejemplo tamaño de subconjunto 2, 3, 4 ... m), se calcula el índice de colinealidad  $\gamma_K$ . Cada subconjunto de parámetros se clasifica según el valor del índice de colinealidad.

**Paso 5.** Revisar y analizar los resultados. Basándose en los resultados de los pasos 3 y 4, identifique una lista corta de candidatos (subconjuntos de parámetros) que son identificables. Excluya estos parámetros de cualquier subconjunto de parámetros que tenga una sensibilidad casi nula o insignificante sobre las predicciones.

### 5.3.5 Análisis de incertidumbre utilizando el método de Monte Carlo y la propagación lineal de errores

El procedimiento de trabajo para el método Monte Carlo incluye las etapas siguientes:

**Paso 1.** Establecer la definición de incertidumbre. Identificar qué entradas (parámetros) poseen incertidumbre. Definir un intervalo/distribución para la incertidumbre de cada entrada, por ejemplo una distribución normal, distribución uniforme, etc. Aquí se puede usar como entrada las predicciones o resultados de los estimadores de parámetros (por ejemplo del método bootstrap).

**Paso 2.** Muestreo de entrada. Defina el número de muestras, N, (por ejemplo 50, 100, etc.) y el espaciamiento de las muestras de entrada, usando una técnica de muestreo apropiada. Las técnicas de muestreo más comunes son muestreo aleatorio, muestreo de hipercubo latino, etc. La salida de este paso es una matriz de muestreo,  $X_{N \times m}$ , donde N es el número de muestras y m es el número de entradas.

**Paso 3.** Realizar las simulaciones de Monte Carlo. Realice N simulaciones con el modelo, utilizando la matriz de muestreo del paso 2. Registre los valores de las predicciones en forma de matriz para ser procesada en el paso siguiente.

**Paso 4.** Revisar y analizar los resultados. Trace o grafique los predicciones y revise los resultados. Calcule la media, desviación estándar/varianza y percentiles (por ejemplo 95%) para las predicciones. Analice los resultados en el contexto de la calidad de la estimación de los parámetros y la predicción de la incertidumbre del



modelo. Itere el análisis, si es necesario, volviendo al Paso 1 o Paso 2.

El procedimiento de trabajo para el estudio de la propagación lineal de errores es relativamente sencillo. Éste es complementario al de la matriz de la covarianza de los estimadores de parámetros y debe realizarse como parte de la estimación de parámetros en el método de mínimos cuadrados no lineales. Requiere utilizar la matriz de covarianza de los estimadores de parámetros, así como la matriz Jacobiana, que se obtienen en el paso 4 de la metodología de mínimos cuadrados no lineales.

### 5.4 EJEMPLOS ADICIONALES

#### Ejemplo 5.2 Fermentación anaeróbica de la glucosa

En este ejemplo, se considera la fermentación anaerobia de glucosa a etanol y glicerol como productos metabólicos.

**Paso 1.** Formular la estequiometría del proceso. Se asume que el amoníaco es la fuente de nitrógeno para el crecimiento y que la composición de la biomasa es  $CH_{1.6}O_{0.5}N_{0.15}$ . Todos los sustratos se expresan sobre la base de 1 C-mol, mientras que para el nitrógeno es sobre la base de 1 N-mol. En este proceso biológico, los sustratos son  $CH_2O$  (glucosa) y  $NH_3$ . Los productos son  $CH_{1.6}O_{0.5}N_{0.15}$  (biomasa),  $CH_3O_{0.5}$  (etanol),  $CH_{8/3}O$  (glicerol) y  $CO_2$ . El agua se excluye del análisis, ya que su producción no se considera relevante para este proceso de cálculo. Esto significa que los balances de H y O tampoco serán considerados.

**Paso 2.** Definir la composición elemental de las matrices ( $E_m$  y  $E_u$ ). Como el proceso tiene seis especies (sustratos + productos) y tres restricciones (dos balances elementales, para C y N más un grado de reducción), la medición de tres relaciones es suficiente para estimar/inferir las velocidades restantes.

Para ilustrar el concepto, se seleccionan las relaciones medidas como la de consumo volumétrico del sustrato ( $q_s$ ), la de producción de biomasa ( $q_x$ ) y la de producción de glicerol ( $q_g$ ), por lo tanto, las relaciones restantes para el consumo de amoníaco, así como la producción de etanol y  $CO_2$  deben estimarse utilizando la Ec. 5.18. En los vectores de velocidad medida, un signo negativo indica el consumo de una especie, mientras que un signo positivo indica la producción de una especie.

**Paso 3.** Calcular las relaciones no medidas de la especie ( $q_u$ ). Recordar la Ec. 5.18, que se resuelve como sigue:

$$E_m \cdot q_m + E_u \cdot q_u = 0$$

$$\begin{matrix} & S & X & Gly & & NH_3 & Eth & CO_2 \\ C & \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0.15 & 0 \\ 4 & 4.12 & 4.67 \end{bmatrix} & \cdot & \begin{bmatrix} -q_s \\ q_x \\ q_g \end{bmatrix} & + & \begin{bmatrix} 0 & 1.0 & 1.0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 6 & 0 \end{bmatrix} & \cdot & \begin{bmatrix} -q_n \\ q_e \\ q_c \end{bmatrix} = 0 \end{matrix}$$

$$q_u = -(E_u)^{-1} \cdot E_m \cdot q_m$$

$$\begin{pmatrix} -q_n \\ q_e \\ q_c \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} 0 & 1.0 & 1.0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 6 & 0 \end{pmatrix}^{-1} \cdot \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0.15 & 0 \\ 4 & 4.12 & 4.67 \end{bmatrix} \cdot \begin{pmatrix} -q_s \\ q_x \\ q_g \end{pmatrix}$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones lineales anteriores, se obtiene la solución siguiente donde las tres velocidades no medidas se calculan en función de las velocidades medidas  $q_s$ ,  $q_g$  y  $q_x$ :

$$\begin{pmatrix} -q_n \\ q_e \\ q_c \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -0.15q_x \\ 2q_g / 3 - 467q_g / 600 - 103q_x / 150 \\ q_s / 3 - 133q_g / 600 - 47q_x / 150 \end{pmatrix}$$

**Paso 4.** Calcular los rendimientos del proceso. Una vez estimadas las velocidades de todos los productos y sustratos, se pueden calcular los coeficientes de rendimiento para el proceso recordando la Ec. 5.2:

$$Y_{sx} = \frac{q_x}{q_s} \quad \text{and} \quad Y_{sg} = \frac{q_g}{q_s}$$

$$Y_{sn} = \frac{q_n}{q_s} = \frac{-0.15q_x}{q_s} = -0.15Y_{sx}$$

$$Y_{se} = \frac{q_e}{q_s} = \frac{(2q_s / 3 - 467q_g / 600 - 103q_x / 150)}{q_s} = \frac{2}{3} - 0.7783Y_{sg} - 0.6867Y_{sx}$$

$$Y_{sc} = \frac{q_c}{q_s} = \frac{(q_s / 3 - 133q_g / 600 - 47q_x / 150)}{q_s} = \frac{1}{3} - 0.2217Y_{sg} - 0.3133Y_{sx}$$

Con estos coeficientes de rendimiento estimados, la estequiometría simplificada del proceso se puede expresar como:

$$0 = -\text{CH}_2\text{O} - 0.15Y_{\text{sx}} \cdot \text{NH}_3 \dots$$

$$+ Y_{\text{sx}} \cdot \text{CH}_{1.61}\text{O}_{0.52}\text{N}_{0.15} + \left( \frac{2}{3} - 0.7783Y_{\text{sg}} - 0.6867Y_{\text{sx}} \right) \cdot \text{CH}_3\text{O}_{0.5} +$$

$$Y_{\text{sg}} \cdot \text{CH}_{8/3}\text{O} + \left( \frac{1}{3} - 0.2217Y_{\text{sg}} - 0.3133Y_{\text{sx}} \right) \cdot \text{CO}_2$$

**Paso 5.** Verificar el balance elemental. A partir de la estequiometría de proceso, es fácil verificar que los balances elementales y de grado de reducción son coherentes:

$$-1 + Y_{\text{sx}} + \left( \frac{2}{3} - 0.7783 \cdot Y_{\text{sg}} - 0.6867 \cdot Y_{\text{sx}} \right) + Y_{\text{sg}} +$$

$$\left( \frac{1}{3} - 0.2217 \cdot Y_{\text{sg}} - 0.3133 \cdot Y_{\text{sx}} \right) = 0$$

Balance de nitrógeno:

$$-0 - 0.15 \cdot Y_{\text{sx}} + 0.15 \cdot Y_{\text{sx}} + 0 + 0 + 0 = 0$$

Balance del grado de reducción:

$$-1 \cdot 4 + Y_{\text{sx}} \cdot 4.12 + \left( \frac{2}{3} - 0.7783 \cdot Y_{\text{sg}} - 0.6867 \cdot Y_{\text{sx}} \right) \cdot 6 +$$

$$Y_{\text{sg}} \cdot 4.67 = 0$$

En el ejemplo anterior, se supuso que tres velocidades medidas eran un requisito mínimo para identificar el sistema de ecuaciones lineales. En aplicaciones prácticas, puede haber otras dos situaciones: (i) mediciones redundantes: las mediciones de la mayoría o quizás todas las relaciones de producción/consumo de especies están disponibles. En este caso, las mediciones de velocidad adicionales pueden utilizarse para la verificación y validación de la calidad de los datos (donde algunas de las relaciones medidas podrían utilizarse como una validación de los coeficientes estimados del análisis del balance); (ii) un conjunto limitado de mediciones: en este caso se dispone de muy pocas mediciones de relaciones para estimar de forma única las no medidas. Si no se dispone de datos de variables suficientes, algunas variables deberían fijarse (por ejemplo esto podría hacerse iterativamente en un algoritmo de búsqueda) para reducir los grados de libertad. Si no, hay infinitas soluciones. Se puede

encontrar más información sobre estas técnicas en otras publicaciones (Villadsen *et al.*, 2011, Meijer *et al.*, 2002, van der Heijden *et al.*, 1994).

### Ejemplo 5.3 Estimar los parámetros de los procesos de oxidación de amonio y nitrito utilizando datos de ensayos discontinuos: el método de mínimos cuadrados no lineales

Para medir los parámetros de las bacterias nitrificantes, en particular los organismos oxidantes de amonio (AOO) y los organismos oxidantes de nitritos (NOO), se realizan ensayos aerobios en batch, con una muestra de lodo procedente de una planta de pre-desnitrificación. Siguiendo el procedimiento experimental recomendado en la bibliografía (Guisasola *et al.*, 2005), se realizaron dos ensayos por separado de la manera siguiente: (i) ensayo en batch No. 1 con adición de amonio de 20 mg  $\text{NH}_4\text{-N L}^{-1}$  y un inhibidor (azida sódica) para suprimir la actividad de NOO, (ii) ensayo en batch No. 2 con adición de 20 mg  $\text{NH}_4\text{-N L}^{-1}$  de amonio sin incorporar inhibidores. En ambas pruebas, tanto el pH como la temperatura se controlaron a 7.5 y 25°C, respectivamente. Durante los dos ensayos, se midieron las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato cada 5 minutos, mientras que el oxígeno disuelto se midió cada minuto. Los datos recolectados se muestran en la Figura 5.2. Con el propósito de simplificar y mantener la atención sobre la demostración de los métodos y su apropiada interpretación, estos ejemplos utilizan datos sintéticos con adición aleatoria.

### Parte 1. Estimación de los parámetros del proceso de oxidación de amonio.

En la literatura se sugieren varios modelos (Sin *et al.*, 2008). Para describir la cinética de oxidación de amonio y nitrito utilizamos el modelo matemático dado en la Tabla 5.1. Por razones de simplicidad, se supone lo siguiente: (i) la respiración endógena relacionada con la biomasa heterótrofa es constante (por lo tanto, no está modelada), (ii) la fracción inerte de la biomasa que se descompone (muere) durante la respiración endógena es despreciable, (iii) el amonio consumido para el crecimiento autótrofo de biomasa es insignificante. Se observa que, a los efectos de un análisis más preciso, se deben describir todos los fenómenos anteriores. Sin embargo, aquí el modelo se mantiene simple para centrar la atención del lector en el procedimiento de trabajo de la estimación de parámetros.

**Tabla 5.1** Estructura del modelo de nitrificación en dos etapas usando una representación matricial (adaptado a partir de Sin *et al.*, 2008)

Variables → C <sub>i</sub>	S <sub>NH</sub> mg N L <sup>-1</sup>	S <sub>O</sub> mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	S <sub>NO2</sub> mg N L <sup>-1</sup>	S <sub>NO3</sub> mg N L <sup>-1</sup>	X <sub>AOO</sub> mg DQO L <sup>-1</sup>	X <sub>NOO</sub> mg DQO L <sup>-1</sup>	Velocidades de reacción q <sub>j</sub>
Crecimiento de AOO	$\frac{-1}{Y_{AOO}}$	$1 - \frac{3.43}{Y_{AOO}}$	$\frac{1}{Y_{AOO}}$		1		$\mu_{\max}^{AOO} \cdot M_{NH} \cdot M_{O, AOO} \cdot X_{AOO}$
Mortalidad de AOO		1			-1		$b_{AOO} \cdot X_{AOO}$
Crecimiento de NOO		$1 - \frac{1.14}{Y_{NOO}}$	$\frac{-1}{Y_{NOO}}$	$\frac{1}{Y_{NOO}}$		1	$\mu_{\max}^{NOO} \cdot M_{NO2} \cdot M_{O, NOO} \cdot X_{NOO}$
Mortalidad de NOO		1				-1	$b_{NOO} \cdot X_{NOO}$
Aeración		1					$kLa \cdot (S_o^{sat} - S_o)$

$$M_{NH} = \frac{S_{NH}}{S_{NH} + K_{s,AOO}}; M_{O, AOO} = \frac{S_O}{S_O + K_{o, AOO}}; M_{O, NOO} = \frac{S_O}{S_O + K_{o, NOO}}; M_{NO2} = \frac{S_{NO2}}{S_{NO2} + K_{s, NOO}}$$

El modelo tiene en total seis ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO), que corresponde a un balance de masas para cada variable de interés. Utilizando una notación matricial, cada EDO puede formularse de la manera siguiente:

$$\frac{dC_i}{dt} = \sum_j v_{ij} \cdot q_j \tag{Ec. 5.49}$$

El modelo se puede implementar en Matlab y se resuelve usando una herramienta adecuada de ecuaciones diferenciales estándar (ODE45 en Matlab).

```

%% solve the ODE model:
%[time,output] = ODEsolver('Model',[starttime
simulation endtime simulation],Initial conditions for
model variables,simulation options,model parameters);
options=odeset('RelTol',1e-7,'AbsTol',1e-8);
[t,y] = ode45(@nitmod,t,x0,options,par);
    
```

**Paso 1.** Inicialización.

El modelo tiene en total 12 parámetros. Los valores nominales, así como su intervalo se toman de la literatura (Sin *et al.*, 2008) y se muestran en la Tabla 5.2.

El modelo tiene seis variables de estado, todas las cuales necesitan ser especificadas para resolver el sistema de las ecuaciones EDO. La condición inicial correspondiente al ensayo en batch No. 1 se muestra en la Tabla 5.3.

**Paso 2.** Seleccione las mediciones y el subconjunto de parámetros para la estimación de parámetros.

Se utilizaron datos recolectados del ensayo en batch No.1, que incluye mediciones de amonio, nitrito y oxígeno disuelto. Debido a la supresión de la actividad NOO, no se observa producción de nitrato. Puesto que el ensayo No. 1 no está diseñado para la estimación del coeficiente de mortalidad o decaimiento, consideramos todos los parámetros de AOO excepto  $b_{AOO}$  para la estimación. Por lo tanto, nuestra selección es la siguiente:

- $Y = [NH_4 \ NO_2 \ OD]$ ; subconjunto de mediciones seleccionadas,  $Y$ .
- $\theta = [Y_{AOO} \ \mu_{\max}^{AOO} K_{s,AOO} K_{o,AOO}]$ ; subconjunto de parámetros para la estimación.

**Paso 3.** Resolver el problema de la estimación de parámetros.

La estimación de los parámetros se programa como un problema de minimización usando la suma de los cuadrados de los errores, como la función de costo, y se resuelve usando un solucionador de optimización no lineal no restringido (algoritmo *fminsearch* en Matlab) usando el parámetro inicial dado en la Tabla 5.2 y las condiciones iniciales de la Tabla 5.3. Para simular la adición del inhibidor, en las simulaciones del modelo se supone que la velocidad de crecimiento máximo de los NOO es cero. Las mejores estimaciones de los estimadores de parámetros se muestran en la Tabla 5.3.

```

%%step 3 define and solve parameter estimation
problem (as a minimizationproblem)
options =optimset('display',
'iter','tolfun',1.0e-06, 'tolx',1.0e-5,
'maxfunevals', 1000);
[pmin,sse]=fminsearch(@costf,pinit,options,td,yd
,idx,iy);

```

**Tabla 5.2** Valores nominales de los parámetros del modelo usados como valores o estimaciones iniciales para la estimación de parámetros y sus cotas o valores máximos inferiores y superiores.

Parámetro	Símbolo	Unidades	Valor nominal	Intervalo
<b>Organismos oxidantes de amonio (A00)</b>				
Rendimiento de Biomasa	$Y_{A00}$	mg DQO mg N <sup>-1</sup>	0.15	0.11 – 0.21
Velocidad máxima de crecimiento	$\mu_{max}^{A00}$	d <sup>-1</sup>	0.8	0.50 – 2.10
Afinidad del sustrato (NH <sub>4</sub> )	$K_{s,A00}$	mg N L <sup>-1</sup>	0.4	0.14 – 1.00
Afinidad del Oxígeno	$K_{o,A00}$	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	0.5	0.10 – 1.45
Coefficiente de la velocidad de decrecimiento	$b_{A00}$	d <sup>-1</sup>	0.1	0.07 – 0.30
<b>Organismos oxidantes de nitrito (N00)</b>				
Rendimiento de Biomasa	$Y_{N00}$	mg DQO mg N <sup>-1</sup>	0.05	0.03 – 0.09
Velocidad máxima de crecimiento	$\mu_{max}^{N00}$	d <sup>-1</sup>	0.5	0.40 – 1.05
Afinidad del sustrato (NO <sub>2</sub> )	$K_{s,N00}$	mg N <sup>-1</sup>	1.5	0.10 – 3.00
Afinidad del sustrato Oxígeno	$K_{o,N00}$	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	1.45	0.30 – 1.50
Coefficiente de la velocidad de decrecimiento	$b_{N00}$	d <sup>-1</sup>	0.12	0.08 – 0.20
<b>Valor experimental</b>				
Transferencia de masa de oxígeno	$k_{la}$	d <sup>-1</sup>	360	*
Saturación de oxígeno	$S_{o,sat}$	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	8	*

\* No estimados en este ejemplo, pero se asumen conocidos.

**Tabla 5.3** Condiciones o valores iniciales de las variables de estado para el modelo en el ensayo en batch No. 1.

Variable	Símbolo	Unidades	Valor inicial	Comentario
Amonio	$S_{NH}$	mg N L <sup>-1</sup>	20	Adición de un pulso
Oxígeno	$S_O$	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	8	Saturación
Nitrito	$S_{NO2}$	mg N L <sup>-1</sup>	0	Post desnitrificado
Nitrato	$S_{NO3}$	mg N L <sup>-1</sup>	0	Post desnitrificado
Biomasa A00	$X_{A00}$	mg DQO L <sup>-1</sup>	75	La relación de A00/ N00 refleja la relación de sus rendimientos
Biomasa N00	$X_{N00}$	mg DQO L <sup>-1</sup>	25	

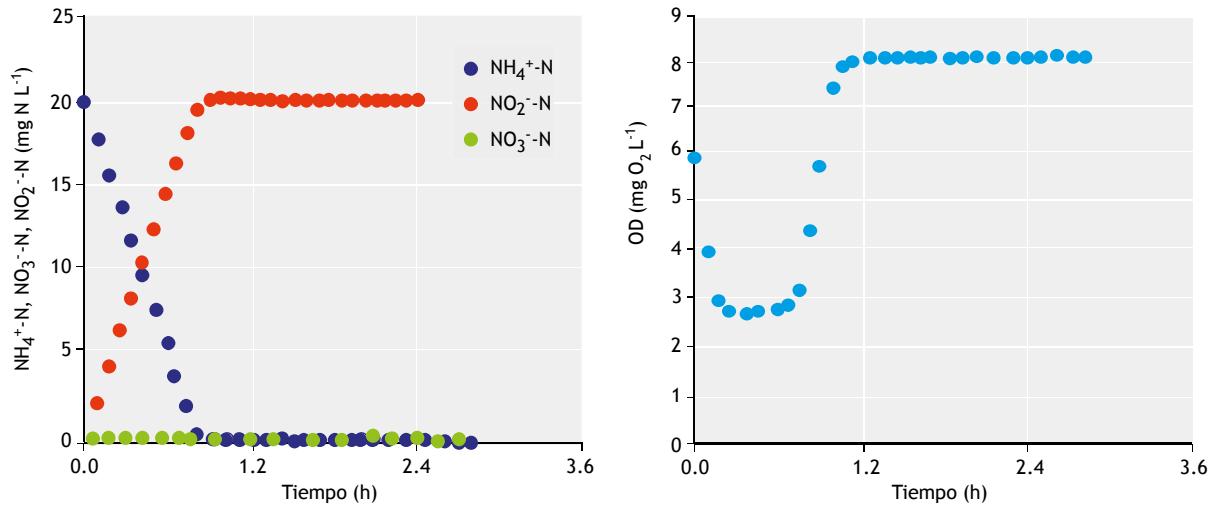


Figura 5.2 Datos recolectados en la prueba en batch No. 1. NH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub> y el OD se usan como el conjunto de datos medidos.

**Paso 4.** Estimar la incertidumbre de los estimadores de los parámetros y de la predicción del modelo.

En este paso, se calcula la matriz de covarianza de los estimadores de los parámetros. A partir de la matriz de covarianza, se obtienen la desviación estándar, el intervalo de confianza del 95% y la matriz de correlación. Los resultados se muestran en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 Valores óptimos de los estimadores de los parámetros.

Parámetros	Predicción inicial $\hat{\theta}^0$	Valor óptimo, $\hat{\theta}$
$Y_{A00}$	0.1	0.15
$\mu_{max}^{A00}$	0.8	1.45
$K_s, A00$	0.4	0.50
$K_o, A00$	0.5	0.69

```

%% get the Jacobian matrix. use built-in
"lsqnonlin.m" but with no iteration.
options =optimset('display',
'iter', 'tolfun',1.0e-06, 'tolx',1.0e-5,
'maxfunevals', 0);
[~,~,residual,~,~,jacobian]=lsqnonlin(@cost1,p
min,[],[],options,td,yd,idx,iy);
j(:,:)=jacobian; e=residual;
s=e'*e/dof; %variance of errors
%% calculate the covariance of parameter
estimators
pcov = s*inv(j'*j) ;%covariance of parameters
psigma=sqrt(diag(pcov))'; % standard deviation
parameters
    
```

```

pcor = pcov ./ [psigma'*psigma]; % correlation
matrix
alfa=0.025;% significance level
tcr=tinv((1-alfa),dof); % critical t-dist value
at alfa
p95 =[pmin-psigma*tcr; pmin+psigma*tcr]; %+-95%
confidence intervals
    
```

Utilizando la matriz de covarianza de los estimadores de los parámetros, también se calcula la incertidumbre en la predicción del modelo (presentados en la Figura 5.3).

```

%% calculate confidence intervals on the model
output
ycov = j * pcov * j';
ysigma=sqrt(diag(ycov)); % std of model outputs
ys=reshape(ysigma,n,m);
y95 = [y(:,iy) - ys*tcr y(:,iy)+ys*tcr]; % 95%
confidence intervals
    
```

**Paso 5.** Revisión y análisis de los resultados. Los valores de los parámetros estimados (Tabla 5.5) se encuentran dentro del intervalo reportado en la literatura.

Esto indica que los valores de los parámetros son aceptables. La incertidumbre de estos estimadores se aprecia bastante baja. Por ejemplo, el error relativo (desviación estándar/valor medio de los valores de parámetro) es menor del 10%, lo que también se refleja en un intervalo de confianza pequeño. Esto indica que la calidad de la estimación de parámetros es buena. Por lo general se observa que un error relativo superior al 50%



es indicativo de mala calidad de estimación, mientras que el error relativo por debajo del 10% es bueno.

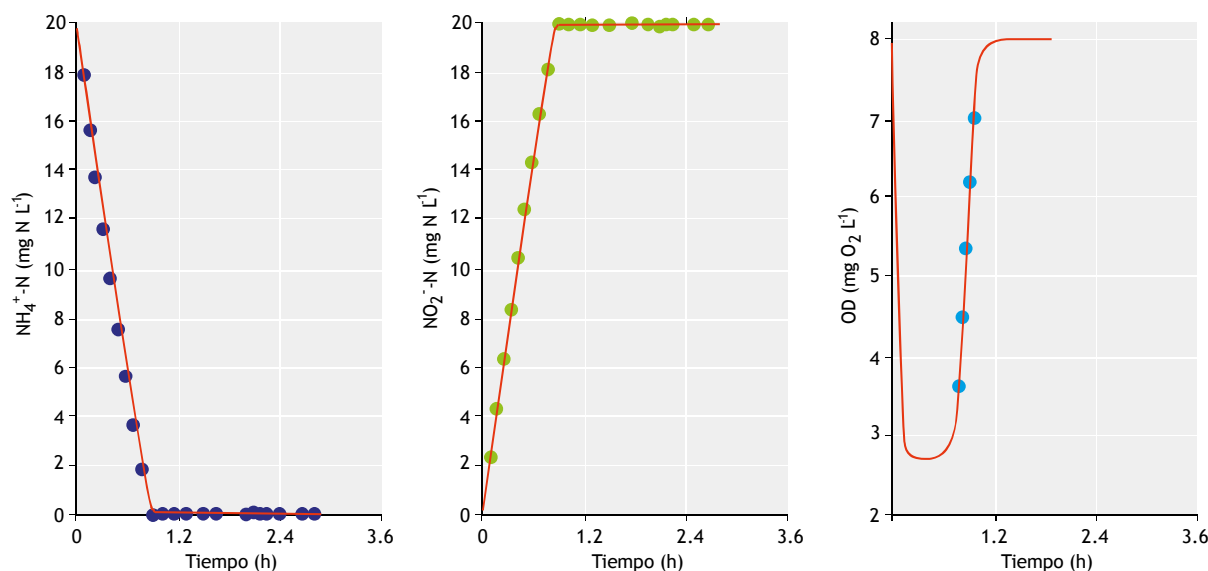
Tal como es típico en la estimación de parámetros de modelos de tipo Monod a partir de datos en batch, en la matriz de correlación, se aprecia que el rendimiento de crecimiento se correlaciona significativamente con la velocidad de crecimiento (el coeficiente de correlación lineal máxima es 0.96). También es notable la correlación entre la velocidad máxima de crecimiento y

la constante de afinidad con el oxígeno. Esto significa que no es posible una estimación única del rendimiento y la velocidad máxima de crecimiento. La investigación adicional de esta correlación requiere un análisis de sensibilidad, que se muestra en el Ejemplo 5.5.

Esto concluye el análisis de la estimación de los parámetros utilizando el método de mínimos cuadrados no lineales para los parámetros de los AOO.

**Tabla 5.5** Calidad de la estimación de los parámetros para el proceso de oxidación del amonio: desviación estándar, intervalos de confianza del 95% y matriz de correlación.

Parámetro	Valor óptimo, $\hat{\theta}$	Desviación estándar, $\sigma_{\theta}$	Intervalos de confianza del 95% (CI)		Matriz de correlación			
					$Y_{AOO}$	$\mu_{max}^{AOO}$	$K_{s,AOO}$	$K_{O,AOO}$
$Y_{AOO}$	0.15	0.0076	0.130	0.160	1	0.96	0.0520	0.17
$\mu_{max}^{AOO}$	1.45	0.0810	1.290	1.610		1	0.0083	0.42
$K_{s,AOO}$	0.50	0.0180	0.470	0.540			1	-0.26



**Figura 5.3** Resultados del modelo que incluyen los intervalos de confianza del 95 %, calculados usando la propagación lineal de errores (líneas rojas). Los resultados se comparan con el conjunto de datos experimentales.

## Parte 2. Estimar los parámetros para la etapa correspondiente a los NOO.

**Pasos 1 y 2.** Condiciones iniciales y selección de datos y subconjuntos de parámetros para la estimación de los parámetros.

La misma condición inicial para la prueba o ensayo del batch No. 1 se usa en la prueba No. 2, pero sin adición de inhibidor, lo que significa que en este ejemplo la nitratación está activa. Los datos recogidos de la prueba No. 2 se muestran en la Figura 5.4, que incluye mediciones de amonio, nitrito, nitrato y OD.

- $Y_2 = [NH_4 \ NO_2 \ NO_3 \ OD]$ ; conjunto de mediciones seleccionado,  $Y$ .

Los valores de los parámetros de los AOO se ajustaron a los valores estimados (Tabla 5.4) en la primera parte y son por lo tanto conocidos, mientras que

el rendimiento y los parámetros cinéticos los NOO se pueden identificar a partir de los datos:

- $\theta_2 = [Y_{NOO} \ \mu_{max}^{NOO} K_{s,NOO} K_{o,NOO}]$ ; conjunto de parámetros para la estimación.

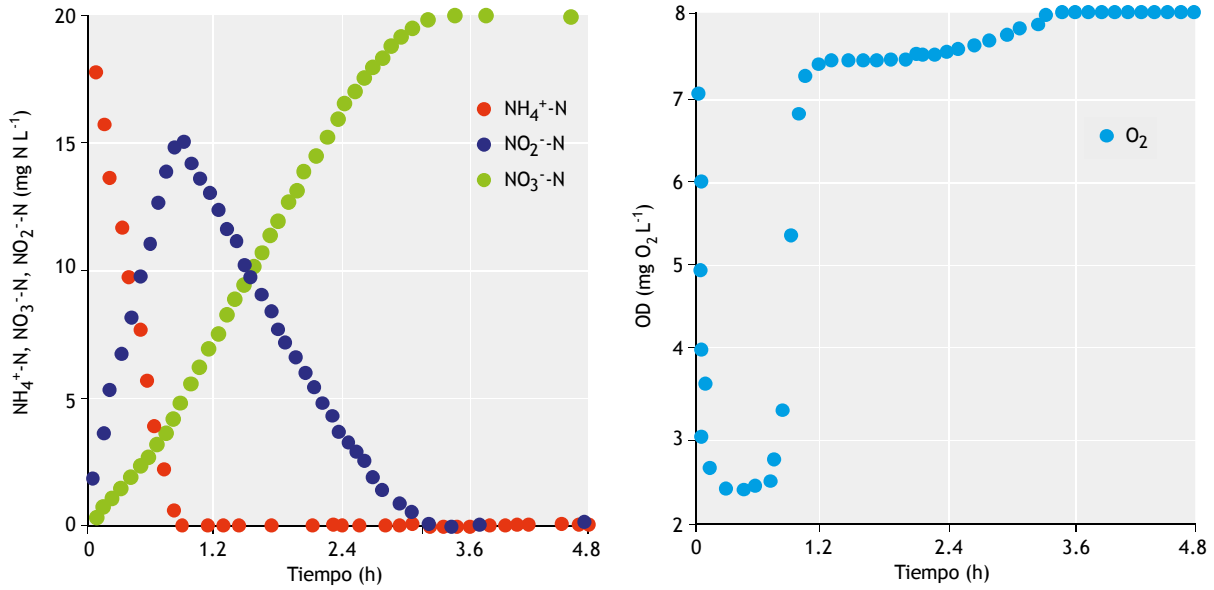


Figura 5.4 Datos medidos de la prueba en batch No. 2.

**Pasos 3 y 4.** Resuelva el problema de estimación de los parámetros y calcule la incertidumbre de estimación de parámetros.

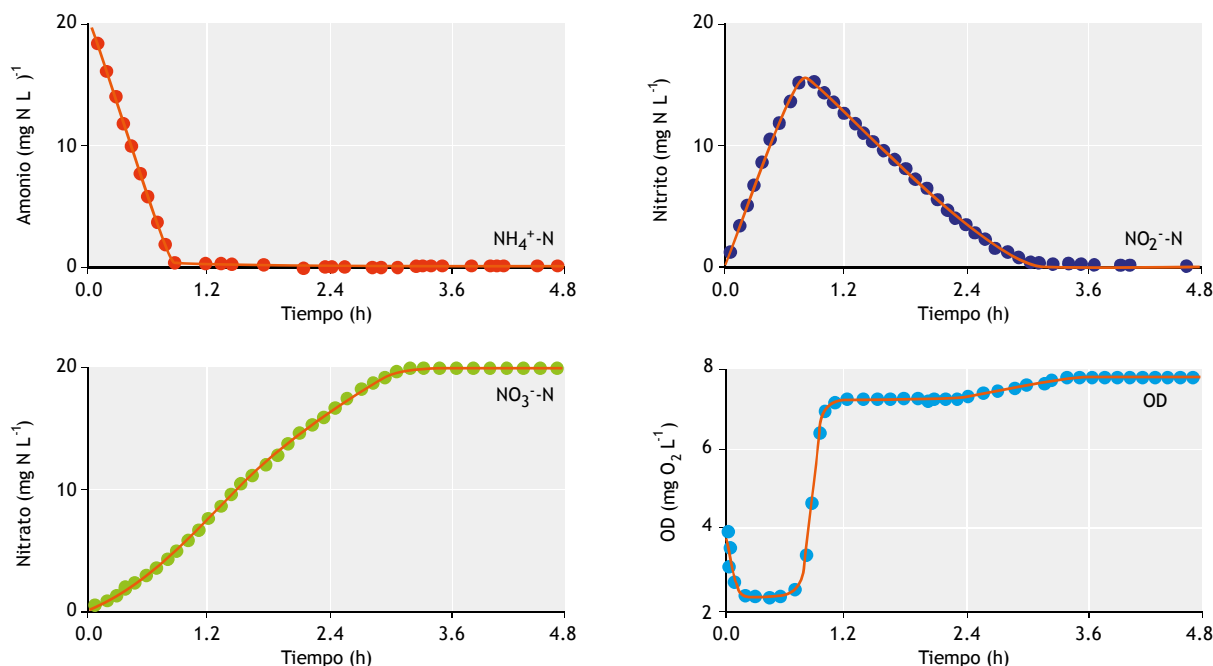
Los parámetros de los AOO se han estimado previamente en la Parte 1. Los resultados de la solución del problema de estimación de parámetros, así como la incertidumbre de parámetros para los NOO se muestran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6 Valores óptimos de los estimadores de los parámetros después de resolver el problema de la estimación de los parámetros.

Parámetros	Valores óptimos, $\hat{\theta}$	Desviación estándar, $\sigma_{\theta}$	Intervalos de confianza del 95 % (CI)		Matriz de correlación			
			Valor inferior	Valor superior	$Y_{NOO}$	$\mu_{max}^{NOO}$	$K_{s,NOO}$	$K_{o,NOO}$
$Y_{NOO}$	0.04	0.01	0.01	0.07	1.00	1.00	0.54	-0.86
$\mu_{max}^{NOO}$	0.41	0.13	0.15	0.66		1.00	0.55	-0.86
$K_{s,NOO}$	1.48	0.03	1.42	1.55			1.00	-0.37
$K_{o,NOO}$	1.50	0.05	1.39	1.60				1.00

En la Figura 5.5 se muestra la propagación lineal del error de estimación de los parámetros (matriz de

covarianza) a la incertidumbre en la predicción del modelo.



**Figura 5.5** Resultados del modelo que incluyen los intervalos de confianza del 95 % comparados con los datos experimentales.

**Paso 5.** Revisión y análisis de los resultados Los valores de los parámetros estimados están dentro del intervalo reportado en la literatura para los NOO, lo que los hace admisibles. Sin embargo, esta vez el error de estimación de los parámetros es notablemente más alto, por ejemplo el error relativo (la relación de la desviación estándar respecto al valor óptimo del parámetro) es superior al 30%, especialmente para el rendimiento y la velocidad máxima de crecimiento. Esto no es sorprendente ya que la estimación tanto del rendimiento como de la velocidad máxima de crecimiento están totalmente correlacionadas (el coeficiente de correlación lineal por pares es 1). Estas estadísticas significan que no es posible una estimación única de parámetros para el rendimiento, la velocidad de crecimiento máximo y el coeficiente de media saturación de oxígeno de los NOO (el coeficiente de correlación lineal por pares es de 0.86) con este experimento discontinuo. Por lo tanto, este subconjunto de parámetros debe considerarse como un subconjunto que proporciona un buen ajuste a los datos experimentales, mientras que individualmente cada valor del parámetro puede no tener un significado físico sensible.

La propagación de la matriz de la covarianza de los parámetros a la incertidumbre de predicción del modelo,

indica baja incertidumbre en las predicciones del modelo. Esto significa que, aunque los parámetros en sí no son identificables de forma única, todavía pueden utilizarse para realizar predicciones de modelos, por ejemplo para describir los datos de las pruebas en batch. Sin embargo, mientras se realizan simulaciones con el modelo también es necesario informar los intervalos de confianza del 95% de los valores simulados. Este último refleja cómo la covarianza de las estimaciones de parámetros (implicando la calidad de la estimación de los parámetros) afecta la calidad de la predicción del modelo. Por ejemplo, si el intervalo de confianza del 95% de las predicciones del modelo es bajo, entonces el efecto del error de estimación del parámetro es insignificante.

Con la Parte 1 y Parte 2 concluye la estimación de los parámetros para la etapa de nitrificación en dos etapas. Los resultados muestran que la calidad de la estimación de parámetros para los AOO es relativamente mayor que la de los NOO usando datos obtenidos en batch para estos experimentos. Esta pobre identificación será investigada más adelante, usando el análisis de sensibilidad para mejorar la identificabilidad de los parámetros individuales del modelo.

Con respecto a los errores de predicción del modelo, el intervalo de confianza del 95% en los resultados del modelo es bastante bajo. Esto significa que los efectos de los errores de estimación de los parámetros sobre las predicciones del modelo son bajos.

#### Ejemplo 5.4 Estimar los parámetros de oxidación de amonio utilizando datos de la prueba en batch - método bootstrap

En este ejemplo, se investiga el problema de estimación de los parámetros en la parte 1 del Ejemplo 5.3. Se

utilizaron los datos de la prueba en batch No. 1 para estimar los parámetros de los AOO.

**Paso 1.** Realizar una estimación de los parámetros de referencia utilizando mínimos cuadrados no lineales. El procedimiento de trabajo en este paso es exactamente el mismo que los pasos 1, 2 y 3 del ejemplo 5.3. El resultado de este paso estará dado por el mejor ajuste a los datos y de la distribución de los residuos. (Figura 5.6).

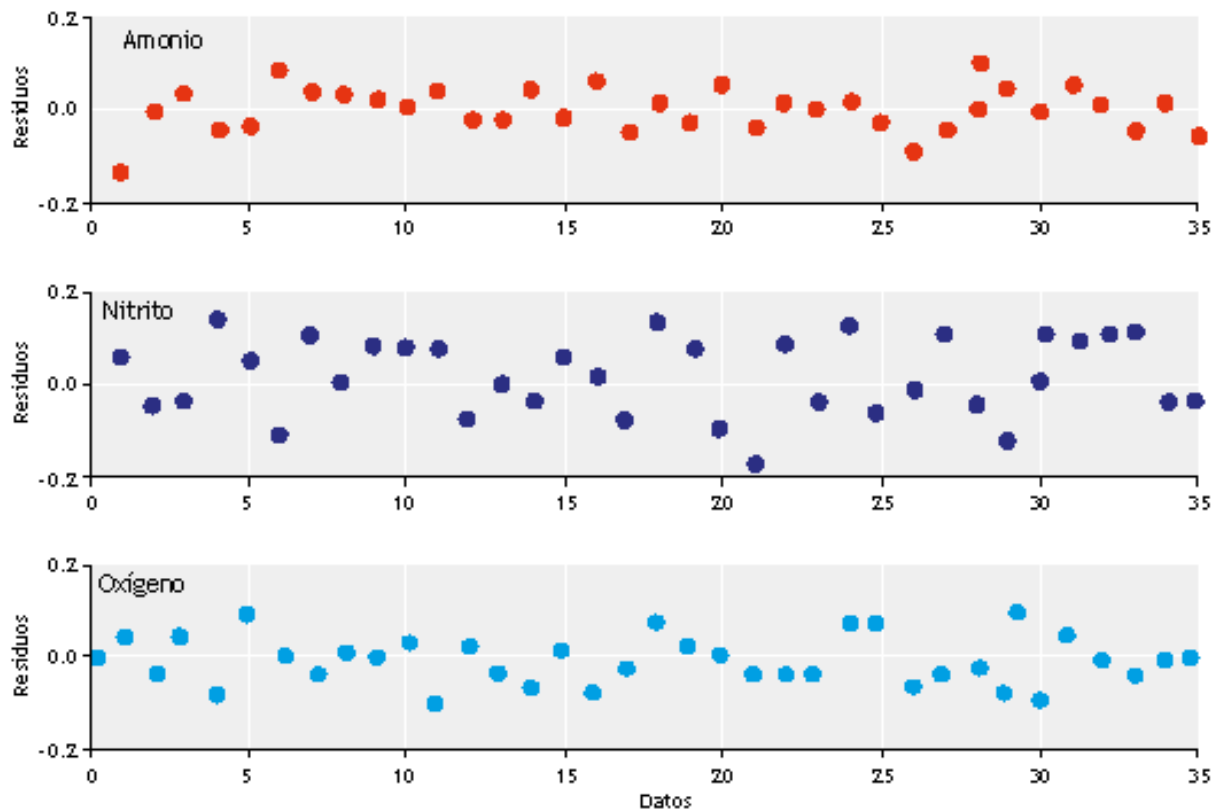
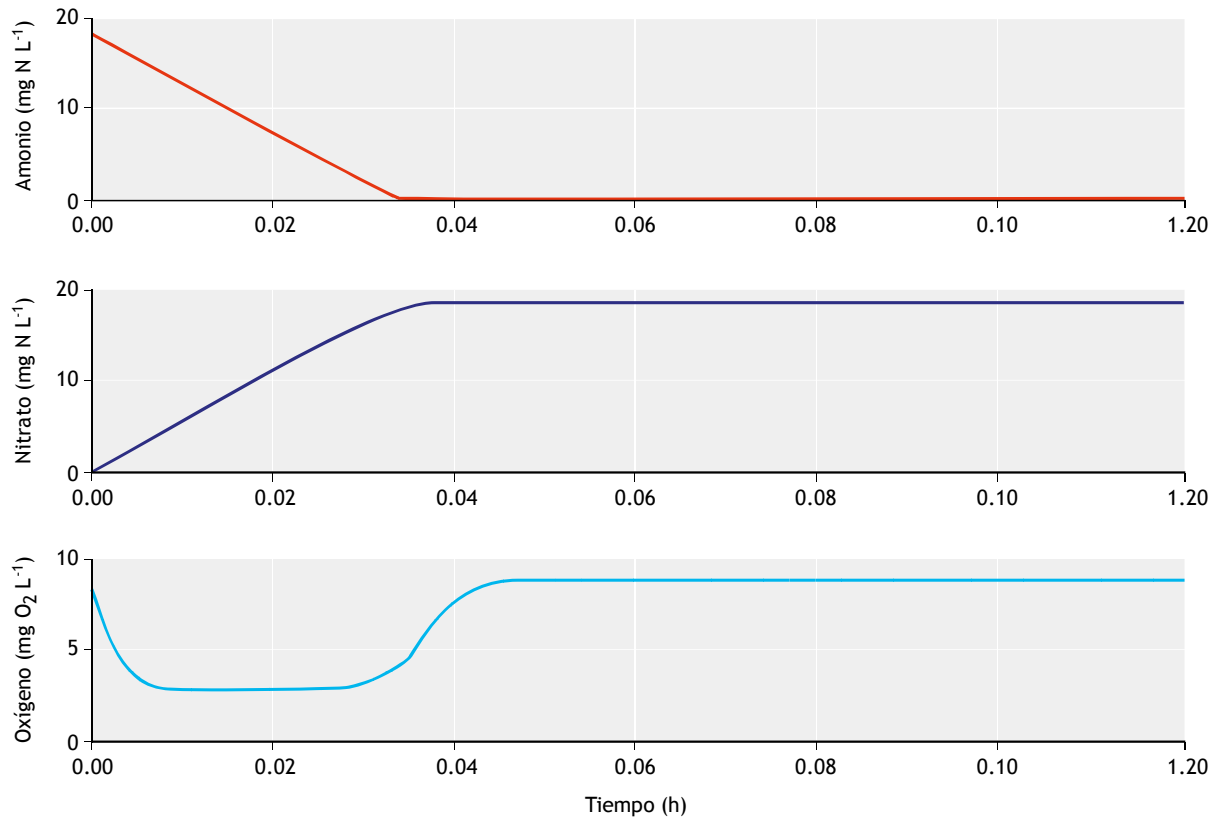


Figure 5.6 Datos residuales de la estimación de referencia de parámetros.

**Paso 2.** Generar datos sintéticos mediante el muestreo bootstrap y repetir la estimación de los parámetros.

En este paso, se realiza el muestreo de los datos residuales. Se realizan cincuenta muestras de datos residuales (muestreo aleatorio con reemplazos) y se introducen en el modelo, con lo que se tienen 50 conjuntos sintéticos de datos de medición tal como se muestran en la Figura 5.7.

```
nboot=50;% bootstrap samples
for i=1:nboot
disp(['the iteration number is : ',num2str(i)])
onesam =ceil(n*rand(n,m)); % random sampling
with replacement
rsam =res(onesam); % measurement errors for each
variable
```

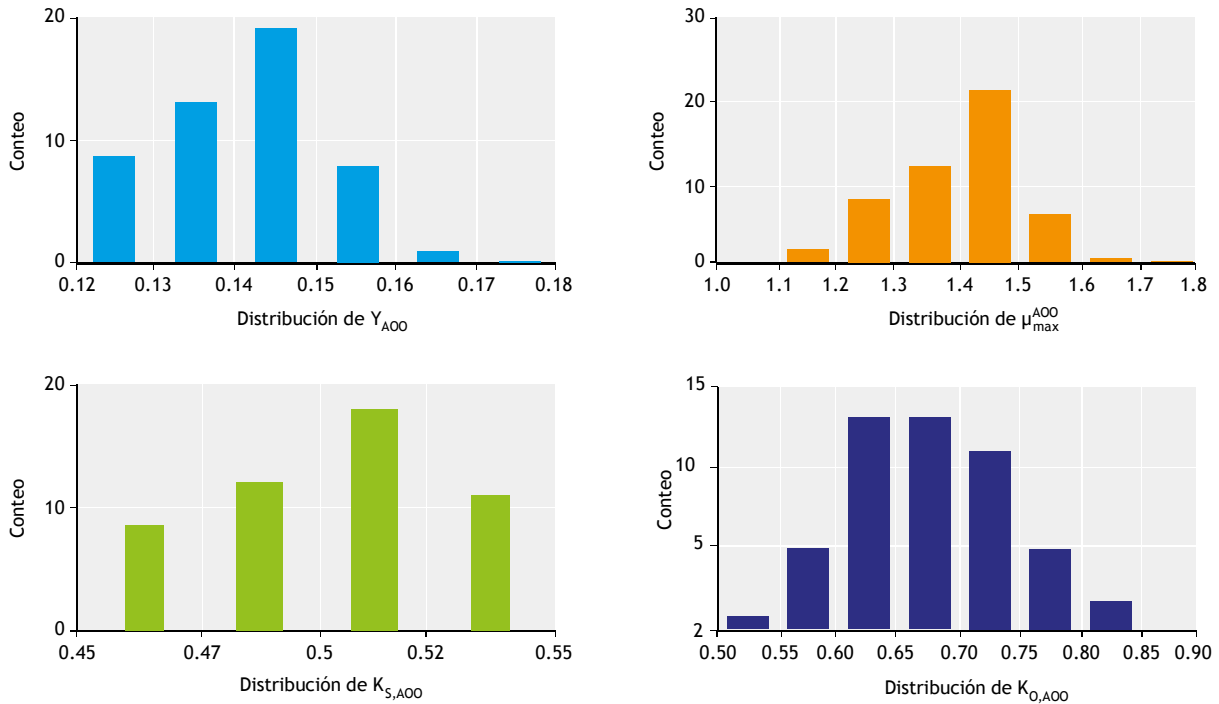


**Figura 5.7** Generación de datos sintéticos usando el muestreo bootstrap de los residuos (50 muestras en total).

Para cada uno de estos datos sintéticos (muestras bootstrap), se realiza la estimación de los parámetros y se registran los resultados para su análisis. Debido a que se generan 50 conjuntos de datos sintéticos, esto significa

que se obtienen 50 estimaciones diferentes de los parámetros. Los resultados para cada parámetro estimado se muestran como histograma en la Figura 5.8.





**Figura 5.8** Distribución de los estimados de los parámetros obtenidos usando el método bootstrap (cada distribución contiene 50 valores estimados para cada parámetro).

**Tabla 5.7** Valores óptimos de los estimadores de los parámetros después de resolver el problema de la estimación de los parámetros

Parámetro	Valor óptimo, $\hat{\theta}$	Desviación estándar, $\sigma_{\theta}$	Matriz de correlación			
			$Y_{A00}$	$\mu_{\max}^{A00}$	$K_{s,A00}$	$K_{o,A00}$
$Y_{A00}$	0.14	0.01	1.00	0.97	-0.03	0.20
$\mu_{\max}^{A00}$	1.40	0.11		1.00	-0.07	0.41
$K_{s,A00}$	0.50	0.02			1.00	-0.28
$K_{o,A00}$	0.68	0.07				1.00

**Paso 3.** Revisión y análisis de los resultados. El paso 2 proporcionó una matriz de las estimaciones de los parámetros,  $\theta_{50 \times 4}$ . En este paso, se evalúan las propiedades de la media, la desviación estándar y de la matriz de correlación de esta matriz (Tabla 5.7).

```

.%step 3 Evaluate/interpret distribution of theta
disp('The mean of distribution of theta are')
disp(mean(pmin))
disp('The std.dev. of distribution of theta are')
disp(std(pmin))
disp('')
disp('The correlation of parameters')
disp(corr(pmin))
    
```

Todos los resultados, incluyendo las estimaciones de los parámetros medios, su desviación estándar y la matriz de correlación están en correspondencia con las estimaciones de los parámetros obtenidos del método de mínimos cuadrados no lineales (compare con la Tabla 5.6). Esto es de esperar, ya que la distribución de los residuos es bastante semejante a una distribución normal (Figura 5.6). En este caso, los mínimos cuadrados no lineales (y la aproximación lineal de la estimación de la matriz de covarianza), así como el método bootstrap obtendrán resultados estadísticamente similares.

También la simulación del modelo con los valores medios obtenidos de las muestras de bootstrap proporcionó un ajuste igualmente bueno a los datos medidos, como se muestra en la Figura 5.3.

Debido a que el método bootstrap es intuitivamente simple y directo y no requiere un cálculo de la matriz Jacobiana, lo recomendamos para uso práctico. Sin embargo, una precaución sobre el uso de este método es que la distribución de los residuos debe ser inspeccionada y no debe contener ningún comportamiento sistemático (indicando la estructura del modelo o cuestiones de medición sistemático).

```
% get the Jacobian matrix. use built-in
"lsqnonlin.m" but with no iteration.
options =optimset('display',
'iter','tolfun',1.0e-06, 'tolx',1.0e-5,
'maxfunvals', 0);
[~,~,residual,~,~,jacobian]=lsqnonlin(@cost1,p
min,[],[],options,td,yd,idx,iy);
j(:,:)=jacobian; e=residual;
s=e'*e/dof; %variance of errors
% calculate the covariance of parameter
estimators
pcov = s*inv(j'*j) ; %covariance of parameters
psigma=sqrt(diag(pcov)); % standard deviation
parameters
pcor = pcov ./ [psigma'*psigma]; % correlation
matrix
alfa=0.025;% significance level
tcr=tinv(1-alfa),dof); % critical t-dist value
at alfa
p95 =[pmin-psigma*tcr; pmin+psigma*tcr]; %+-95%
confidence intervals
```

### Ejemplo 5.5 Análisis de sensibilidad e identificabilidad de los parámetros del proceso de oxidación del amonio en ensayos batch

Aquí se utiliza el procedimiento de oxidación de amonio como se describe en el Ejemplo 5.3. El objetivo de este ejemplo es doble: en la primera parte, evaluar la sensibilidad de todos los parámetros de los AOO a todas las predicciones del modelo bajo las condiciones experimentales de la prueba en batch No. 1. En la segunda parte examinar, dado el conjunto de datos medidos, cuáles subconjuntos de parámetros son potencialmente identificables y compararlos con el subconjunto de parámetros utilizado en la estimación de los parámetros en el Ejemplo 5.3.

**Paso 1.** Inicio. Utilizar las condiciones iniciales de la prueba o ensayo en batch No. 1 como se describe en la Tabla 5.3, así como los valores nominales de los parámetros de los AOO en el modelo como se muestra en la Tabla 5.2.

Los resultados de interés del modelo son:

- $y = [\text{NH}_4 \text{ NO}_2 \text{ NO}_3 \text{ OD, AOO, NOO}]$

El conjunto de parámetros de interés es:

- $\theta = [Y_{\text{AOO}} \mu_{\text{max}}^{\text{AOO}} K_{\text{s,AOO}} K_{\text{o,AOO}} b_{\text{AOO}}]$

**Paso 2.** Cálculo y análisis de las funciones de sensibilidad. En este paso, las funciones de sensibilidad absoluta se calculan usando diferenciación numérica y los resultados se registran para ser analizados.

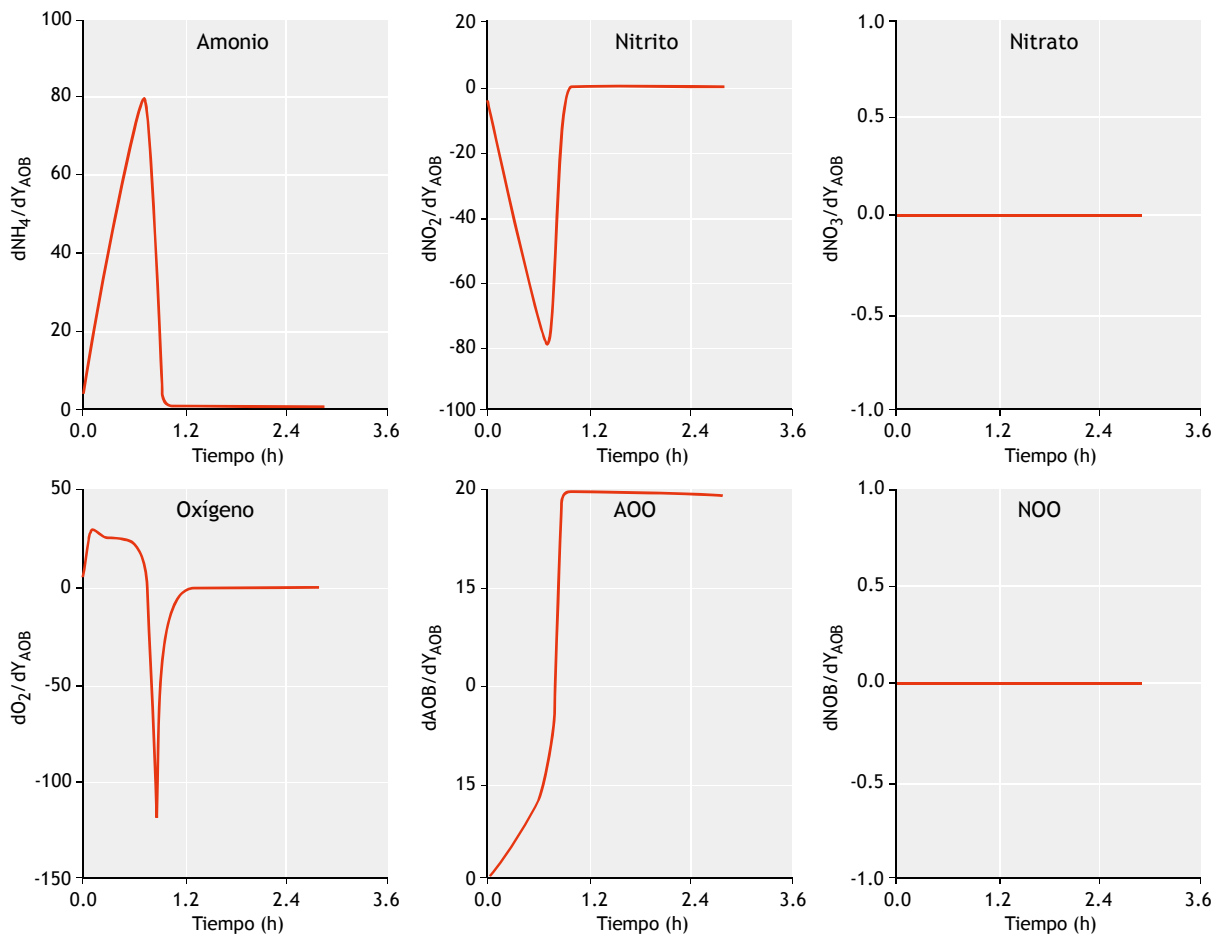
```
for i=1:m; %for each parameter
    dp(i) = pert(i) * abs(ps(i)); % parameter
    perturbation
    p(i) = ps(i) + dp(i); % forward perturbation
    [t1,y1] = ode45(@nitmod,td,x0,options,p);
    p(i) = ps(i) - dp(i); %backward perturbation
    [t2,y2] = ode45(@nitmod,td,x0,options,p);
    dydpc(:, :, i) = (y1-y2) ./ (2 * dp(i));
%central difference
    dydpf(:, :, i) = (y1-y) ./ dp(i); %forward
    difference
    dydpb(:, :, i) = (y-y2) ./ dp(i); %backward
    difference
    p(i)=ps(i); % reset parameter to its
    reference value
end
```

Con el propósito de realizar un examen detallado, las funciones de sensibilidad de salida (absolutas) se representan en la Figura 5.9 para un parámetro, denominado, rendimiento de crecimiento de los AOO. La interpretación de la función de sensibilidad es la siguiente: (i) mayor magnitud (positiva o negativa) significa mayor influencia, mientras que una magnitud inferior o casi cero significa influencia despreciable/cero del parámetro sobre la salida, (ii) sensibilidad negativa significa que un aumento en un valor del parámetro disminuiría la salida del modelo y (iii) la sensibilidad positiva significa que un aumento en un valor del parámetro aumentaría la salida del modelo. Teniendo esto presente, se observa que el rendimiento de los AOO tiene un efecto positivo sobre el amonio y un impacto igualmente negativo sobre el nitrito. Esto se espera de la estructura del modelo donde hay una relación inversa entre el rendimiento y el consumo de amonio (sustrato). Un rendimiento más alto significa que se consume menos amonio por unidad de crecimiento de biomasa, y por lo tanto también significaría más amonio presente en la prueba en batch. Puesto que se consume menos amonio,

se produciría menos nitrito (de ahí la correlación negativa).

Por otra parte, también se observa que la sensibilidad del parámetro de rendimiento aumenta gradualmente durante la fase de crecimiento lineal y comienza a disminuir a medida que estamos más cerca del agotamiento del amonio. Una vez que el amonio se agota, la sensibilidad se convierte en nula, tal como se esperaba. Como se predijo, el rendimiento tiene un impacto positivo en el crecimiento de los AOO, ya que

un mayor rendimiento significa mayor producción de biomasa. Con respecto al oxígeno, el rendimiento tiene primero un impacto positivo que se vuelve negativo hacia el agotamiento del amonio. Esto significa que existe una relación no lineal entre el perfil de oxígeno y el parámetro de rendimiento. Como se esperaba, el rendimiento de los AOO no tiene impacto sobre las predicciones de nitrato y los NOO en la prueba en batch No. 1, debido a la adición del inhibidor que suprimió de manera efectiva la segunda etapa de nitrificación.



**Figura 5.9** Sensibilidad absoluta del rendimiento de los AOO en todas las predicciones o resultados del modelo.

En el análisis de sensibilidad, la información que se obtiene es la comparación de las funciones de sensibilidad entre sí. Esto se hace en la Figura 5.10 usando funciones de sensibilidad adimensionales, que se obtienen escalando la función de sensibilidad absoluta

con sus respectivos valores nominales de los parámetros y predicciones (Ec. 5.41). La Figura 5.10 representa la sensibilidad de todos los parámetros del modelo con respecto a las seis predicciones del mismo. Cada sub-tramo de la figura presenta las funciones de sensibilidad

de todos los parámetros con respecto a una salida del modelo mostrado en la leyenda. El eje y, indica la medida de sensibilidad adimensional, mientras que el eje x indica el tiempo durante la actividad en batch. Por ejemplo, observamos que la sensibilidad de los parámetros de nitrato y de los organismos NOO es cero. Esto es lógico ya que se supone que la actividad de los NOO es cero en esta simulación.

Para las predicciones de amonio, nitrito y oxígeno del modelo, las funciones de sensibilidad del rendimiento y la velocidad máxima de crecimiento para los AOO siguen una tendencia / patrón inversamente proporcional. Esta relación inversa es la razón por la cual el problema de la estimación de los parámetros es un problema mal condicionado. Esto significa que, si el algoritmo de búsqueda aumenta el rendimiento y al mismo tiempo disminuye la velocidad de crecimiento máximo en una

determinada fracción, el efecto sobre la salida del modelo podría ser anulada. El resultado es que muchas combinaciones de valores de los parámetros para el rendimiento y la velocidad de crecimiento máximo pueden tener un efecto similar sobre la salida del modelo. Esta es la razón por la que se obtiene un alto coeficiente de correlación después de la estimación de los parámetros. Esto significa que para que un parámetro sea unívocamente identificable, sus funciones de sensibilidad deben ser únicas y no estar correlacionadas con la función de sensibilidad de otros parámetros.

Otro punto de interés con respecto a estos gráficos es que el efecto relativo (es decir, la magnitud de los valores en el eje y) de los parámetros sobre el amonio, el oxígeno y el nitrito es bastante similar. Esto significa que las tres variables son igualmente relevantes e importantes para estimar estos parámetros.

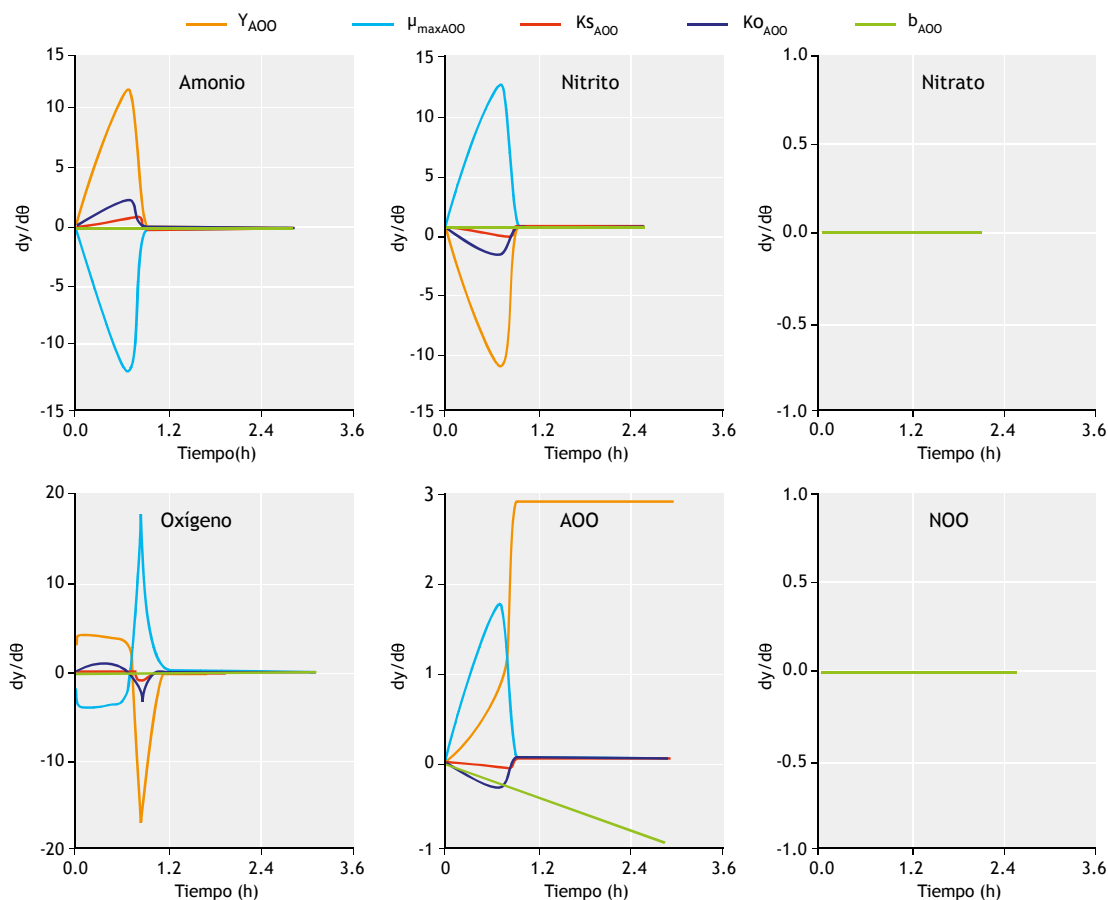
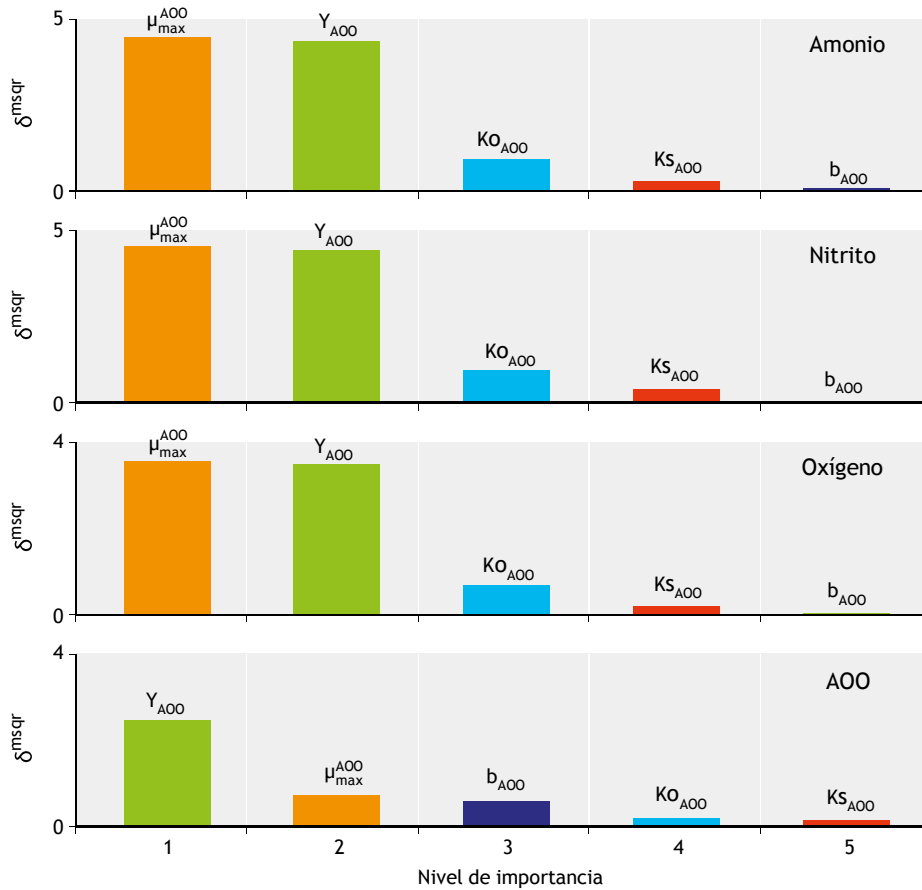


Figura 5.10. Funciones de sensibilidad relativa de los parámetros A00 sobre las predicciones del modelo.

**Paso 3.** Clasificación de la significación de los parámetros. En este paso, la importancia de los parámetros se clasifica resumiendo las funciones de sensibilidad adimensional de los parámetros en las predicciones del modelo utilizando la medida  $\delta^{msqr}$ . Los resultados se muestran en la Figura 5.11.

Los resultados muestran que las velocidades de decaimiento de los AOO tienen un efecto casi nulo en las tres variables medidas (amonio, nitrito y oxígeno) y por lo tanto no pueden ser estimadas. Esto se conoce de la

ingeniería de procesos y por esta razón, no se utilizan pruebas de batch a corto plazo para determinar las constantes de desintegración o mortalidad. Por lo tanto, este resultado confirma que el análisis de sensibilidad es correcto. Con respecto a la velocidad máxima de crecimiento y al rendimiento, estos parámetros son igualmente importantes seguido por la constante de afinidad para el oxígeno y el amonio. Esto indica que al menos cuatro parámetros se pueden estimar potencialmente a partir del conjunto de datos.



**Figura 5.2** Clasificación de la influencia de los parámetros AOO con respecto a las predicciones del modelo.

**Paso 4.** Análisis de identificabilidad.

En este paso, se usan las funciones normalizadas de sensibilidad para precisar cuáles conjuntos de parámetros tienen un bajo índice de colinealidad. El índice de colinealidad es una medida de como dos

funciones de sensibilidad se alinean, implicando una dependencia lineal.



```

for i = 2:subset
    combos = combnk(set,i); % all possible
parameter combinations of different subset size
(2,3,4...)
    for j=1:n
        tempn = snormy(:,combos(j,:)) ;
        tempa = say(:,combos(j,:)) ;
        nsm = tempn'*tempn; % normalized
sensitivity matrix
        asm = tempa'*tempa; % absolute
sensitivity matrix, fim
        dtm = sqrt(det(asm))^(1/(i*2));
%determinant index
        col = 1/sqrt(min(eig(nsm))); %
collinearity index
        subs(j,:) = [k i col dtm] ;
    end
end

```

El análisis de identificabilidad indica que hay 26 combinaciones diferentes de los subconjuntos de parámetros que pueden usarse potencialmente para la estimación de parámetros utilizando las mediciones de amonio, nitrito y oxígeno (Tabla 5.8). El valor del índice de colinealidad cambió de 1.2 a 53 y en general tiende a aumentar para tamaños de subconjuntos de parámetros más grandes. El subconjunto de parámetros K#21 es el utilizado en la estimación de los parámetros anteriores (véanse los ejemplos 5.3 y 5.4). Este subconjunto tiene un índice de colinealidad de 45, que es mucho más alto que los valores de referencia típicamente considerados de 5-15 para un subconjunto que se considera prácticamente identificable (Brun *et al.*, 2002). Como se muestra aquí, el análisis habría diagnosticado el problema antes de realizar la estimación de parámetros (EP) y esto habría indicado que este subconjunto no era adecuado para la estimación.

Sin embargo, dado que la sensibilidad de  $b_{AOO}$  no influyó en las predicciones (véase el paso 3), cualquier subconjunto que contenga este parámetro no se recomendaría para la estimación de parámetros. No obstante, quedan varios subconjuntos que cumplen un umbral de 5-15 para  $\gamma_K$  que pueden ser considerados para el problema de estimación de parámetros. Los subconjuntos de parámetros sombreados en la Tabla 5.8 cumplen estos criterios de identificabilidad y, por lo tanto, pueden usarse para la estimación de parámetros. La mejor práctica es comenzar con el subconjunto de parámetros con el tamaño más grande (de parámetros) y el valor más bajo de  $\gamma_K$ . El tener en cuenta estas

consideraciones de la sensibilidad y el índice de colinealidad de los subconjuntos de parámetros, ayuda a evitar el problema de estimación de parámetros no condicionados y a mejorar la calidad de los parámetros estimados.

### Ejemplo 5.6 Estimación del modelo de predicción de la incertidumbre del modelo de nitrificación - método de Monte Carlo

En este ejemplo, se propaga la incertidumbre de los parámetros resultantes de la estimación de parámetros (como por ejemplo, de los Ejemplos 5.3 y 5.4) para modelar la incertidumbre de los resultados usando el método de Monte Carlo. Para el análisis de la incertidumbre, el problema se define de la siguiente manera: (i) sólo se considera la incertidumbre en los parámetros de los valores de AOO estimados, (ii) se toman en cuenta las condiciones experimentales de la prueba en batch No.1 (Tabla 5.3), y (iii) el modelo en la Tabla 5.1 se utiliza para describir el sistema y los valores de los parámetros nominales en la Tabla 5.2.

**Paso 1.** Definición de la incertidumbre de los datos de entrada. Como se define en la formulación del problema anterior, sólo se tienen en cuenta la incertidumbre en los parámetros de los AOO estimados:

- $\theta_{\text{entrada}} = [Y_{AOO} \mu_{\text{max}}^{AOO} K_{s,AOO} K_{o,AOO}]$ .

Las estimaciones de las desviaciones media y estándar se obtienen del método bootstrap junto con su matriz de correlación (Tabla 5.7). Además, se supone que estos parámetros siguen una distribución normal o distribución normal multivariada, ya que tienen una matriz de covarianza y están correlacionados. Esta suposición se puede verificar mediante el cálculo de la función de densidad empírica para cada parámetro utilizando la matriz de estimaciones de parámetros ( $\theta_{50 \times 4}$ ) y se muestra en la Figura 5.12.

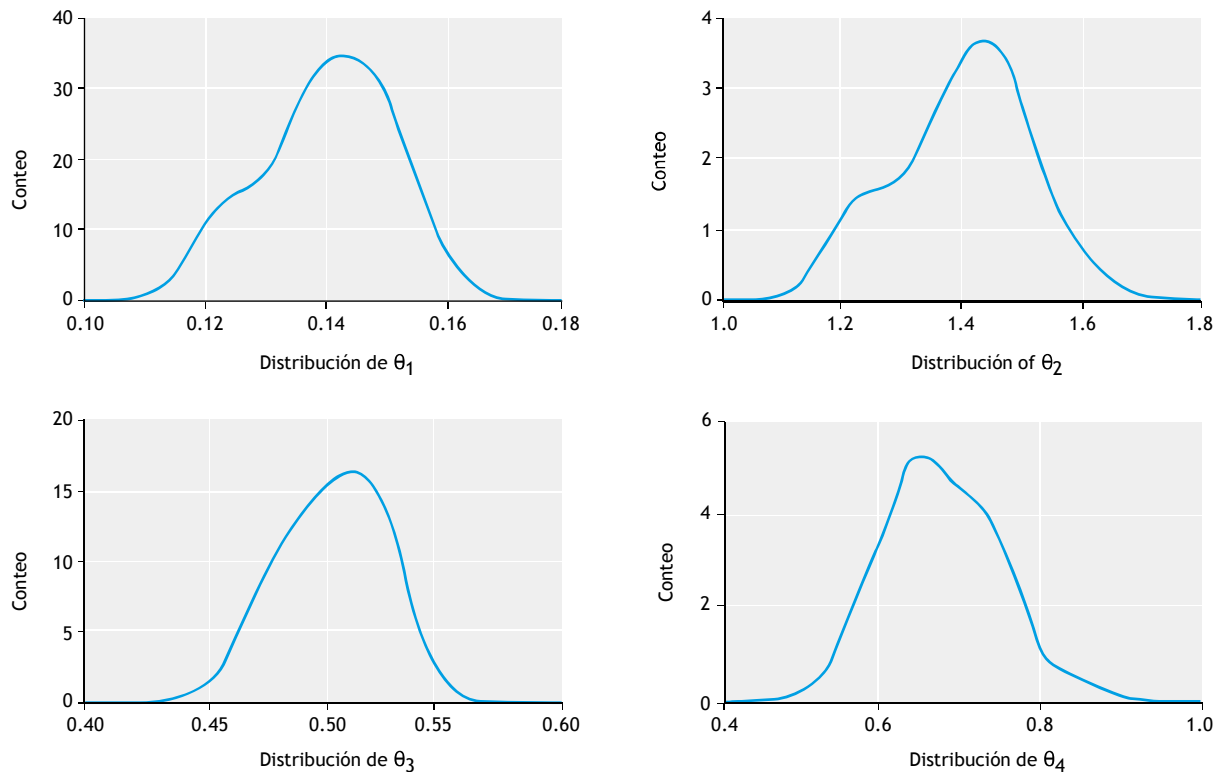
```

figure
labels=['\theta_1'; '\theta_2'; '\theta_3'; '\theta_4']; %or better the name of parameter
for i=1:4
    subplot(2,2,i)
    [f xi]=ksdensity(pmin(:,i));
    plot(xi,f)
xlabel(labels(i,:), 'FontSize', fs, 'FontWeight', 'bold')
end

```

**Tabla 5.8** Cálculos del índice de colinealidad para todas las combinaciones de los parámetros.

Subconjunto K	Tamaño del subconjunto	Combinación de parámetros					$\gamma_K$
1	2	$K_{0,A00}$	$b_{A00}$				1.32
2	2	$K_{s,A00}$	$b_{A00}$				1.26
3	2	$K_{s,A00}$	$K_{0,A00}$				2.09
4	2	$\mu_{max}^{A00}$	$b_{A00}$				1.30
5	2	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{0,A00}$				13.92
6	2	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{s,A00}$				2.03
7	2	$Y_{A00}$	$b_{A00}$				1.28
8	2	$Y_{A00}$	$K_{0,A00}$				12.55
9	2	$Y_{A00}$	$K_{s,A00}$				2.02
10	2	$Y_{A00}$	$\mu_{max}^{A00}$				42.93
11	3	$K_{s,A00}$	$K_{0,A00}$	$b_{A00}$			2.10
12	3	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{0,A00}$	$b_{A00}$			14.05
13	3	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{s,A00}$	$b_{A00}$			2.03
14	3	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{s,A00}$	$K_{0,A00}$			14.23
15	3	$Y_{A00}$	$K_{0,A00}$	$b_{A00}$			13.09
16	3	$Y_{A00}$	$K_{s,A00}$	$b_{A00}$			2.02
17	3	$Y_{A00}$	$K_{s,A00}$	$K_{0,A00}$			12.89
18	3	$Y_{A00}$	$\mu_{max}^{A00}$	$b_{A00}$			51.25
19	3	$Y_{A00}$	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{0,A00}$			45.87
20	3	$Y_{A00}$	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{s,A00}$			43.37
21	4	$Y_{A00}$	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{s,A00}$	$K_{0,A00}$		45.91
22	4	$Y_{A00}$	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{s,A00}$	$b_{A00}$		51.25
23	4	$Y_{A00}$	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{0,A00}$	$b_{A00}$		53.01
24	4	$Y_{A00}$	$K_{s,A00}$	$K_{0,A00}$	$b_{A00}$		13.30
25	4	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{s,A00}$	$K_{0,A00}$	$b_{A00}$		14.30
26	5	$Y_{A00}$	$\mu_{max}^{A00}$	$K_{s,A00}$	$K_{0,A00}$	$b_{A00}$	53.07



**Figura 5.12** Valores estimados de la densidad de probabilidad empírica para los parámetros A00 obtenidos por el método bootstrap.

**Paso 2.** Muestreo desde el espacio de entrada Dado que los parámetros de entrada tienen una matriz de covarianza conocida, cualquier técnica de muestreo debe tener esto en cuenta. En este ejemplo, dado que los parámetros se definen para seguir una distribución normal, el espacio de la incertidumbre de entrada se representa mediante una distribución normal multivariada. Se utiliza una técnica de muestreo aleatorio para muestrear desde este espacio:

```

%% do random sampling
N= 100; %% sampling number
mu=mean(pmin); %% mean values of parameters
sigma=cov(pmin); %% covariance matrix (includes stand dev and correlation information)
X = mvnrnd(mu,sigma,N); % sample parameter space using multivariate random sampling

```

La salida de este paso es una matriz de muestreo,  $X_{N \times m}$ , donde N es el número de muestras y m es el número de entradas. Los valores muestreados se pueden visualizar en un gráfico matricial como se muestra en la Figura 5.13. En esta figura, que es un gráfico matricial,

los sub-tramos diagonales son el histograma de los valores de los parámetros, mientras que los sub-tramos no diagonales muestran los valores muestreados de los dos pares de parámetros. En este caso, las observaciones más importantes son (i) el espacio de entrada de parámetros es muestreado al azar y (ii) la estructura de correlación de parámetros se conserva en los valores muestreados.

**Paso 3.** Simulaciones de Monte Carlo. En este paso, se realizan N simulaciones de modelos utilizando la matriz de muestreo del Paso 2 ( $X_{N \times m}$ ) y las predicciones del modelo que se registran en forma de matriz para ser procesadas en el paso siguiente.

```

%%step 2 perform monte carlo simulations for each parameter value
% Solution of the model
initcond;options=odeset('RelTol',1e-7,'AbsTol',1e-8);
for i=1:nboot
    disp(['the iteration number is : ',num2str(i)])

```

```

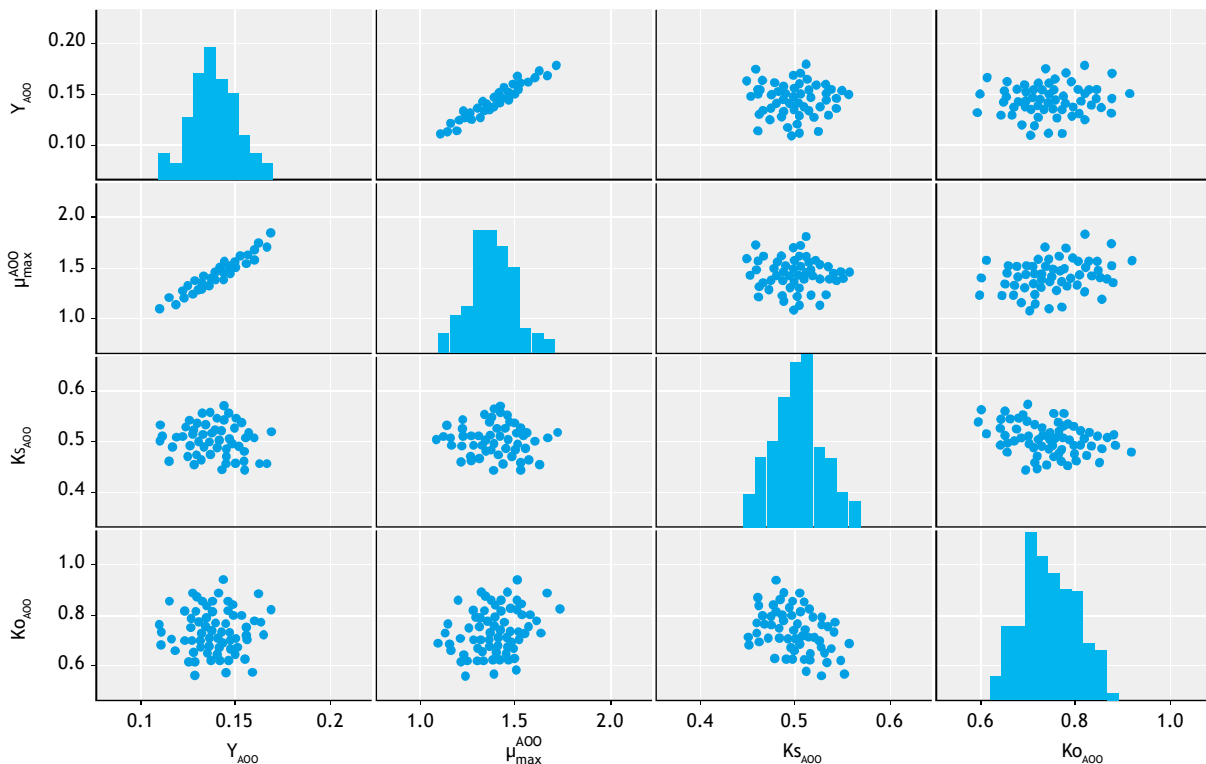
par(idx) = X(i,:) ; %read a sample from
sampling matrix
[t,y1] = ode45(@nitmod,td,x0,options,par) ;
%solve the model
y(:,i)=y1; %record the outputs
end
    
```

**Paso 4.** Revisión y análisis de los resultados. En este paso se grafican las predicciones, y los resultados se revisan. En la Figura 5.14, se grafican los resultados de las simulaciones de Monte Carlo para cuatro predicciones del modelo.

Como se muestra en la Figura 5.15, la media, la desviación estándar y los percentiles (por ejemplo 95 %) pueden ser calculados a partir de la matriz de las predicciones. Los resultados indican que, para las fuentes de incertidumbre bajo estudio, la incertidumbre en las predicciones del modelo puede considerarse despreciable. Estos resultados concuerdan con los resultados de la propagación lineal del error mostrado en la Figura 5.5.

Esto significa que, mientras exista incertidumbre en los propios estimados de los parámetros, cuando el subconjunto de parámetros estimados se use junto con su matriz de covarianza, la incertidumbre en las predicciones del modelo es baja. Para cualquier aplicación de estos parámetros del modelo, los mismos deben ser usados como un conjunto y no individualmente.

Otro punto a tener en cuenta es que, la incertidumbre evaluada depende de la definición de la incertidumbre de las entradas, así como el enfoque, por ejemplo condiciones iniciales de los experimentos. Por ejemplo, en el ejemplo anterior no se consideró la incertidumbre de las mediciones o la incertidumbre debido a otros parámetros (deterioro) y condiciones iniciales (la concentración inicial de los organismos autotróficos). Por lo tanto, estos resultados requieren ser interpretados dentro del contexto donde fueron generados.



**Figura 5.13** Gráfica de la matriz de muestreo del espacio de dato de entrada,  $X_{Nkm}$  – técnica de muestreo aleatorio multivariado con una matriz de covarianza conocida.

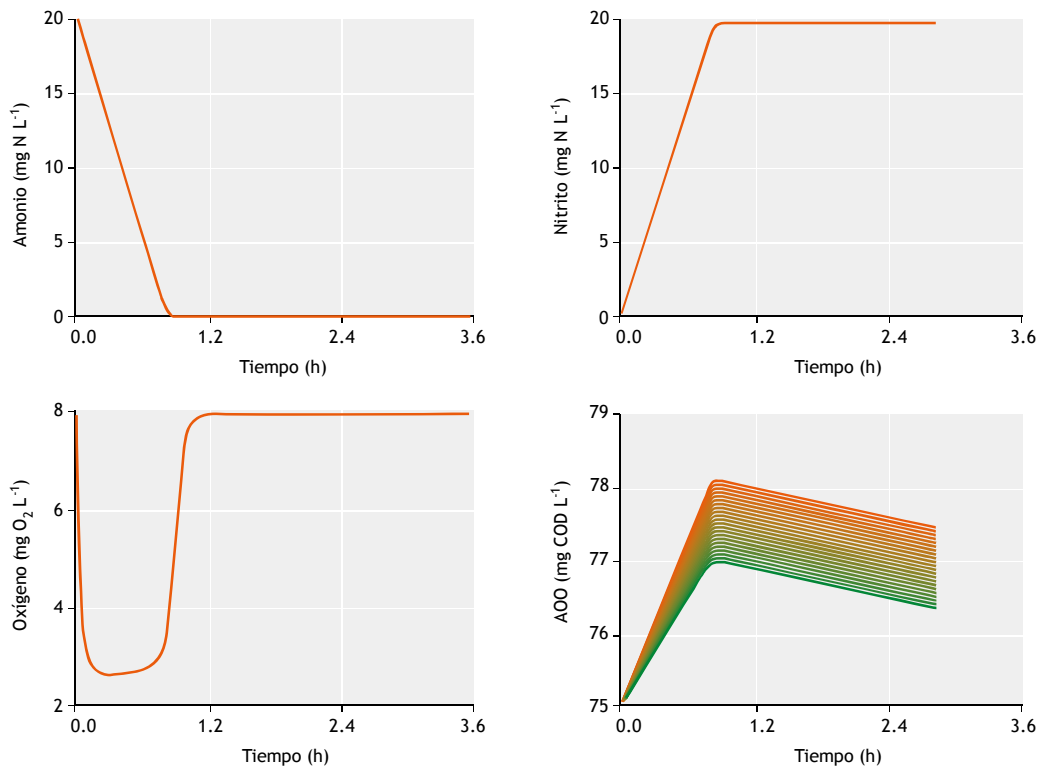


Figura 5.14 Simulaciones Monte Carlo (N = 100) de las predicciones del modelo.

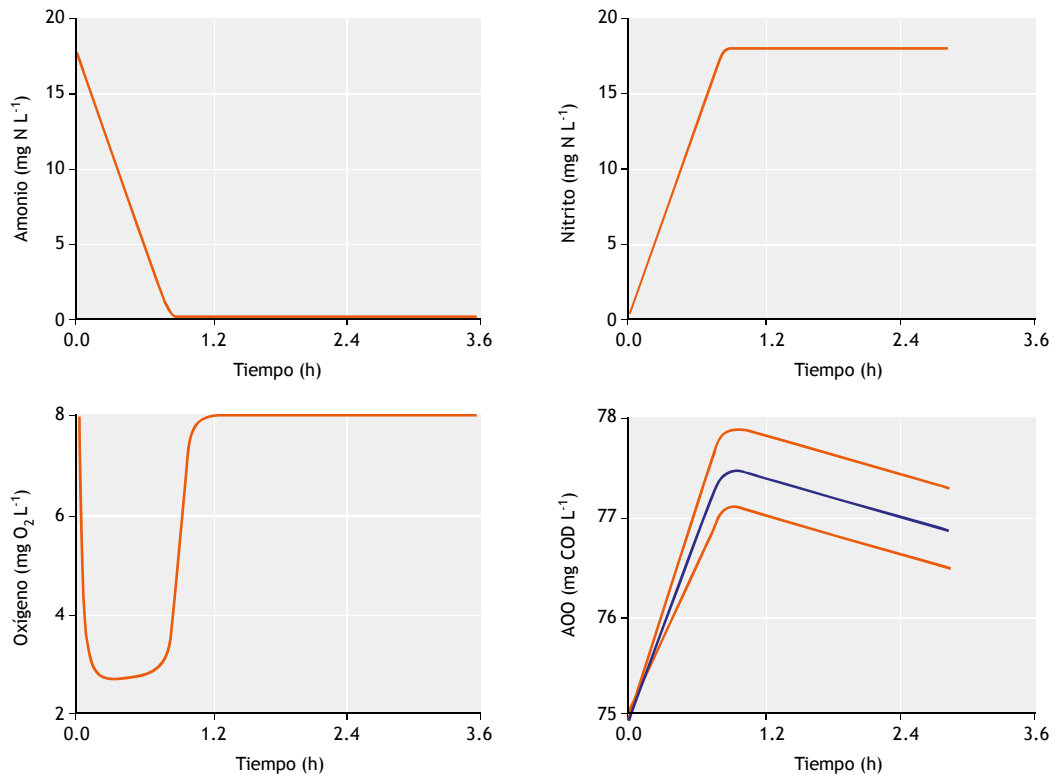


Figura 5.15 Cálculo de la media y los percentiles del 95 % para la incertidumbre de las predicciones del modelo.



## 5.5 CONSIDERACIONES ADICIONALES

### 5.5.1 CONSEJOS PRÁCTICOS EN LA ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS

En la práctica, mientras que las suposiciones asintóticas teóricas dan resultados razonables, existen, a menudo, desviaciones de estas suposiciones. En particular:

- Los errores en las mediciones están, a menudo, autocorrelacionados, lo que significa que, muchas observaciones son redundantes y no son independientes (variables aleatorias no-independientes idénticamente distribuidas (iid)). Esto tiende a causar una subestimación de los intervalos de confianza asintóticos debido a una varianza muestral menor,  $\sigma^2$ . Una solución práctica a este problema es chequear la función de autocorrelación de los residuos y filtrarlos o realizar un submuestreo tal que, la autocorrelación disminuya en el conjunto de datos. La estimación de los parámetros puede rehacerse usando la submuestra del conjunto de datos.
- El algoritmo de estimación de los parámetros puede detenerse en un mínimo local, resultando en un resultado incorrecto de la linealización (el punto en el cual los mínimos cuadrados no-lineales son linealizados). Para aliviar este aspecto, la estimación de los parámetros debe realizarse varias veces con diferentes estimados iniciales o con diferentes algoritmos de búsqueda y/o un análisis de identificabilidad.

Posteriormente es importante verificar que la solución mínima es consistente con algoritmos de minimización diferentes.

Identificabilidad o problema mal condicionado: no todos los parámetros pueden ser estimados con precisión. Esto puede ser motivado por intervalos de confianza muy grandes comparados con la media o por valores optimizados de los estimadores de los parámetros. La solución consiste en realizar un análisis de identificabilidad o re-parametrización del modelo, de tal manera que un número menor de parámetros requiera ser estimado.

Aunque se tienen teorías estadísticas robustas y extensas y métodos relevantes para la estimación de

parámetros del modelo como se demostró anteriormente, la definición del problema de la estimación de parámetros en sí, la cual concierne con establecer si los datos están disponibles, cual es la estructura candidata del modelo, y cuáles son los valores iniciales de los parámetros, se da por consensada. Por lo tanto, un análisis apropiado y la definición del problema de la estimación de parámetros siempre requerirá un buen juicio ingenieril. Para la estimación robusta de parámetros en la práctica, debido a la naturaleza empírica/experimental de la definición de los parámetros, los métodos estadísticos (incluidos los estimados por EMV) deben ser tratados en el contexto/definición del problema de interés.

Respecto al muestreo bootstrap, el aspecto más importante es si los residuos son representativos del error típico de las mediciones. Para una discusión más detallada de esto refiérase a Efron (1979).

### 5.5.2 CONSEJOS PRÁCTICOS EN EL ANÁLISIS DE INCERTIDUMBRE

Cuando se realiza un análisis de incertidumbre, el aspecto más importante es el enfoque y la definición correspondiente de las fuentes de la incertidumbre de entrada. Por tanto, el producto de un análisis de incertidumbre no debe ser tratado de forma absoluta sino dependiente del enfoque del análisis. Una discusión detallada de estos aspectos puede encontrarse en otras referencias (por ejemplo Sin *et al.*, 2009; Sin *et al.*, 2010).

Otro aspecto importante es la matriz de las covarianzas de los parámetros (o matriz de correlación), que debe obtenerse por una técnica de estimación de parámetros. Asumir que la matriz de correlación es despreciable puede llevar a una sobre estimación o subestimación de las incertidumbres de las predicciones del modelo. Por tanto, en un paso de muestreo la matriz de correlación apropiada debe definirse para las entradas (por ejemplo los parámetros) consideradas para el análisis.

Respecto al número de muestras, se debe iterar varias veces para ver si los resultados difieren de una iteración a otra. Dado que los modelos usados para la estimación de parámetros son relativamente simples de resolver numéricamente, se recomienda un número suficientemente alto de iteraciones, por ejemplo 250 o 500.

## Referencias

- Brun, R., Kühni, M., Siegrist, H., Gujer, W., Reichert, P. (2002). Practical identifiability of ASM2d parameters - systematic selection and tuning of parameter subsets. *Water Res.* 36(16): 4113-4127.
- Brun, R., Reichert, P., and Künsch, H. R. (2001). Practical identifiability analysis of large environmental simulation models. *Water Resources Research*, 37(4):1015-1030.
- Bozkurt, H., Quaglia, A., Gernaey, K.V., Sin, G. (2015). A mathematical programming framework for early stage design of wastewater treatment plants. *Environmental Modelling & Software*, 64: 164-176.
- Dochain, D., Vanrolleghem, P.A. (2001). *Dynamical Modelling and Estimation in Wastewater Treatment Processes*. London UK: IWA Publishing.
- Efron, B. (1979). Bootstrap methods: another look at the jackknife. *The Annals of Statistics*, 7(1):1-26.
- Gernaey, K.V., Jeppsson, U., Vanrolleghem, P.A., Copp, J.B. (Eds.). (2014). *Benchmarking of control strategies for wastewater treatment plants*. IWA Publishing.
- Guisasola, A., Jubany, L., Baeza, J.A., Carrera, J., Lafuente, J. (2005). Respirometric estimation of the oxygen affinity constants for biological ammonium and nitrite oxidation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(4): 388-396.
- Heijnen, J.J. (1999). Bioenergetics of microbial growth. *Encyclopaedia of Bioprocess Technology*.
- Henze, M., Gujer, W., Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M., (2000). ASM2, ASM2d and ASM3. *IWA Scientific and Technical Report*, 9. London UK.
- Ljung L. (1999). *System identification - Theory for the user*. 2<sup>nd</sup> edition. Prentice-Hall.
- Mauricio-Iglesias, M., Vangsgaard, A.K., Gernaey, K.V., Smets, B.F., Sin, G. (2015). A novel control strategy for single-stage autotrophic nitrogen removal in SBR. *Chemical Engineering Journal*, 260: 64-73.
- Meijer, S.C.F., Van Der Spoel, H., Susanti, S., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2002). Error diagnostics and data reconciliation for activated sludge modelling using mass balances. *Water Sci Tech.* 45(6): 145-156.
- Metropolis, N., Ulam, S. (1949). The Monte Carlo method. *Journal of the American Statistical Association*, 44(247): 335-341.
- Omlin, M. and Reichert, P. (1999). A comparison of techniques for the estimation of model prediction uncertainty. *Ecol. Model.* 115: 45-59.
- Roels, J.A. (1980). Application of macroscopic principles to microbial metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(12): 2457-2514.
- Saltelli, A., Tarantola, S., and Campolongo, F. (2000). Sensitivity analysis as an ingredient of modeling. *Statistical Science*, 15(4):377-395.
- Seber G. and Wild C. (1989) *Non-linear regression*. Wiley, New York.
- Sin, G., Gernaey, K.V., Neumann, M.B., van Loosdrecht, M.C.M., Gujer, W. (2009). Uncertainty analysis in WWTP model applications: a critical discussion using an example from design. *Water Res.* 43(11): 2894-2906.
- Sin, G., Gernaey, K.V., Neumann, M.B., van Loosdrecht, M.C.M., Gujer, W. (2011). Global sensitivity analysis in wastewater treatment plant model applications: prioritizing sources of uncertainty. *Water Research*, 45(2): 639-651.
- Sin, G., de Pauw, D.J.W., Weijers, S., Vanrolleghem, P.A. (2008). An efficient approach to automate the manual trial and error calibration of activated sludge models. *Biotechnology and Bioengineering*. 100(3): 516-528.
- Sin, G., Meyer, A.S., Gernaey, K.V. (2010). Assessing reliability of cellulose hydrolysis models to support biofuel process design-identifiability and uncertainty analysis. *Computers & Chemical Engineering*, 34(9): 1385-1392.
- Sin, G., Vanrolleghem, P.A. (2007). Extensions to modeling aerobic carbon degradation using combined respirometric-titrimetric measurements in view of activated sludge model calibration. *Water Res.* 41(15): 3345-3358.
- Vangsgaard, A.K., Mauricio-Iglesias, M., Gernaey, K.V., Sin, G. (2014). Development of novel control strategies for single-stage autotrophic nitrogen removal: A process oriented approach. *Computers & Chemical Engineering*, 66: 71-81.
- van der Heijden, R.T.J.M., Romein, B., Heijnen, J.J., Hellinga, C., Luyben, K. (1994). Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnology and bioengineering*, 43(1): 11-20.
- Villadsen, J., Nielsen, J., Lidén, G. (2011). Elemental and Redox Balances. In *Bioreaction Engineering Principles* (pp. 63-118). Springer, US.

# PRUEBAS DE SEDIMENTACIÓN

Autores:

Elena Torfs

Ingmar Nopens

Mari K.H. Winkler

Peter A. Vanrolleghem

Sophie Balemans

Ilse Y. Smets

Revisores:

Glen T. Daigger

Imre Takács

## 6.1 INTRODUCCIÓN

La sedimentación es un proceso importante en muchas de las operaciones unitarias en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs). Las unidades más comúnmente conocidas en estos procesos unitarios son los tanques de sedimentación primario (TSP), que son unidades de tratamiento que preceden a los reactores biológicos, y los tanques de sedimentación secundaria (TSS), que forman parte de la etapa de clarificación previa a la descarga hacia un cuerpo receptor de agua. La sedimentación también juega un papel importante en las nuevas tecnologías que actualmente están siendo desarrolladas, como los reactores de lodo granular. Debido a la naturaleza diversa de los compuestos sedimentables (agua residual cruda, lodo activado, y lodo granular), y la concentración en la que se presentan los diferentes compuestos, estos procesos unitarios tienen comportamientos de sedimentación distintos.

Esta sección presenta una visión general de los diferentes regímenes que puede experimentar una suspensión líquido-partícula y su relación con el comportamiento de sedimentación específico observado tanto en los TSP como en los TSS, y en los reactores de lodo granular.

El comportamiento de la sedimentación de los sólidos no disueltos contenidos en una suspensión se rige por su concentración y la tendencia a formar flóculos. Los procesos de sedimentación pueden clasificarse en (Figura 6.1): sedimentación discreta no-floculenta (Clase I), sedimentación discreta floculenta (Clase II), sedimentación por zona o sedimentación retardada (Clase III) y sedimentación por compresión (Clase IV).

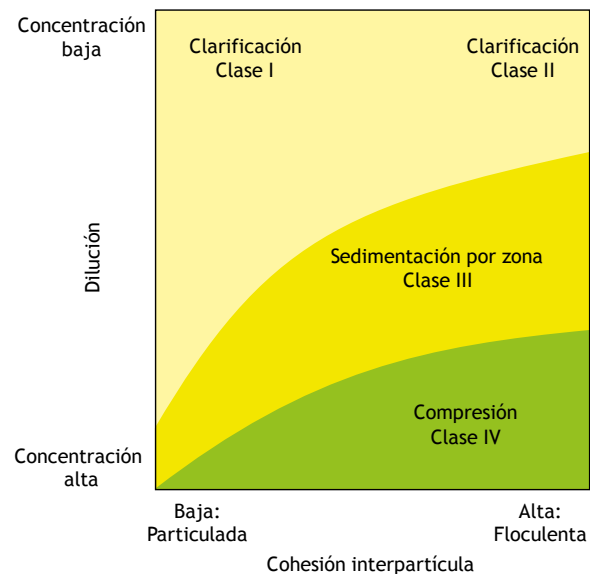


Figura 6.1 Clases de sedimentación (Ekama *et al.*, 1997).

A bajas concentraciones (característica en las Clases I y II), las partículas están completamente dispersas, no hay contacto físico entre ellas y la concentración es lo suficientemente baja como para que las partículas no influyan en su comportamiento mutuo. Cada partícula sedimenta con su propia velocidad terminal característica, la cual depende de sus propiedades individuales, tales como forma, tamaño, porosidad y densidad. Si estas partículas no muestran tendencia a flocular en un medio diluido (por ejemplo, lodo granular), este régimen es llamado sedimentación discreta no floculenta (Clase I). Sin embargo, ciertas suspensiones (entre las que se encuentran algunos sólidos de aguas residuales crudas y los flóculos de lodo activado) presentan una tendencia natural a flocular incluso a bajas concentraciones (Ekama *et al.*, 1997). A través de subsecuentes procesos de colisión y cohesión, se forman flóculos de mayor tamaño que los de la partícula aislada, que hacen que su velocidad de sedimentación cambie con el tiempo. Este régimen es llamado sedimentación discreta floculenta (Clase II). Es importante destacar que durante la sedimentación discreta floculenta, los flóculos formados sedimentarán individualmente a su propia velocidad. Por lo tanto, ambas sedimentaciones discretas, tanto la no floculenta como la floculenta, experimentan básicamente la misma dinámica de sedimentación. La diferencia radica en el hecho de que para la sedimentación discreta floculenta está ocurriendo un proceso adicional de floculación, simultáneamente con el proceso de sedimentación, de manera tal que se alteran las propiedades individuales de las partículas y consecuentemente su velocidad de sedimentación terminal.

La transición de sedimentación discreta a sedimentación retardada (Clase III) ocurre cuando la concentración de sólidos suspendidos en el sedimentador excede una cierta concentración umbral a la cual las partículas no sedimentan independientemente una de otras. Como puede verse en la Figura 6.1, esta concentración umbral depende del estado de floculación del lodo. Para un lodo secundario, la transición ocurre típicamente a concentraciones de 600-700 mg SST L<sup>-1</sup> mientras que para lodos granulares la concentración umbral puede ser de hasta 1600-5500 mg SST L<sup>-1</sup> (dependiendo del estado de granulación) (Mancell-Egala *et al.*, 2016). Por encima de esta concentración, la velocidad de sedimentación de cada partícula es retardada por las otras y las fuerzas entre ellas se hacen lo suficientemente fuertes como para arrastrar todas las partículas a la misma velocidad, independientemente del tamaño y densidad de cada una de ellas. En otras

palabras, las partículas sedimentan conjuntamente formando una zona, y por consiguiente, este régimen es también llamado sedimentación por zona. En este régimen se forma una interfase que permite distinguir entre el sobrenadante claro y las partículas que están sedimentando. Cuando durante el proceso de sedimentación aumenta la concentración de sólidos por encima de una concentración crítica (5-10 g L<sup>-1</sup>), el comportamiento de la sedimentación cambia a una sedimentación por compresión (Clase IV). El valor exacto de la concentración de transición depende, una vez más, del estado de floculación de las partículas. (De Clercq *et al.*, 2008). A estas elevadas concentraciones, los sólidos entran en contacto físico entre sí y son sometidos a una compactación debido al peso de las partículas superpuestas. La velocidad de sedimentación por compresión será mucho menor que en el régimen de sedimentación retardada.

Los lodos activados muestran una tendencia natural a flocular, y dependiendo de su concentración, las características de sedimentación pueden cubrir todo el lado derecho de la Figura 6.1. En un TSS pueden existir al mismo tiempo, en distintas zonas a lo largo del sedimentador, diferentes características de sedimentación. Las bajas concentraciones en las regiones superiores del sedimentador favorecen la sedimentación discreta (floculenta). Por otro lado, las concentraciones del lodo afluyente están comprendidas en el intervalo característico de la sedimentación retardada, mientras que el espesamiento del lodo que ocurre en lechos o mantos de lodo presenta los rasgos distintivos de la sedimentación por compresión. A diferencia del análisis anterior, una característica de la tecnología de los lodos granulares es la baja tendencia que se observa a coagular cuando existen reducidos esfuerzos hidrodinámicos cortantes bajos (de Kreuk y van Loosdrecht, 2004) ubicándose en el lado izquierdo de la Figura 6.1. Esta es la causa por la que los lodos granulares presentan una sedimentación discreta (no floculenta), a concentraciones a las que los lodos activados convencionales muestran una sedimentación retardada o por compresión. Finalmente, frecuentemente los TSP son alimentados con aguas residuales con baja concentración de sólidos suspendidos (lo cual los ubica en la parte superior de la Figura 6.1). Bajo estas condiciones, el régimen de sedimentación dominante en estos sedimentadores es el de sedimentación discreta (Clases I y II).

Como cada proceso unitario se caracteriza por un comportamiento de sedimentación propio, se requieren diferentes métodos experimentales para evaluar su

desempeño. Este capítulo ofrece una visión general de los métodos experimentales que se pueden aplicar para analizar el comportamiento de la sedimentación y floculación en TSS (Sección 6.2 y 6.3), reactores de lodos granulares (Sección 6.4) y en TSP (Sección 6.5).

## 6.2 MEDICIÓN DE LA SEDIMENTACIÓN DE LODOS EN SEDIMENTADORES SECUNDARIOS

Para evaluar el desempeño de un TSS, es esencial estudiar la sedimentación del lodo activado presente en el sistema. Los experimentos de sedimentación conducidos en sistemas batch son una fuente de información interesante, ya que eliminan las influencias hidráulicas de los flujos de entrada y salida en los sedimentadores. Por lo tanto, varios métodos se basan en la determinación de las características de sedimentación de un lodo activado mediante la medición de ciertas propiedades durante la sedimentación en batch del lodo activado en un recipiente determinado.

Por medio de una prueba de sedimentación en batch pueden realizarse varios tipos de mediciones. Éstas incluyen desde pruebas muy simples que proporcionan una predicción aproximada de las características de sedimentación general de la muestra (Sección 6.2.1), hasta experimentos más laboriosos que miden la velocidad de sedimentación específica (Sección 6.2.2) o incluso determinan una relación entre la velocidad de sedimentación y la concentración de los lodos (Sección 6.2.3). Además, en la Sección 6.2.4 se proporcionan algunas recomendaciones útiles a considerar cuando se realizan pruebas de sedimentación en batch. En la Sección 6.2.5 se puede encontrar una visión general de algunos desarrollos recientes con respecto a este tipo de pruebas.

### 6.2.1 Parámetros de sedimentabilidad del lodo

#### 6.2.1.1 Objetivo y aplicación

Se han desarrollado diversos parámetros para estimar cuantitativamente la sedimentabilidad de una muestra de lodo activado. Estos parámetros de sedimentabilidad del lodo (PSL) están basados en el volumen que ocupa el lodo después de un período de sedimentación establecido.

Entre ellos, el Índice Volumétrico de Lodo (IVL) (Mohlman, 1934) es el más conocido. Se han reportado un número importante de estudios sobre el IVL como medida de la sedimentabilidad de los lodos (Dick y Vesilind, 1969; Ekama *et al.*, 1997) de los cuales el más importante es su dependencia con respecto a la concentración de los sólidos. A concentraciones de sólidos elevadas, los valores del IVL medido pueden arrojar valores significativamente diferentes para distintas concentraciones de lodo (Dick y Vesilind, 1969). Además, se ha observado que las mediciones del IVL son afectadas por las dimensiones del cilindro de sedimentación. Este problema puede ser reducido significativamente si se realiza la prueba siguiendo ciertas condiciones pre-establecidas. Por eso, se ha propuesto un número de modificaciones para estandarizar la prueba del IVL con el objetivo de proporcionar información más consistente (Stobbe, 1964; White, 1976, 1975). Stobbe (1964) propuso conducir la prueba de IVL con lodo diluido llamándole Índice Volumétrico de Lodo Diluido (IVLD). White (1975, 1976) propuso el Índice Volumétrico Específico Agitado (IVEA<sub>3.5</sub>) donde la muestra de lodo es agitada durante la sedimentación. Aunque cada uno de estos PSL están descritos con más detalles posteriormente, es importante señalar que se considera que el IVEA<sub>3.5</sub> es la medición que proporciona los resultados más consistentes.

#### 6.2.1.2 Equipo

- Recipiente cilíndrico graduado (resolución mínima 50 mL) con un volumen de 1 litro (para IVL y IVLD), o de acuerdo con las dimensiones especificadas por White (1975) para el IVEA.
- Cronómetro digital que muestre la precisión en segundos.
- Muestra de lodo proveniente de la recirculación del TSS. Alternativamente, la muestra puede ser recolectada directamente del bioreactor o tanque aireado.
- Efluente de la misma PTAR (en caso que sea necesario diluir la muestra de lodo).
- Equipo para determinar los sólidos suspendidos totales (SST) (de acuerdo al método 2540 D descrito en APHA *et al.*, 2012).
- Agitador para la prueba del IVEA.

#### 6.2.1.3 Índice Volumétrico de Lodo (IVL)

El Índice Volumétrico de Lodo (IVL) (Mohlman, 1934) esté definido como el volumen (en mL) ocupado por 1 g



de lodo después de 30 minutos de sedimentación (sin agitar) en un cilindro de 1 L.

- **Protocolo**

1. Medir la concentración de SST de la muestra de lodo de acuerdo al método 2540 D de Standard Methods (APHA *et al.*, 2012).
2. Llenar un cilindro graduado de 1L con la muestra de lodo y dejar sedimentar.
3. Después de 30 minutos de sedimentación, leer el volumen ocupado por el lodo en el cilindro graduado ( $VS_{30}$  en  $\text{mL L}^{-1}$ ).
4. Calcular el IVL con la Ec. 6.1, siendo  $X_{SST}$  la concentración de SST medida en la muestra en  $\text{g L}^{-1}$ :

$$IVL = \frac{VS_{30}}{X_{SST}} \quad \text{Ec. 6.1}$$

- **Ejemplo**

En este ejemplo se realiza una prueba de IVL con una muestra de lodo proveniente de un biorreactor de una PTAR ubicada en Destelbergen, Bélgica. La concentración de sólidos de la muestra es de  $2.93 \text{ g L}^{-1}$ .

El cilindro graduado es llenado con la muestra de lodo y se deja sedimentar. Después de 30 min de sedimentación, el lodo ocupa un volumen de 290 mL ( $VS_{30}$ ).

Por tanto, la muestra tiene un IVL de:

$$IVL = \frac{290 \text{ mL L}^{-1}}{2.93 \text{ g L}^{-1}} = 99 \text{ mL g}^{-1}$$

Este resultado indica que el lodo tiene buenas propiedades de sedimentación. Los valores típicos de IVL para lodos activados se pueden encontrar entre 50-400  $\text{mL g}^{-1}$  donde 50  $\text{mL g}^{-1}$  indica que es un lodo con muy buenas propiedades de sedimentación y 400  $\text{mL g}^{-1}$  sugiere que tiene malas propiedades de sedimentación.

### 6.2.1.4 Índice Volumétrico de lodo diluido (IVLD)

El índice volumétrico de lodo diluido, IVLD (Stobbe, 1964), difiere del IVL estándar dado que es necesario diluir la muestra de lodo previamente a la ejecución de la prueba de sedimentación. El lodo es, por tanto, diluido con el efluente hasta que después de 30 min, el volumen sedimentado esté entre 150  $\text{mL L}^{-1}$  y 250  $\text{mL L}^{-1}$ . Tenga en cuenta que para reducir la posibilidad de presencia de sustancias ajenas que afecten el comportamiento de la sedimentación, todas las diluciones deben realizarse con

el efluente de la planta de donde procede el lodo (antes de que esté expuesto a cualquier desinfección química).

- **Protocolo**

1. Diluir la muestra de lodo con el efluente hasta que pasados 30 min, el volumen sedimentado esté entre 150  $\text{mL L}^{-1}$  y 250  $\text{mL L}^{-1}$ .
2. Realizar los pasos del 1 al 3 de la prueba de IVL estandarizado.
3. Calcular el IVLD mediante la Ec. 6.1, siendo  $X_{SST}$  la concentración diluida de SST en  $\text{g L}^{-1}$ .

La ventaja del IVLD radica en que su independencia con respecto a la concentración del lodo permite una comparación consistente de las características de sedimentación de lodos, de diferentes plantas de tratamiento de lodos activados.

### 6.2.1.5 Índice Volumétrico Específico Agitado (IVEA<sub>3.5</sub>)

El Índice Volumétrico Específico Agitado (IVEA<sub>3.5</sub>) fue presentado por White (1975, 1976), quien describió que, agitando la muestra durante la sedimentación, se reducen los efectos de pared (causados por la geometría de los cilindros usados para las pruebas de sedimentación), los cortocircuitos y los efectos de formación de puentes, creando así condiciones más parecidas a aquellas que prevalecen en los lodos de los TSS.

El IVEA<sub>3.5</sub> se determina realizando una prueba de IVL a una concentración específica de  $3.5 \text{ g L}^{-1}$  mientras que el lodo es agitado suavemente con una velocidad próxima a 1 rpm. Para determinar el IVEA<sub>3.5</sub>, la concentración de lodo es medida como SST y posteriormente diluida con el efluente hasta obtener una concentración de  $3.5 \text{ g L}^{-1}$ . En algunos casos, si la planta opera a valores de SSLM inferiores de  $3.5 \text{ g L}^{-1}$  y no es posible recolectar el lodo activado en el flujo de recirculación, puede ser necesario incrementar la concentración de la muestra.

Comparado con el IVLD, el IVEA<sub>3.5</sub> tiene la ventaja adicional de que no sólo evita la dependencia de la concentración que tiene el primero, sino que suele ser relativamente independiente de las dimensiones de la columna de sedimentación, siempre que no sea menor que las dimensiones especificadas por White (1976). Dichas especificaciones son: una relación entre la profundidad y el diámetro entre 5:1 y 6:1, y un volumen mayor de 4 L. En la medida que la medición se realice en un recipiente mayor, el IVEA<sub>3.5</sub> no podrá ser calculado

directamente a partir de la Ec. 6.1. No obstante, el volumen de la columna particular puede ser reducido al de una columna equivalente de 1 L. Esto se hace expresando el volumen de lodo sedimentado en 30 min como una fracción del volumen de la columna ( $f_{vs}$ ) y multiplicando esta fracción por 1 000 mL para obtener el equivalente de 1 L de volumen sedimentado agitado  $VSA_{30}$  (Ec. 6.2).

$$VSA_{30} = f_{vs} \cdot 1\,000 \quad \text{Ec. 6.2}$$

Este valor puede ser usado en la Ec. 6.1 para calcular el  $IVEA_{3,5}$  con una concentración  $X_{SST}$  de  $3.5 \text{ g L}^{-1}$ .

El  $IVEA_{3,5}$  no es de uso tan frecuente como el IVLD debido a que se requiere un equipo de agitación en particular. Sin embargo, proporciona resultados más consistentes (Ekama *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1983).

- **Protocolo**

1. Medir la concentración de SST de la muestra de acuerdo al método 2540 D del Standard Methods (APHA *et al.*, 2012).
2. Diluir la muestra con efluente hasta obtener una concentración de  $3.5 \text{ g L}^{-1}$ .
3. Llenar un cilindro graduado (según dimensiones mínimas especificadas por White (1976)).
4. Después de 30 min de sedimentación (con agitación simultánea a 1 rpm), lea el volumen ocupado por el lodo en el cilindro graduado y calcule el  $VSA_{30}$  a partir de la Ec. 6.2.
5. Calcular el  $IVEA_{3,5}$  usando la Ec. 6.1 con un  $VS_{30}$  similar al  $VSA_{30}$  y un  $X_{SST}$  de  $3.5 \text{ g L}^{-1}$ .

## 6.2.2 Ensayo de curvas de sedimentación y velocidad de sedimentación retardada

### 6.2.2.1 Objetivo y aplicación

Los parámetros de sedimentabilidad del lodo presentados con anterioridad no permiten ni proporcionan, en general, una buena medida de las propiedades de sedimentación. Representan solo un registro momentáneo del comportamiento de la sedimentación. En realidad, el volumen de una muestra de lodo después de 30 min de sedimentación dependerá tanto de las características de la sedimentación retardada como de la compresión, y a su vez ambas dependen de un número de factores como la composición del lodo activado (por ejemplo, la población de organismos filamentosos), la distribución del tamaño de flóculos, las propiedades superficiales, la reología, etc.

Por consiguiente, dos muestras de lodo con diferentes comportamientos pueden dar como resultado que sus parámetros de sedimentabilidad posean valores similares.

Información más detallada sobre las características de sedimentación de una muestra de lodo puede obtenerse a partir de una curva de sedimentación en batch, la cual hace posible investigar las peculiaridades de la sedimentación del lodo a diferentes tiempos de sedimentación.

Las curvas de sedimentación en batch pueden ser empleadas con diferentes propósitos. Ellas pueden ser usadas de forma cualitativa para determinar la tendencia operacional o temporal con relación al comportamiento de la sedimentación, o pueden ser usadas cuantitativamente para determinar la capacidad límite de un TSS. Para el primer caso, puede usarse un simple cilindro graduado (por ejemplo, el recipiente cilíndrico de la Figura 6.2). Para el segundo, es imprescindible disponer de un recipiente apropiado para evitar los posibles efectos de pared causados por la geometría de los cilindros de sedimentación durante la prueba de sedimentación. Más información sobre el tamaño y la forma óptima del recipiente para la sedimentación en pruebas en batch pueden consultarse en la Sección 6.2.4.1.

### 6.2.2.2 Equipo

Para esta prueba, se necesita el siguiente equipo:

- a. Recipiente cilíndrico graduado (con una resolución mínima 50 mL).
- b. Cronómetro digital con una precisión de lectura en segundos.
- c. Muestra de lodo proveniente de la recirculación del TSS o del flujo de alimentación al sedimentador.
- d. Equipo para determinar los SST (APHA *et al.*, 2012).
- e. Equipo de agitación (si los resultados se van a utilizar para el análisis cuantitativo de la capacidad del TSS).

### 6.2.2.3 Procedimiento experimental

Para medir una curva de sedimentación en batch, el recipiente cilíndrico es llenado con una muestra de lodo y se pone en funcionamiento el cronómetro para realizar un seguimiento de la duración del ensayo. El lodo se deja sedimentar mientras se mide la altura de la interfase sólido-líquido (agua-lodo) de clarificación a diferentes intervalos de tiempo. Esta metodología es ilustrada en la Figura 6.2 en donde la altura de la interfase sólido-líquido

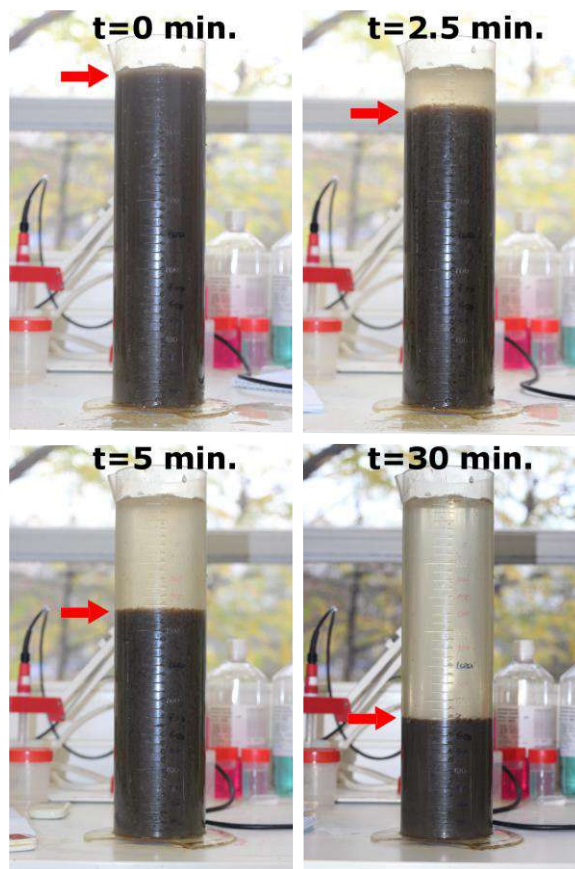
clarificada está indicada por la flecha roja. El registro de la altura de la interfase clarificada a diferentes intervalos de tiempo da como resultado una curva que ilustra el desarrollo de la zona de acumulación del lodo (lecho de lodo) en función del transcurso del tiempo. Los tiempos de medición estandarizados para una curva de sedimentación en batch son 0; 0.5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 30 y 45 min, pero estos pueden ser adaptados dependiendo de la dinámica de la sedimentación de la muestra de lodo específica (para más información ver la Sección 6.2.4). Al iniciar la prueba, la interfase clarificada se mide usualmente con mayor frecuencia, debido a que el lodo sedimenta relativamente más rápido. A medida que avanza la prueba, la frecuencia de medición puede disminuirse, debido a que la interfase se mueve más lentamente.

- **Protocolo**

1. Homogenizar la muestra de lodo. No agite la muestra vigorosamente, ya que se pueden originar cambios en el lodo y alterar sus propiedades de sedimentación.
2. Llenar el recipiente cilíndrico con la muestra tomando precauciones de llenado suave y lento.
3. Ponga el cronómetro en operación inmediatamente después de llenar la columna.
4. Mida la altura de la interfase sólido-líquido a los siguientes intervalos de tiempo 0; 0.5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 30 y 45 min.

- **Ejemplo**

Se mide una curva de sedimentación en una prueba en batch utilizando un lodo del bioreactor de la PTAR de Destelbergen (en Bélgica). La concentración de sólidos suspendidos en la muestra es de  $2.93 \text{ g L}^{-1}$ . La medición de las alturas de la interfase sólido-líquido clarificada a diferentes tiempos de sedimentación se muestran en la Tabla 6.2 y la curva en batch (altura del lecho de lodo vs tiempo) se muestra en la Figura 6.3.



**Figura 6.2** Fotografía de una columna de sedimentación en una prueba batch a diferentes tiempos de sedimentación, indicando la interfase sólido-líquido clarificada (foto: E. Torfs).

**Tabla 6.2** Medición de la altura del lecho de lodo durante una prueba simple de sedimentación en batch.

Tiempo (min)	Altura (m)
0	0.250
0,5	0.247
1	0.244
2	0.238
3	0.206
4	0.184
5	0.169
10	0.122
15	0.106
20	0.098
30	0.088
45	0.081

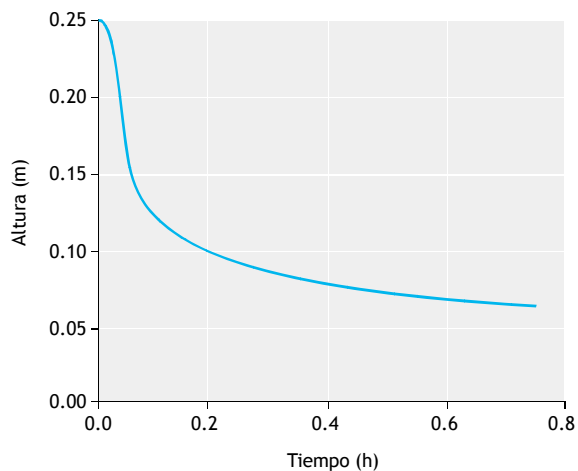


Figura 6.3 Curva de sedimentación en batch.

#### 6.2.2.4 Interpretación de la curva de sedimentación en batch

Típicamente, pueden observarse cuatro fases diferentes en una curva de sedimentación en batch. Cada fase marca un cambio en el comportamiento de la sedimentación. La Figura 6.4 muestra el desarrollo de la altura del lecho de lodo a través del tiempo, diferenciando las cuatro fases. Es importante tener en cuenta que una curva de sedimentación en batch solamente proporciona información sobre el comportamiento de la sedimentación en la interfase lodo-agua. A un tiempo específico, las características de la sedimentación a diferentes profundidades de la columna pueden diferir de las de la interfase dependiendo de las concentraciones locales.

La Figura 6.5 representa la distribución de las regiones de sedimentación a través de la altura de la columna a diferentes tiempos durante un experimento de sedimentación en batch.

Casi inmediatamente después de iniciado el ensayo, se forman las cuatro regiones con el incremento de la profundidad en el cilindro. La región superior (región A) consiste en el sobrenadante o líquido claro. Por debajo de la región A, se forman las regiones B, C, y D, donde la zona de sedimentación, transición y compresión tienen lugar respectivamente (Ekama *et al.*, 1997). La posición de la interfase lodo/agua se indica con una flecha roja. Las fases que se registran en una curva de sedimentación en batch se destacan en la medida en que la interfase líquido-sólido pasa a través de estas diferentes regiones de sedimentación.

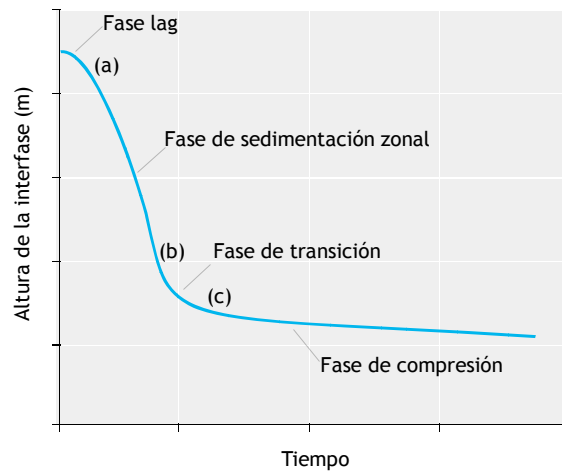


Figura 6.4 Altura del lecho de lodo a través del tiempo, indicando las cuatro fases (Rushton *et al.*, 2000).

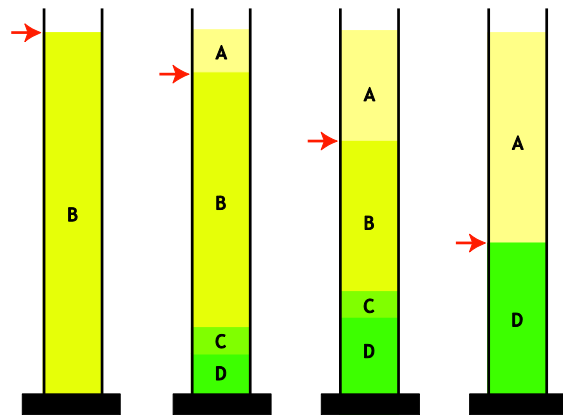


Figura 6.5 Proceso cronológico de una prueba de sedimentación en batch (Ekama *et al.*, 1997).

Desde el comienzo de la prueba hasta el punto (a) (Figura 6.4), la interfase sólido-líquido está en una fase de adaptación. En esta fase, el lodo activado necesita recuperarse de las perturbaciones debido a la turbulencia causada por el llenado de la columna.

Durante la fase de sedimentación retardada o fase de sedimentación por zona que comienza en el punto (a) y termina en el punto (b) (Figura 6.4), la interfase se localiza en la región de sedimentación retardada (región B). Esta fase se caracteriza por un decrecimiento lineal de la curva de sedimentación. Aquí se manifiesta un equilibrio entre las fuerzas gravitacionales que favorecen que las partículas sedimenten y las fuerzas de fricción que se generan entre partículas, que producen una resistencia a la sedimentación y que originan como resultado que todas las partículas de la región sedimenten

a la misma velocidad. Si la columna no es agitada, entonces la velocidad a la cual la interfase se desplaza hacia abajo es llamada velocidad de sedimentación retardada  $v_{sr}$ , a la concentración de sólidos de entrada. Si las dimensiones y condiciones de la prueba en batch se establecen de manera tal que se eviten los efectos de pared (Sección 6.2.4.1), la velocidad de sedimentación medida corresponde con la velocidad de sedimentación por zona de un TSS.

La fase de transición (punto (b)) comienza cuando el lecho de lodo alcanza la zona de transición (región C). La zona de transición es una capa de espesor constante y está formada por partículas procedentes de la zona de sedimentación retardada que va decreciendo y por partículas procedentes de la zona de compresión que va incrementándose. Aunque durante esta fase existen las mismas características que prevalecen en la sedimentación por zona, la velocidad de sedimentación decrece porque el gradiente de concentración se incrementa con la profundidad. La fase de transición termina cuando el lecho de lodo alcanza la capa de compresión.

La última fase comienza en el punto (c) y es llamada fase de compresión. El tiempo en el cual la fase de compresión comienza, llamado punto de compresión, es difícil de identificar. Durante la fase de compresión las partículas se compactan, creando así un incremento del gradiente de concentración, y el decrecimiento de la velocidad de sedimentación.

### 6.2.2.5 Medición de la velocidad de sedimentación retardada

A intervalos moderados de concentración de lodo (aproximadamente entre  $1 \text{ g L}^{-1}$  y  $6 \text{ g L}^{-1}$ ) el lodo iniciará la sedimentación de acuerdo al régimen de sedimentación por zona o retardada. La pendiente de la parte lineal de la curva de sedimentación en batch corresponde a la velocidad de sedimentación retardada  $v_{sr}$ .

#### Ejemplo

La velocidad de sedimentación retardada para los datos de la Figura 6.3 se calcula determinando la pendiente más pronunciada entre tres puntos consecutivos de los datos (que puede ser estimado con cualquier software). El procedimiento se ilustra en la Figura 6.6, de donde se calcula una velocidad de sedimentación de  $1.374 \text{ m h}^{-1}$ .

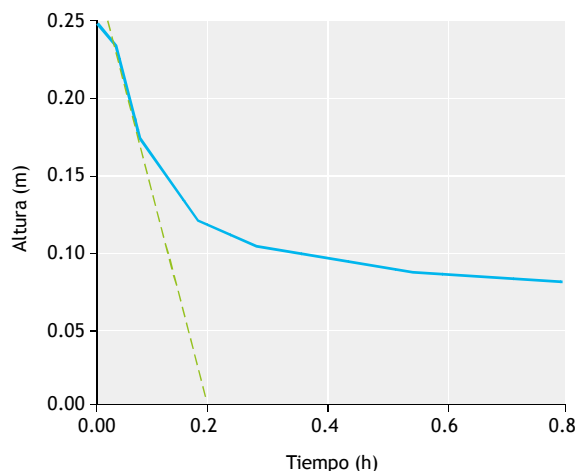


Figura 6.6 Cálculo de la pendiente más pronunciada de una curva de sedimentación en batch a una concentración de  $2.93 \text{ g L}^{-1}$ .

## 6.2.3 Relación $v_{sr}$ -X

### 6.2.3.1 Objetivo y aplicación

La concentración de sólidos en la región de sedimentación retardada es uniforme e igual a la concentración inicial de los sólidos en el batch. Mediante el cálculo de la pendiente de la parte lineal de la curva de sedimentación para diferentes concentraciones iniciales, puede determinarse la velocidad de sedimentación retardada como una función de la concentración de sólidos (X). La relación entre la velocidad de sedimentación retardada y la concentración de los sólidos es de particular importancia para el diseño de los TSSs ya que la velocidad de sedimentación es crucial para la determinación de la carga hidráulica y de sólidos limitante, y por tanto, del área superficial del TSS. Como se ha indicado con anterioridad, para utilizar la relación  $v_{sr}$ -X en los cálculos cuantitativos como el de la determinación del área superficial de TSS, se hace necesario ajustar las dimensiones y condiciones de la prueba de sedimentación, a las especificaciones indicadas en la Sección 6.2.4.1.

### 6.2.3.2 Equipo

Para esta prueba se necesita el siguiente equipo:

- Recipiente cilíndrico graduado (con una resolución mínima 50 mL).
- Cronómetro digital que muestre la precisión en segundos.
- Muestra de lodo proveniente del flujo de recirculación del TSS.



- d. Efluente proveniente de la misma PTAR (para diluir las muestras de lodo)
- e. Equipo para la determinación de SST (APHA *et al.*, 2012).
- f. Equipo de agitación (si los resultados se van a utilizar para el análisis cuantitativo de la capacidad de TSS).

- 3. Realizar los pasos del 2 al 4 del protocolo para realizar las curvas de sedimentación.
- 4. Después de 45 min de sedimentación, homogenizar nuevamente la muestra en el recipiente cilíndrico y tomar una muestra para determinar la concentración de sólidos en el lodo con un análisis de SST.

### 6.2.3.3 Procedimiento experimental

Para obtener diferentes concentraciones de sólidos para llevar a cabo las pruebas de sedimentabilidad en batch, se requiere una muestra de lodo proveniente del flujo de recirculación del TSS diluida con el efluente de la misma PTAR. Por lo tanto, se hace una serie de diluciones con 100, 80, 60, 50, 40 y 20 % de lodo, respectivamente. Por ejemplo, una dilución del 40 % consiste en 0.8 L de lodo proveniente del flujo de recirculación y 1.2 L de efluente. Para cada dilución se obtiene la curva de sedimentación a partir de un ensayo en batch, siguiendo el protocolo descrito en la Sección 6.2.2.3. La velocidad de sedimentación retardada es calculada a partir de la pendiente de la parte lineal de la curva.

Para obtener resultados de la relación  $v_{sr}-X$ , que sean confiables, es importante tener una medición precisa de la concentración inicial a la cual se ejecuta cada ensayo. En las series de diluciones, frecuentemente las concentraciones se determinan a partir de la estimación de la concentración de sólidos en el flujo de recirculación y luego calculando la concentración de la dilución, asumiendo que la concentración de sólidos en el efluente es despreciable. Sin embargo, cuando la muestra del flujo de recirculación no se agita bien continuamente mientras se llena el cilindro donde se realizará la prueba de sedimentación, este procedimiento es propenso a errores. Un medio más viable es medir los SST de cada dilución por separado. Esto puede hacerse mezclando el contenido de cada cilindro o recipiente al finalizar cada prueba de sedimentación y posteriormente tomando una muestra para la determinación de los SST. Este enfoque implica trabajo adicional, ya que es necesario realizar más pruebas de SST, pero asegura una lectura más confiable de la concentración diluida.

#### Protocolo

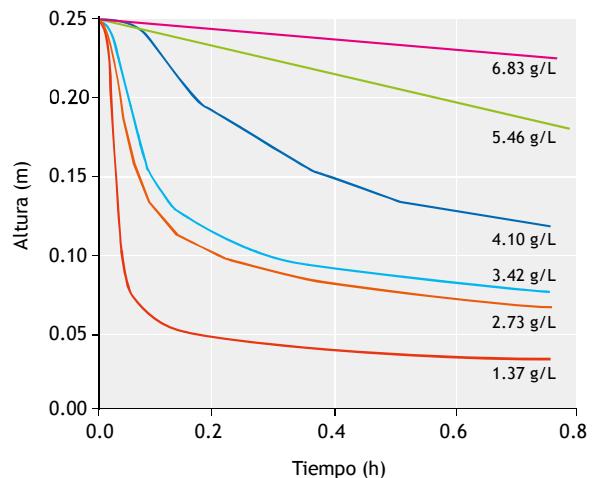
- 1. Realizar el paso 1 del protocolo para medir las curvas de sedimentación en batch con una muestra del lodo proveniente del flujo de recirculación.
- 2. Combinar un determinado volumen de la muestra de lodo con volumen de efluente hasta obtener la dilución requerida.

#### • Ejemplo

Se recolectaron muestras del flujo de recirculación y del efluente de la PTAR de Destelbergen (Bélgica). La interfase lodo/agua fue medida para diferentes concentraciones iniciales (Tabla 6.3). Los resultados de las curvas de sedimentación son mostrados en la Figura 6.7.

**Tabla 6.3** Medición de la altura del lecho de lodo (en m) durante las pruebas de sedimentación en batch a diferentes concentraciones iniciales de sólidos.

Tiempo (min)	Concentración, gL <sup>-1</sup>					
	1.37	2.37	3.42	4.10	5.46	6.83
0	0.248	0.248	0.248	0.248	0.248	0.248
0.5	0.243	0.244	0.246	0.248	0.247	0.248
1	0.215	0.236	0.241	0.247	0.246	0.248
2	0.107	0.198	0.214	0.244	0.245	0.248
3	0.074	0.163	0.186	0.242	0.243	0.247
4	0.064	0.144	0.165	0.239	0.243	0.246
5	0.059	0.130	0.149	0.234	0.241	0.245
10	0.046	0.102	0.115	0.195	0.234	0.241
15	0.041	0.091	0.102	0.172	0.227	0.239
20	0.038	0.083	0.092	0.156	0.219	0.236
30	0.033	0.073	0.083	0.132	0.205	0.231
45	0.031	0.064	0.074	0.114	0.182	0.223



**Figura 6.7** Curvas de sedimentación en pruebas batch conducidas a diferentes concentraciones iniciales.

Para el cálculo de las velocidades de sedimentación retardada (Figura 6.7), se tomó la pendiente más pronunciada entre tres puntos consecutivos de cada curva (Figura 6.8A). Los resultados de las velocidades están representados en la Figura 6.8 B y la Tabla 6.4.

La velocidad de la sedimentación retardada disminuye lentamente en la medida que aumenta la concentración de los sólidos suspendidos debido a que las partículas que sedimentan ven retardado su descenso por la interacción con las partículas que la rodean. Observe que para concentraciones entre  $5.46 \text{ g L}^{-1}$  y  $6.83 \text{ g L}^{-1}$ , se hace cada vez más difícil determinar la pendiente más pronunciada y se puede dudar de la validez de estas curvas para medir la velocidad de sedimentación retardada. Más información puede ser encontrada en la Sección 6.2.4.3.

**Tabla 6.4** Velocidades de sedimentación retardada a diferentes concentraciones iniciales de sólidos suspendidos.

Concentración ( $\text{g L}^{-1}$ )	$v_{sr}$ ( $\text{m h}^{-1}$ )
1.37	4.39
2.73	2.01
3.42	1.53
4.10	0.46
5.46	0.09
6.83	0.05

### 6.2.3.4 Determinación de los parámetros de la sedimentación zonal

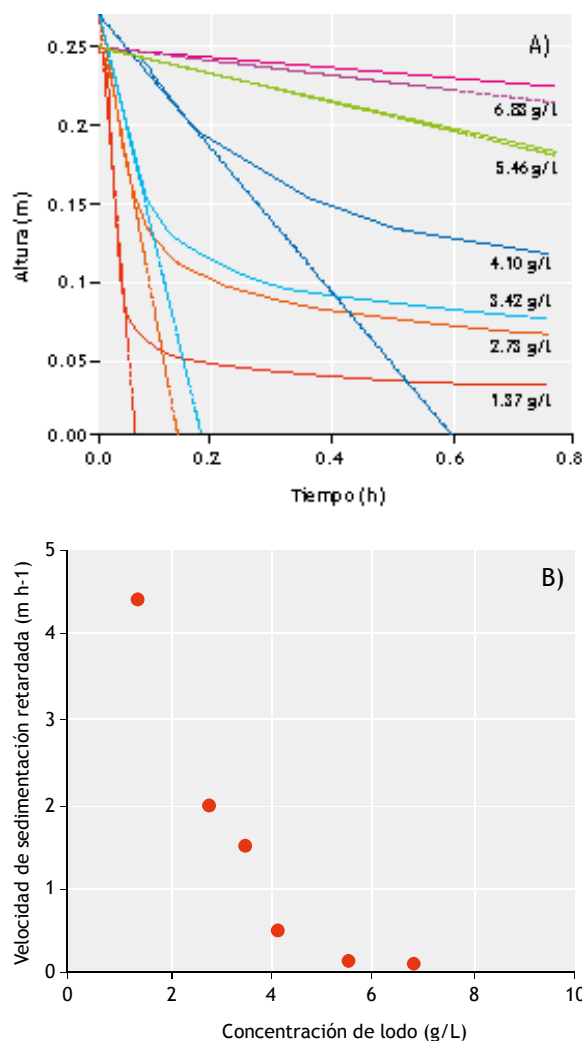
Matemáticamente, la relación entre la concentración del lodo y la velocidad de sedimentación por zona puede ser descrita por una función exponencial decreciente (Ec. 6.3) (Vesilind, 1968). En esta ecuación  $v_{sr}$  representa la velocidad de sedimentación retardada del lodo,  $V_0$  la máxima velocidad de sedimentación,  $X_{TSS}$  la concentración de sólido y  $r_V$  un parámetro del modelo. Los parámetros  $V_0$  y  $r_V$  en esta función proporcionan información sobre la sedimentabilidad del lodo y son frecuentemente usados en el procedimiento de diseño de TSS. Más información sobre el procedimiento de diseño puede ser encontrado en Ekama *et al.* (1997).

$$v_{sr}(X) = V_0 \cdot e^{-r_V \cdot X_{SST}} \quad \text{Ec. 6.3}$$

Los parámetros  $V_0$  y  $r_V$  pueden ser estimados a partir de los datos experimentales minimizando la suma del cuadrado de los errores (SCE) en la Ec. 6.4. En esta ecuación  $N$  es el número de datos,  $v_{sr,i}$  la velocidad de

sedimentación retardada medida a una concentración  $i$ , y  $\tilde{v}_{sr,i}$  corresponde a la predicción por la función de Vesilind (1968) para un juego particular de parámetros  $[V_0, r_V]$ .

$$SCE = \sum_{i=1}^N (v_{sr,i} - \tilde{v}_{sr,i}(V_0, r_V))^2 \quad \text{Ec. 6.4}$$



**Figura 6.8** (A) Pruebas de sedimentación en batch a diferentes concentraciones iniciales de sólidos suspendidos indicando la máxima pendiente para cada curva. (B) La pendiente máxima representa una medida de la velocidad de sedimentación retardada.

Una estimación de los parámetros de la sedimentación por zona y el cálculo del intervalo de confianza para estos estimados se puede realizar tal como

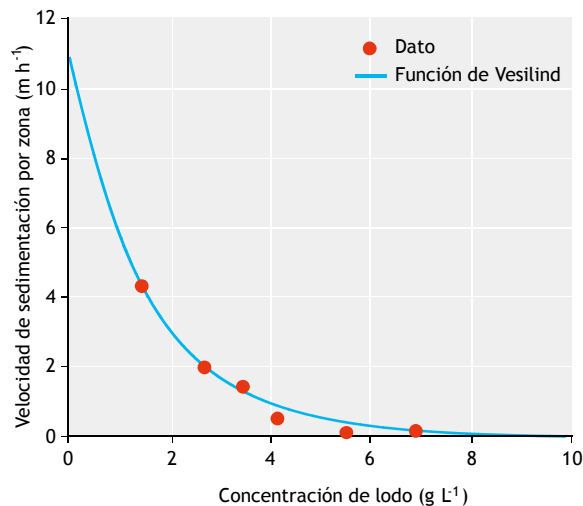
se explica en el Capítulo 5. Minimizando la SCE de la Ec. 6.4 dará más importancia al ajuste a altas velocidades de sedimentación (o sea, a bajas concentraciones). También, puede realizarse un ajuste logarítmico con el fin de dar igual importancia a todas las velocidades de sedimentación estimadas.

• **Ejemplo**

La Tabla 6.5 proporciona los parámetros estimados iniciales, los parámetros óptimos después de la optimización y los intervalos con un 95% de confianza de los parámetros estimados de los datos de la Tabla 6.4. Los resultados de la simulación de la función calibrada vs los datos de los puntos experimentales son mostrados en la Figura 6.9.

**Tabla 6.5** Valores iniciales, valores óptimos, e intervalos de confianza de los parámetros estimados por la función de sedimentación.

Parámetro	Valor inicial	Valor Óptimo	Intervalo de Confianza
$V_0$ (m h <sup>-1</sup> )	9.647	10,608	± 1.265
$r_v$ (L g <sup>-1</sup> )	0.488	0.634	± 0.038



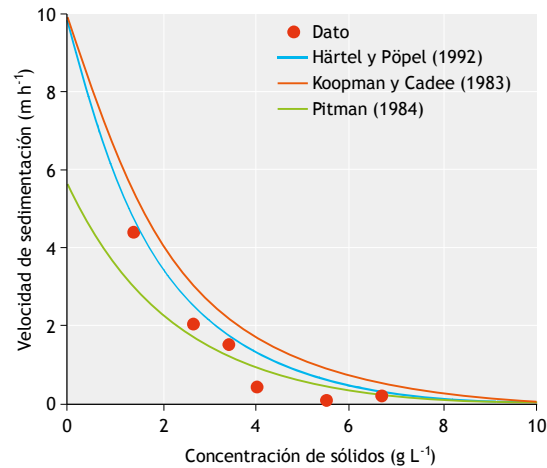
**Figura 6.9** Velocidad de sedimentación en función de la concentración de sólidos. Los círculos representan las velocidades de sedimentación medida y la línea la velocidad de sedimentación calculada después de la calibración de la función por Vesilind (1968).

**6.2.3.5 Calibración mediante relaciones empíricas basadas en los parámetros PSL**

Como la medición de las curvas de sedimentación en batch es mucho más laboriosa que las mediciones de los PSL, se han desarrollado varias ecuaciones empíricas

relacionando los parámetros de sedimentación  $V_0$  y  $r_v$  con mediciones simples de los PSL (Härtel y Pöpel, 1992; Koopman y Cadee, 1983; Pitman, 1984, Daigger y Roper, 1985). La Tabla 6.6 muestra diversos ejemplos de ecuaciones empíricas y del resultado de las estimaciones de los parámetros de interés.

La Figura 6.10 muestra que los parámetros de sedimentación calculados a partir de las ecuaciones empíricas no son capaces de describir con precisión los datos reportados en la Tabla 6.4. Esto podría esperarse ya que lodos con un IVL similar pueden presentar características de sedimentación diferentes dependiendo de sus propiedades (del lodo). Además, al emplear las relaciones empíricas, se estiman dos parámetros basándose en un único punto de los datos. Los PSL proporcionan información insuficiente para describir el comportamiento de la sedimentación a diferentes concentraciones de lodo. Por estas razones, el uso de las relaciones empíricas basadas en PSL no es un enfoque preciso para estimar los parámetros de la sedimentación retardada y debe evitarse.



**Figura 6.10** Velocidad de sedimentación en función de la concentración de sólidos. Los círculos representan la velocidad de sedimentación medida de las pruebas de sedimentación en batch y las líneas continuas representan las velocidades de sedimentación calculada por la función de Vesilind (1986) con los valores de los parámetros basados en ecuaciones empíricas.

**Tabla 6.6** Valores estimados de  $V_0$  ( $\text{m h}^{-1}$ ) y  $r_V$  ( $\text{L g}^{-1}$ ) mediante relaciones empíricas basadas en los PSL.

Referencia	Ecuaciones	Valores de los parámetros	Número de ecuación.
Härtel y Pöpel (1992)	$V_0 = 17.4 e^{-0.0113 IVL}$	$V_0 = 9.647$	Ec. 6.5
	$r_V = -0.9834 e^{-0.00581 IVL} + 1.043$	$r_V = 0.488$	Ec. 6.6
Koopman y Cadee (1983)	$\ln(V_0) = 2.605 - 0.00365 IVLD$	$V_0 = 9.993$	Ec. 6.7
	$r_V = 0.249 + 0.002191 IVLD$	$r_V = 0.431$	Ec. 6.8
Pitman (1984)	$\frac{V_0}{r_V} = 67.9 e^{-0.016 IVEA_{3.5}}$	$V_0 = 5.669$	Ec. 6.9
	$r_V = 0.88 - 0.393 \log\left(\frac{V_0}{r_V}\right)$	$r_V = 0.446$	Ec. 6.10

## 6.2.4 Recomendaciones para realizar pruebas de sedimentación en batch

### 6.2.4.1 Forma y tamaño del recipiente

Para las pruebas de sedimentación en batch es recomendable usar un recipiente cilíndrico. En recipientes cónicos como el cono Imhoff, no puede ser medida la región de la sedimentación por zona, porque al reducirse el ancho a través de la sección inevitablemente se producirá un gradiente de concentración. Cuando el objetivo de la medición es usar los parámetros de la sedimentación por zona para un análisis cualitativo del valor límite del flujo y del área superficial del TSS, se debe tener cuidado para evitar cualquier influencia del recipiente empleado en la prueba sobre las características de la sedimentación (los llamados efectos de la pared). Esto se puede conseguir realizando el ensayo en una columna de al menos 100 mm de diámetro y 1 m de largo y agitando suavemente (1 rpm) la muestra durante la sedimentación.

### 6.2.4.2 Transporte y manejo de la muestra

Deben evitarse largas distancia de transportación y tiempos prolongados de almacenaje de la muestra. La agitación de la muestra durante el transporte y la actividad biológica durante el almacenamiento pueden influir severamente en las propiedades de la sedimentación. Si es posible, debe realizarse la medición en la propia PTAR inmediatamente después del muestreo.

### 6.2.4.3 Intervalo de concentración

La sedimentación retardada ocurre típicamente para concentraciones de sólidos suspendidos entre  $1 \text{ g L}^{-1}$  y  $6 \text{ g L}^{-1}$ . Sin embargo, estos límites dependen del estado de la floculación del lodo y puede ser diferente entre PTARs. Por lo tanto, siempre debe haber una comprobación visual que contemple si las curvas de sedimentación registradas están dentro de la región de sedimentación retardada. A bajas concentraciones iniciales, resulta cada vez más difícil seguir la interfase sólido-líquido clarificada cuando el lodo entra en el régimen de sedimentación discreta. Si la interfase no puede ser observada, esta concentración no debe ser considerada en el análisis. Por otro lado, a altas concentraciones, el lodo empieza a comprimirse. Si la concentración inicial es lo suficientemente alta como para que la compresión ocurra al comienzo del ensayo o prueba, la curva de sedimentación no mostrará un claro descenso lineal. Si no se observa una disminución lineal en la curva de sedimentación, tampoco deben ser consideradas las altas concentraciones en el análisis.

### 6.2.4.4 Frecuencia de medición

Los tiempos de medición y las series de dilución descritas en las secciones 6.2.2 y 6.2.3 pueden ser consideradas como un conjunto mínimo de mediciones para desarrollar una curva de sedimentación en pruebas en batch. Sin embargo, se pueden añadir mediciones con mayor frecuencia o con diluciones adicionales dependiendo de las condiciones o requerimientos de cada caso particular. Por ejemplo, si la interfase sólido-líquido muestra un incremento inicial muy rápido, entonces se pueden registrar mediciones adicionales durante los 2 primeros minutos de la prueba. En caso de contar con el equipo especializado, la interfase sólido-líquido clarificada

podría seguirse de manera automática (Vanderhasselt y Vanrolleghem, 2000). Dependiendo de la concentración de sólidos en la muestra extraída de la recirculación, puede ocurrir que las series de dilución estándar (100, 80, 60, 50, 40 y 20%) no proporcionen datos e información suficiente sobre el intervalo de concentración en el cual ocurre la sedimentación retardada. En tal caso, pueden añadirse diluciones adicionales como por ejemplo a 55%, 30 %, etc.

### 6.2.5 Avances recientes en las pruebas de sedimentación en batch

Mediante la medición de una curva de sedimentación en batch, puede investigarse la velocidad a la que se mueve la interfase sólido-líquido clarificado a través de diferentes regiones de sedimentación. Sin embargo, el inconveniente de este método es que sólo proporciona información sobre la interfase. No se registra información sobre el comportamiento de la sedimentación en el interior del lecho de lodos o la acumulación real en el propio lecho. Tampoco permite calcular la velocidad en la etapa de compresión. En literatura especializada se han presentado técnicas de medición más avanzadas con el objetivo de proporcionar información más detallada sobre el comportamiento de la sedimentación de los lodos y su relación con el tiempo y la profundidad. Los ejemplos incluyen mediciones (espacio-temporales) detalladas de la concentración de sólidos por medio de un trazador radiactivo (De Clercq *et al.*, 2005) y mediciones de la velocidad a lo largo de la altura del lecho de lodos con un transductor ultrasónico (Locatelli *et al.*, 2015). Sin embargo, estas técnicas requieren equipamiento especializado y por ello no pueden realizarse de manera rutinaria.

## 6.3 MEDICIÓN DEL ESTADO DE FLOCULACIÓN DEL LODO ACTIVADO

Como puede verse en la Figura 6.1, las características de la sedimentación de una muestra de lodo no solo están influenciadas por su concentración, sino también por su estado de floculación. Por lo tanto, la capacidad de un TSS y su éxito como clarificador depende en gran medida del potencial que posean los microorganismos para formar una biomasa floculante con buena sedimentación y compactación, produciendo un efluente clarificado (Das *et al.*, 1993). La importancia del proceso de floculación es que convierte los flóculos individuales en flóculos grandes y densos que sedimentan rápidamente y

que incorporan partículas discretas que normalmente no sedimentan de manera aislada. Si el proceso de floculación falla durante el proceso de lodo activado, una fracción de las partículas no se incorporará a los flóculos. Por el contrario, podrían permanecer en el sobrenadante del TSS reduciendo la calidad del efluente, debido a la falta de aglutinación de las partículas en los flóculos. Una baja eficiencia en el proceso de sedimentación puede tener múltiples causas: (i) lodos desnitrificantes, (ii) manto de lodo excesivamente alto, (iii) floculación deficiente, o (iv) hidrodinámica deficiente. Con el fin de tomar las medidas correctivas apropiadas, es importante poder identificar la causa de la falla. Los lodos desnitrificantes y los lechos espesos pueden ser reconocidos y corregidos fácilmente (Parker *et al.*, 2000). Sin embargo, es más difícil distinguir entre problemas de floculación y de hidrodinámica deficiente, pero puede lograrse mediante una prueba donde se miden los Sólidos Suspendedos Dispersos con respecto a los Sólidos Suspendedos Floculados (prueba SSD/SSF) (Wahlberg *et al.*, 1995).

### 6.3.1 Prueba de SSD/SSF

#### 6.3.1.1 Objetivo y aplicación

Wahlberg *et al.* (1995) propusieron un procedimiento que permite hacer una distinción entre los problemas hidráulicos y los de floculación en un TSS dado, la llamada prueba de SSD/SSF. El uso de la prueba de SSD y/o SSF ha demostrado ser un procedimiento útil en diversos estudios: el mismo permite (i) evaluar los procesos de floculación y desfloculación en canales de conducción (Das *et al.*, 1993; Parker y Stenquist, 1986; Parker *et al.*, 1970), (ii) determinar la influencia de las perturbaciones hidráulicas sobre las partículas de lodo no sedimentables en el efluente de los tanques de aireación (Das *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 2000, 1970) y (iii) determinar los beneficios de un procedimiento de floculación ante la disminución de sólidos suspendidos en el efluente de una PTAR (Parker *et al.*, 2000; Wahlberg *et al.*, 1994).

La prueba de SSD/SSF puede dividirse en tres partes: la prueba de Sólidos Suspendedos del Efluente (SSE), la prueba de Sólidos Suspendedos Dispersos (SSD), y las de Sólidos Suspendedos Floculados (SSF). La prueba de SSE consiste en determinar la concentración de SST en el efluente. Los procedimientos para las pruebas de SSD y SSF se presentan en las secciones 6.3.1.3 y 6.3.1.4.



### 6.3.1.2 Equipo

Se necesitan los siguientes materiales y equipos para la ejecución de las pruebas de SSE, SSD y SSF:

#### General

- Equipo para la prueba de SST (APHA *et al.*, 2012).
- Cronómetro.

#### Prueba de SSE

- Muestra de efluente (mínimo 0.5 L).

#### Prueba de SSD

- Muestreador Kemmerer.
- Sifón para el muestreo del sobrenadante.

#### Prueba de SSF

- Jarra de floculación cuadrada de al menos 2.0 L.
- Seis agitadores de paleta.
- Muestra de lodo activado (mínimo 1.5 L).

### 6.3.1.3 Prueba de SSD

Los Sólidos Suspendidos Dispersos (SSD) se definen como la concentración de sólidos suspendidos (SS) que permanece en el sobrenadante después 30 minutos de sedimentación (Parker *et al.*, 1970). La prueba de SSD cuantifica el estado de floculación de un lodo activado en el momento y lugar en el que se toma la muestra. Esto se logra mediante el uso de un mismo recipiente (i.e. un muestreador de Kemmerer) para muestreo y sedimentación, con el fin de proteger los flóculos biológicos en la muestra de cualquier floculación secundaria o efecto de desintegración causados por cualquier etapa intermedia de transferencia.

El muestreador Kemmerer es un recipiente transparente de 4.2 L, 105 mm de diámetro y 600 mm de altura con cierres en la parte superior e inferior (Figura 6.11). La muestra es recolectada en el muestreador y se deja sedimentar durante 30 minutos. Después de este tiempo el sobrenadante es extraído mediante un sifón y se analiza la concentración de SS (Wahlberg *et al.*, 1995).

Los flóculos grandes sedimentables sedimentan en un período de 30 min, mientras que las partículas dispersas no incorporadas en el lodo que sedimenta permanecen en el sobrenadante. Se ha demostrado que en un TSS bien diseñado y operado, la concentración de SSD tiene un valor próximo a la de los SSE. Si existen diferencias

considerables entre los valores de las concentraciones de los SSE y los SSD esto puede indicar que existen problemas de clarificación. Para analizar el origen potencial de problemas que están ocurriendo (por ejemplo, de floculación o de rompimiento de flocs). Pueden realizarse pruebas de SSD con muestras tomadas en diferentes lugares del TSS (por ejemplo, a la entrada del sedimentador, a la salida del pozo central de floculación, o en la cercanía del vertedor de salida).

#### • Protocolo

- Sumerja el muestreador Kemmerer para tomar una muestra en el lugar deseado en el TSS.
- Deje reposar la muestra durante 30 min.
- Después de 30 min, extraiga 500 mL del sobrenadante (tenga cuidado de no alterar el lodo sedimentado).
- Analizar el sobrenadante muestreado para determinar la concentración de SS.



**Figura 6.11** Muestreador Kemmerer con cierre superior e inferior abierto (foto Royal Eijkelpamp).

#### • Ejemplo

Parker *et al.* (2000) ilustraron el uso de una prueba de SSD para solucionar fallas en el TSS en el caso de la

planta Central Marin Sanitation Agency en California. Se realizó una prueba de SSD en la planta, ya que se observaban valores altos de SSE durante los flujos máximos. Los resultados del ensayo SSD se proporcionan en la Tabla 6.7.

**Tabla 6.7** Valores medidos de SSD en la planta Central Marin Sanitation Agency en California (Parker *et al.*, 2000).

SSD (mg L <sup>-1</sup> ) Entrada pozo central	SSD (mg L <sup>-1</sup> ) Salida pozo central	SSD (mg L <sup>-1</sup> ) Vertedor del efluente	SSE (mg L <sup>-1</sup> ) Vertedor del efluente
10.4	11.0	3.6	8.5

A partir de estos resultados, quedó claro que no se produjo floculación en el pozo central, ya que los valores de SSD en la entrada y salida del mismo son similares. Sin embargo, la reducción significativa en los valores de SSD entre la salida del pozo central y el vertedor del sedimentador mostró que la floculación estaba ocurriendo en el tanque de sedimentación. Esto indicó que el lodo tenía una buena tendencia a la floculación, pero simplemente carecía de condiciones adecuadas para la floculación en el pozo del centro, lo que contribuía a flóculos de diámetro pequeño.

Sin embargo, los resultados de los SSD permitieron conocer un importante problema hidráulico en los clarificadores. La alta concentración de SSE comparada con los SSD en el vertedor del efluente significa que por el vertedor de efluente del clarificador está ocurriendo el lavado o pérdida de sólidos sedimentables.

### 6.3.1.4 Prueba SSF

Wahlberg *et al.* (1995) desarrollaron una prueba complementaria a la prueba de SSD, llamada Sólidos Suspendedos Floculados (SSF). Mientras que el ensayo SSD evalúa el estado de floculación de una muestra en un lugar específico del TSS en un momento determinado, el ensayo SSF cuantifica el potencial de floculación de una muestra de lodo activado antes de la sedimentación bajo condiciones ideales.

Para esta prueba, se recolecta una muestra de lodo activado en un frasco de floculación cuadrado (volumen mínimo de 2 litros). El volumen de la muestra debe ser de al menos 1.5 L. La muestra se agita suavemente durante 30 min a 50 rpm (Figura 6.12) antes de dejar

reposar durante 30 min y se mide la concentración en el sobrenadante. La floculación se maximiza por agitación, y la sedimentación se realiza en un dispositivo ideal (sin perturbaciones hidráulicas). Por lo tanto, se considera que los SSF medidos son los SSE mínimo posible.

Debido a que la concentración de SSF se mide bajo condiciones de floculación máxima y sedimentación ideal, no cambiará entre el tanque de aireación y el TSS. Por lo tanto, la muestra de lodo activado para la prueba del SSF se puede recolectar en cualquier lugar entre el tanque de aireación y el TSS.

#### • Protocolo

1. Recolectar una muestra de lodo activado de 1.5 L.
2. Verter esta muestra en un frasco cuadrado de floculación con un volumen de 2 L.
3. Agitar la muestra durante 30 min a 50 rpm.
4. Dejar de agitar y mantener la muestra en reposo durante 30 min.
5. Después de 30 minutos, extraiga 500 mL del sobrenadante (teniendo cuidado de no alterar el lodo sedimentado).
6. Analizar el sobrenadante muestreado para determinar la concentración de sólidos suspendidos.



**Figura 6.12** Configuración experimental para la prueba SSF. Una muestra de lodo activado es agitada durante 30 min en una jarra de floculación cuadrada (foto: E. Torfs).

### 6.3.1.5 Interpretación de los resultados de una prueba SSD/SSF

Un TSS que funcione satisfactoriamente proporciona condiciones adecuadas para la floculación, favoreciendo la incorporación al interior de los flóculos de aquellos pequeños sólidos dispersos que no tienen suficiente masa como para sedimentar en el TSS. Por el contrario, el funcionamiento deficiente del TSS, dará lugar a concentraciones elevadas de SSE. Los sólidos dispersos en suspensión existen como resultado de tres posibles mecanismos: (i) la floculación se ve limitada por reacciones químicas de superficie (por ejemplo, problemas de floculación de origen biológico), (ii) los sólidos no se incorporan a los flóculos debido al tiempo insuficiente para la floculación (es decir, un problema de floculación física), ó (iii) los flóculos se rompen por efectos de esfuerzos de corte o cizallamiento debido a una turbulencia excesiva (es decir, por problemas hidráulicos). La prueba SSD/SSF permite distinguir entre estos diferentes escenarios para tomar las medidas correctivas adecuadas.

Una prueba SSD/SSF típica consta de cuatro mediciones: la concentración de SSE, la concentración de SSD en la entrada del TSS (SSDi), la concentración de SSD en el vertedor del efluente (SSDo) y la concentración de SSF. Si existe un pozo de floculación, entonces los SSDi deben medirse después de esta estructura. Suponiendo que el sistema bajo estudio está trabajando con altas concentraciones de SSE, debido a que las pruebas SSD/SSF se realizan típicamente cuando existe un proceso de clarificación deficiente, se pueden definir cuatro escenarios. En la Tabla 6.8 (Kinnear, 2000) se proporciona una matriz de resolución de problemas SSD/SSF que muestra la causa del bajo rendimiento en diversos escenarios de prueba.

**Tabla 6.8** Matriz SSD/SSF de solución de problemas (Kinnear, 2000).

SSE altos y:		SSF	
		Altos	Bajos
SSD	Altos	Floculación biológica	Floculación física
	Bajos	No posible	Hidráulica

Los diferentes escenarios de prueba se pueden interpretar de la siguiente manera.

#### SSDi altos y SSF bajos

Este escenario indica una pobre floculación en el TSS, aunque el lodo activado tiene buenas propiedades de floculación. En este caso, o bien al lodo activado no se le está permitiendo suficiente tiempo para flocular, o se produce un rompimiento significativo de los flóculos antes de la sedimentación. La baja clarificación puede deberse a un problema de floculación de naturaleza física que se resuelve eliminando la causa de la ruptura de los flóculos o incorporando una etapa de floculación adicional antes de la sedimentación.

#### SSDi altos y SSF altos

Como en el caso anterior (SSDi altos y SSF bajos), estos resultados indican una pobre floculación en el TSS. Sin embargo, a pesar de que existen condiciones ideales de floculación proporcionadas por la prueba SSF, la clarificación no puede mejorarse. Por lo tanto, la floculación adicional no mejorará la clarificación y el problema muy probablemente es de naturaleza biológica dando como resultado un lodo con pobres propiedades de floculación. Modificar el TSS no resolverá este problema. La atención debe entonces dirigirse aguas arriba del TSS (por ejemplo, analizar las condiciones operativas y microbiológicas del tanque de aireación).

#### SSDi bajos y SSF bajos

SSDi bajos sugieren que el lodo afluente al sedimentador posee buenas condiciones de floculación. Como el SSDi ya está en el mismo intervalo que la concentración de SSF, una floculación adicional no mejorará el rendimiento del TSS y el problema es más probable que sea hidráulico (por ejemplo, debido a cortocircuitos). La comparación de la concentración de SSDo y SSE puede proporcionar confirmación adicional. Si la concentración de SSDo es significativamente menor que la concentración de SSE, entonces indica que existe una pérdida o "lavado" hidráulico de los sólidos sedimentables del lecho de lodo. Para mejorar la clarificación en este caso, la hidrodinámica del sedimentador debe ser analizada mediante pruebas de trazadores.

#### SSDi bajos y SSF altos

Este resultado no es posible teóricamente. En caso de que ocurra, se recomienda repetir la prueba.

#### • Ejemplo

Se utilizó una prueba SSD/SSF para evaluar el desempeño de los clarificadores existentes antes de la

ampliación de una PTAR en Greeley Water Pollution Control Facility en Colorado (Brischke *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 2000). El ensayo de SSD se realizó en dos lugares, es decir, en la entrada del TSS y en el vertedor del sedimentador. Los valores de SSD, SSF y SSE medidos se muestran en la Tabla 6.9.

**Tabla 6.9** Valores medidos de SSD, SSF y SSE en la Greeley Water Pollution Control Facility in Colorado (Brischke *et al.*, 1997).

SSDi (mg L <sup>-1</sup> )	SSDo (mg L <sup>-1</sup> )	SSF (mg L <sup>-1</sup> )	SSE (mg L <sup>-1</sup> )
29.2	22.0	8.2	25.5

Los altos valores de SSD tanto en la entrada como cerca del vertedor del sedimentador indican que no hay floculación en el tanque. El valor bajo de los SSF significa que el lodo tiene un alto potencial para flocular pero que carece de condiciones apropiadas para la floculación. Las altas concentraciones de SSE se pueden atribuir a un problema de floculación física que se puede resolver modificando físicamente el tanque para proporcionar condiciones de floculación adecuadas. En este caso específico esto se logró mediante modificaciones del pozo central.

## 6.3.2 Recomendaciones

### 6.3.2.1 Condiciones para la floculación

La ejecución adecuada de una prueba de SSF requiere condiciones ideales de floculación. Por lo tanto, es importante usar una jarra de floculación cuadrada para evitar la formación de vórtices durante la agitación. Hay que asegurar además que la muestra está completamente mezclada (es decir, no hay zonas muertas en la parte superior o inferior de la jarra de floculación).

### 6.3.2.2 Influencia de la temperatura

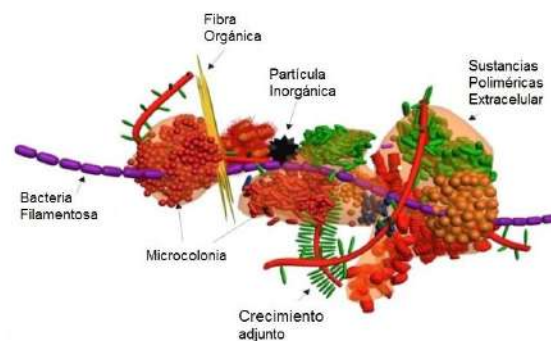
El volumen de muestra para la prueba de SSF es relativamente pequeño en comparación con el volumen del muestreador Kemmerer. Por lo tanto, se deben tomar algunas precauciones para asegurar que las muestras no cambien significativamente su temperatura durante la hora que se necesita para realizar la prueba. Por ejemplo, no realizar la prueba bajo la incidencia directa de luz solar.

### 6.3.2.3 Muestreo del sobrenadante

Independientemente de la técnica específica de muestreo del sobrenadante, debe tenerse cuidado de no extraer ningún residuo flotante o sólidos sedimentados en la muestra sobrenadante, ya que esto puede alterar los resultados. Además, como las concentraciones en el efluente y el sobrenadante son generalmente muy bajas, el volumen muestreado para el ensayo SST debe ser suficientemente grande ( $\pm 500$  mL).

## 6.3.3 Avances en la medición del estado de la floculación

De lo anterior se desprende que una "buena biofloculación" del lodo activado es un requisito previo para una "buena sedimentación" y para obtener buena calidad en el efluente. Por lo tanto, ¿cuál es la definición de flóculo para un lodo activado bien floculado? Un flóculo de lodos activados se compone de: (i) una columna vertebral de organismos filamentosos, a los cuales, (ii) se pueden sumar microcolonias (es decir, cúmulos de microorganismos) y esta aglomeración de microorganismos se incorpora en una matriz de (iii) sustancias poliméricas extracelulares (Figura 6.13). Cuando alguno de estos componentes no está presente y/o no se relaciona adecuadamente con el resto, entonces es cuando pueden ocurrir problemas de sedimentabilidad y clarificación.



**Figura 6.13** Composición estructural de un flóculo de lodos activados: las microcolonias se unen a las bacterias filamentosas que constituyen la columna vertebral del flóculo, mientras que las sustancias poliméricas extracelulares constituyen la matriz de inclusión (Nielsen *et al.*, 2012).

Uno de los problemas más comunes de sedimentación es el del abultamiento filamentosos en el que existe un predominio de organismos filamentosos que harán que la estructura del flóculo sea muy abierta y

retenga mucha agua. Los organismos filamentosos podrían entrelazarse con otros sobresalientes, de manera que se forma una red que evita que el lodo sedimente de manera eficiente. Por el contrario, cuando no hay suficientes organismos filamentosos para formar la columna vertebral, se observan los denominados flóculos puntuales o dispersos. Estos son pequeños grupos de micro-colonias que no se aglutinan con los demás flóculos y por consiguiente no sedimentan bien. Por lo tanto, un buen flóculo con buenas propiedades de sedimentación debe ser denso (sin tener una estructura abierta) y suficientemente grande.

Estas características del lodo activado se pueden cuantificar mediante análisis de imágenes microscópicas. Los cambios en el tamaño medio del flóculo, la longitud del filamento, la esfericidad del flóculo, su dimensión fractal, etc. pueden revelar mucha información sobre el comportamiento de la sedimentación del lodo. Mientras que algunos grupos de investigación han estado desarrollando software específicos de análisis de imágenes para inferir esta información (Amaral y Ferreira, 2005, Da Motta *et al.*, 2001a, 2001b, Jenneé *et al.*, 2004, van Dierdonck *et al.*, 2013), también existen softwares libres disponibles (como ImageJ o FIJI (<http://fiji.sc/Fiji>)) para realizar análisis básicos. Una visión general de lo que está actualmente disponible en este dominio del análisis de imágenes puede consultarse en la literatura especializada (Mesquita *et al.*, 2013). Para el monitoreo microscópico que está más enfocado en revelar las comunidades microbianas específicas presentes, el análisis FISH puede ser interesante (ver capítulo 7 del presente libro). Más aún, el lector puede acceder al manual de FISH para el tratamiento biológico de aguas residuales (Nielsen *et al.*, 2009).

Como en el análisis de imágenes, se pueden mencionar tres herramientas adicionales de monitoreo relacionadas con la biofloculación, que están más enfocadas en las fuerzas que mantienen unidos los componentes del flóculo. Por un lado, la medición de la resistencia global del flóculo (Mikkelsen y Keiding, 2002) compara la turbidez del sobrenadante antes y después del esfuerzo cortante de una muestra de lodo. Una menor turbidez después del esfuerzo indica una mejor biofloculación. Por otra parte, se puede medir la hidrofobicidad relativa y la carga superficial. La hidrofobicidad relativa está relacionada con las interacciones hidrofóbicas que resultan ser importantes para mantener el flóculo agregado. El valor que resulta

de tal análisis (por ejemplo, la prueba de MATH, Chang y Lee, 1998), que evalúa la tendencia a la adhesión microbiana a los hidrocarburos, no debe tomarse como un valor absoluto, pero puede ser interesante al revelar los cambios durante un período de operación determinado. La carga superficial está relacionada con fuerzas electrostáticas; con una superficie de lodo más neutra, los agregados experimentan menos repulsión, lo que da como resultado una coagulación y floculación mejoradas. La medición de la carga superficial se basa en una técnica de titulación coloidal (Kawamura y Tanaka, 1966, Kawamura *et al.*, 1967, Morgan *et al.*, 1990).

## 6.4 MEDICIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE SEDIMENTACIÓN DE LODOS GRANULARES

### 6.4.1 Objetivo y aplicación

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías de tratamiento de aguas residuales con mejores propiedades de sedimentabilidad. Una de estas tecnologías son los lodos aerobios granulares. Los gránulos aeróbicos son biopelículas esféricas con un factor de forma típico de 0.7 – 0.8 (Beun *et al.*, 2002). Mientras que los lodos activados convencionales se caracterizan por velocidades de sedimentación inferiores a  $5 \text{ m h}^{-1}$  (Vanderhasselt y Vanrolleghem, 2000), los lodos granulares sedimentan mucho más rápidamente con velocidades de sedimentación en el intervalo de 10 a  $100 \text{ m h}^{-1}$  (Bassin *et al.*, 2012; Etterer y Wilderer, 2001, Winkler *et al.*, 2012, 2011a).

Además, los gránulos muestran una baja tendencia a la floculación que sitúa su comportamiento de sedimentación en el extremo izquierdo de la Figura 6.1. Los gránulos sedimentarán independientemente del resto, incluso a altas concentraciones (con casi ningún régimen de retardo ni compresión) formando directamente un lecho de lodo compacto. Por esta razón, el IVL después de 5 minutos será aproximadamente el mismo que el medido después de 30 minutos. Los valores de IVL típicos para los gránulos son menores a  $30 \text{ mL/g}$  (de Kreuk y van Loosdrecht, 2004, Liu *et al.*, 2005, Liu y Tay, 2007, Tay *et al.*, 2004).

Los lodos granulares se desarrollan en Reactores Batch Secuenciales (SBR, por sus siglas en inglés), ya que estos sistemas cumplen con una serie de requisitos específicos que favorecen la formación de gránulos: un



régimen de alimentación periódico o intermitente (que crea fases de abundancia-carencia de sustrato) que posibilita la selección de microorganismos apropiados (Beun *et al.*, 1999), cortos tiempos de sedimentación para asegurar la retención de la biomasa granular y el lavado de la biomasa floculada (Qin *et al.*, 2004) y una fuerza cortante tal que asegura la óptima integridad física de los gránulos (Tay *et al.*, 2001).

Uno de los parámetros más importantes para seleccionar el lodo granular es la velocidad de sedimentación. Mediante la aplicación de tiempos cortos de sedimentación en un SBR, sólo se seleccionan los agregados de biomasa más grandes que tienen altas velocidades de sedimentación, mientras que los lodos floculentos “se lavan” y pierden a través del efluente (Beun *et al.*, 2000). Los parámetros que determinan la velocidad de sedimentación de las partículas y a su vez, el lavado de la biomasa, son de importancia crucial para la tecnología de lodos granulares. Los equilibrios de fuerzas para la sedimentación de una partícula esférica dependen de la fuerza de Arquímedes, gravedad y fuerza de arrastre (Giancoli, 1995). A partir de esta relación, la velocidad de sedimentación está influenciada por la viscosidad del agua, tamaño de partícula, su forma, y la diferencia entre la densidad del agua y las partículas. Por lo tanto, la velocidad de sedimentación de los gránulos está influenciada por la densidad y tamaño de las partículas donde un aumento de diámetro tiene una influencia mayor (Winkler *et al.*, 2012, 2011a). Esta sección presenta un método para medir la densidad y el tamaño de los gránulos, así como un procedimiento para calcular la velocidad de sedimentación teórica de gránulos bajo diferentes condiciones de temperatura.

### 6.4.2 Equipos

Para las pruebas con lodos granulares se necesitan los siguientes equipos:

- a. Picnómetro.
- b. Microbalanza.
- c. Tamices o un microscopio con un analizador de imágenes.

### 6.4.3 Mediciones de densidad

Se han reportado densidades de gránulos entre 1036 y 1048 kg m<sup>-3</sup> (Etterer y Wilderer, 2001), que son

comparables a las densidades de lodos activados convencionales (1020-1060 kg m<sup>-3</sup>) (Andreadakis, 1993; Dammel y Schroeder, 1991). Sin embargo, dentro del núcleo del gránulo pueden formarse precipitados (Lee y Chen, 2015, Mañas *et al.*, 2012) aumentando significativamente la densidad del gránulo hasta 1300 kg m<sup>-3</sup> (Juang *et al.*, 2010, Winkler *et al.*, 2013).

La densidad específica de biomasa se puede medir con un picnómetro (Figura 6.14). Un picnómetro es un frasco de vidrio simple y económico, con un volumen de calibración precisa. El frasco del picnómetro se cierra con una tapa de vidrio que actúa como válvula que contiene una ranura pequeña, a través de la cual se expulsa el exceso de agua cuando está cerrado. El picnómetro tiene un volumen conocido.



Figura 6.14 Imagen de un picnómetro (foto: E. Torfs).

#### • Protocolo

1. Medir el peso del picnómetro completamente seco (cerrado con tapa de vidrio) ( $m_0$ ).
2. Llenar el picnómetro con agua y volver a medir su peso ( $m_T$ ). Es muy importante secar cuidadosamente el exterior del picnómetro antes de determinar el peso.
3. Calcular la masa de agua en el picnómetro ( $m_{H_2O}$ ) como:
 
$$m_{H_2O} = m_T - m_0 \quad \text{Ec. 6.11}$$
4. Medir el peso de la muestra de gránulos para la que desea determinar la densidad ( $m_s$ ).
5. Colocar la muestra de gránulos dentro del picnómetro y determinar el peso del picnómetro junto con la muestra agregada ( $m_0 + m_s$ ).
6. Rellenar con agua el picnómetro (que contiene la muestra de sólidos) y volver a pesar su masa

( $m_{ST}$ ). Como en el paso dos, asegúrese de que el picnómetro se seque por fuera cuidadosamente antes de determinar el peso.

7. Calcular el peso del agua añadida ( $m'_{H_2O}$ ) como:

$$m'_{H_2O} = m_{TS} - m_0 - m_s \quad \text{Ec. 6.12}$$

8. Determinar el volumen de agua añadida ( $V'_{H_2O}$ ) de acuerdo a:

$$V'_{H_2O} = \frac{m'_{H_2O}}{\rho_{H_2O}} \quad \text{Ec. 6.13}$$

9. Calcular el volumen de sólidos medidos  $V_s$  a partir de la diferencia entre el volumen de agua que ha llenado el picnómetro vacío ( $V$ ) y el volumen de agua previamente determinado ( $V'_{H_2O}$ ).

$$V_s = V - V'_{H_2O} = \frac{m_{H_2O} - m'_{H_2O}}{\rho_{H_2O}} \quad \text{Ec. 6.14}$$

10. Finalmente, calcular la densidad del gránulo  $\rho_s$  como:

$$\rho_s = \frac{m_s}{V_s} \quad \text{Ec. 6.15}$$

#### • Ejemplo

Para determinar la densidad de una muestra de lodo granular se utiliza un picnómetro con un volumen ( $V$ ) de 0.1 L. Todas las mediciones y cálculos se reportan en la Tabla 6.10 (la densidad de agua  $\rho_{H_2O}$ , a 20 ° C es 998 g L<sup>-1</sup>).

**Tabla 6.10** Cálculo de la densidad a una muestra de lodo granular.

Variable	Símbolo	Procedimiento	Valor
Masa picnómetro vacío (g)	$m_0$	Medido	54.51
Masa picnómetro y agua (g)	$m_T$	Medido	153.70
Masa de agua (g)	$m_{H_2O}$	Calculado	99.19
Masa de sólido (g)	$m_s$	Medido	19.56
Masa picnómetro, sólidos y agua (g)	$m_{TS}$	Medido	154.55
Masa agua añadida (g)	$m'_{H_2O}$	Calculado	80.48
Volumen agua añadida (L)	$V'_{H_2O}$	Calculado	0.08
Volumen de sólidos (L)	$V_s$	Calculado	0.02
Densidad de sólidos (g L <sup>-1</sup> )	$\rho_s$	Calculado	1010.40

## 6.4.4 Determinación del tamaño de la biomasa granular

Aunque no hay un consenso sobre el diámetro mínimo de la biomasa granular (Bathe *et al.*, 2005), se han utilizado tamices con un diámetro de 0.2 mm para determinar su tamaño mínimo (Bin *et al.*, 2011; de Kreuk, 2006; Li *et al.*, 2009). El mayor diámetro reportado es de 16 mm (Zheng *et al.*, 2006), pero típicamente los diámetros oscilan entre 0.5-3 mm (de Kreuk y van Loosdrecht, 2004; Shi *et al.*, 2009; Winkler *et al.*, 2011b). La distribución del tamaño se puede medir ya sea mediante simples pruebas de tamizado o mediante un analizador de imágenes.

### 6.4.4.1 Tamizado

El tamaño de los gránulos se puede determinar mediante tamices con diferentes tamaños de malla. El cribado se puede realizar con tamices con aberturas de malla de 2.0; 1.0; 0.5 y 0.3 mm, lo que permite cubrir el intervalo de tamaño de gránulo más común.



**Figura 6.15** Tamices apilados, con diferentes aberturas de malla (foto: Fieldmaster).

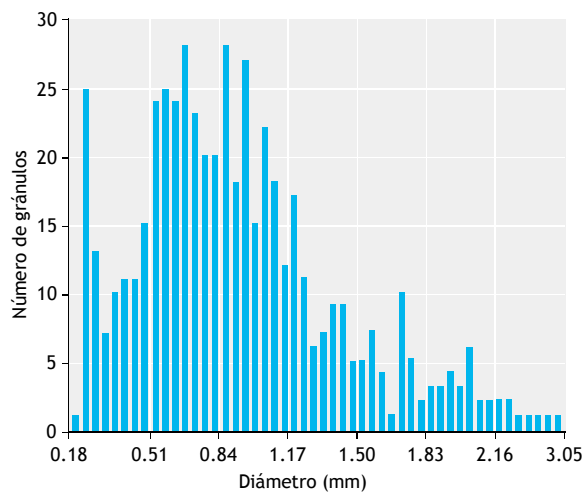
#### • Protocolo

1. Mida el peso húmedo total de una muestra.
2. Monte los tamices verticalmente uno encima del otro en orden creciente de abertura de la malla (de abajo hacia arriba) de manera que la malla más gruesa esté en la parte superior (Figura 6.15).
3. Vierta la muestra de gránulo en los tamices.
4. Lave cada tamiz sucesivamente para permitir que los gránulos se muevan de un tamiz a otro.

5. Filtre el líquido (que ha goteado a través de todos los tamices) para recoger partículas de menos de 0.3 mm.
6. Retrolave cada tamiz para retener cada fracción de gránulo en un vaso de precipitado separado.
7. Determine el peso húmedo y, si es necesario, el peso seco (SST), el contenido de cenizas y el de SSV de cada fracción, lo que resultará en el porcentaje teórico de cada clase de tamaño (Laguna *et al.*, 1999).

### 6.4.4.2 Analizador de imágenes

Alternativamente, el tamaño del gránulo puede medirse por medio de un analizador de imágenes usando el área promediada de la superficie proyectada de los gránulos. Para este método, se transfiere una muestra a una placa Petri y se coloca bajo un estéreo microscopio con una ampliación fija (por ejemplo, con una lente de aumento de 7.5). Cada imagen analizada es registrada por el analizador de imágenes. La placa de Petri necesita ser girada varias veces para medir diferentes gránulos. Diferentes analizadores de imagen están disponibles en el mercado y cada uno requiere un manejo diferente. En la Figura 6.16 se presenta un ejemplo con datos de distribución de tamaño de gránulo, creados durante el procedimiento de medición.



**Figura 6.16** Distribución de tamaño de partícula de un reactor de lodo granular.

## 6.4.5 Cálculo de la velocidad de sedimentación de los gránulos

### • Protocolo

La densidad media y el diámetro medidos de los gránulos pueden usarse para calcular la velocidad teórica de sedimentación. Para números de Reynolds menores o iguales a 1, la ley de Stokes puede usarse para calcular la velocidad de sedimentación de una partícula.

$$v_s = \frac{g}{18} \cdot \frac{\rho_p - \rho_a}{\rho_a} \cdot \frac{d_p^2}{\nu_a} \quad \text{Ec. 6.16}$$

El número de Reynolds puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$\text{Re} = d_p \cdot \frac{v_s}{\nu_a} \quad \text{Ec. 6.17}$$

Donde,  $v_s$  es la velocidad de sedimentación de una partícula ( $\text{m s}^{-1}$ ),  $d_p$  es el diámetro de partícula (m),  $\rho_p$  es la densidad de partícula ( $\text{kg m}^{-3}$ ),  $\rho_a$  es la densidad del fluido ( $\text{kg m}^{-3}$ ),  $g$  es la constante de la aceleración de la gravedad ( $9.81 \text{ m s}^{-2}$ ),  $\nu_a$  es la viscosidad cinemática del agua ( $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ), y  $\text{Re}_p$  es el número de Reynold de la partícula.

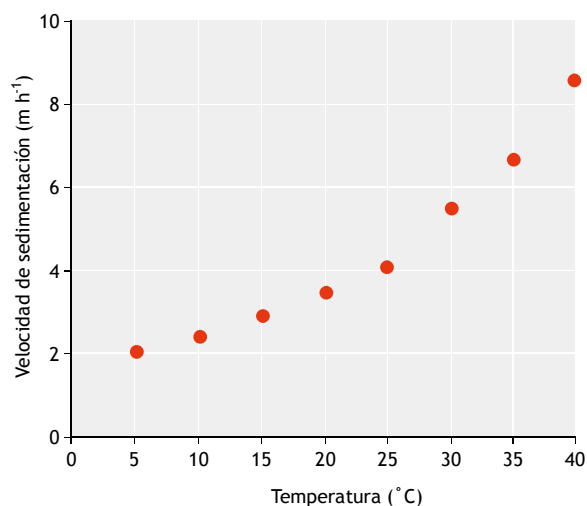
La densidad y viscosidad del medio dependen de la temperatura y de los solutos presentes en el agua. Con el aumento de la temperatura, la viscosidad y la densidad del agua disminuyen. A alta temperatura, las moléculas del agua son más móviles que a baja temperatura, lo que resulta en una disminución de la viscosidad en un factor de 2 para el intervalo de temperatura de entre 10 y 40 °C (Podolsky, 2000). Una tabla con valores de densidad y viscosidad de agua a diferentes temperaturas se puede encontrar en la literatura especializada.

### • Ejemplo

La Tabla 6.11 muestra un ejemplo de cálculo de la velocidad de sedimentación de una partícula con un diámetro de 0.4 mm y densidad de  $1010 \text{ kg m}^{-3}$  a diferentes temperaturas, representas en la Figura 6.17. Tenga en cuenta que la condición de un número de Reynolds menor o igual a 1 no se cumple para todas las temperaturas. Las implicaciones de esto se discutirán más adelante en esta sección.

**Tabla 6.11** Velocidad de sedimentación de gránulos con diámetro de partícula de 0.4 mm y densidad de  $1\ 010\ \text{kg m}^{-3}$  a diferentes temperaturas.

T	°C	5	10	15	20	25	30	35	40
$N_a$	$\text{m}^2\ \text{s}^{-1}$	1.5e-06	1.3e-06	1.1e-06	1.0e-06	9.4e-07	8.2e-07	7.4e-07	6.6e-07
$\rho_a$	$\text{kg m}^{-3}$	1000	1000	999	998	997	996	994	992
Re	-	0.2	0.2	0.2	0.4	0.5	0.7	1.0	1.5
$v_s$	$\text{m h}^{-1}$	2.1	2.5	3.0	3.6	4.2	5.5	6.8	8.7



**Figura 6.17** Cálculo de la velocidad de sedimentación de gránulos con diámetro de partícula de 0.4 mm y densidad de  $1\ 010\ \text{kg m}^{-3}$  a diferentes temperaturas.

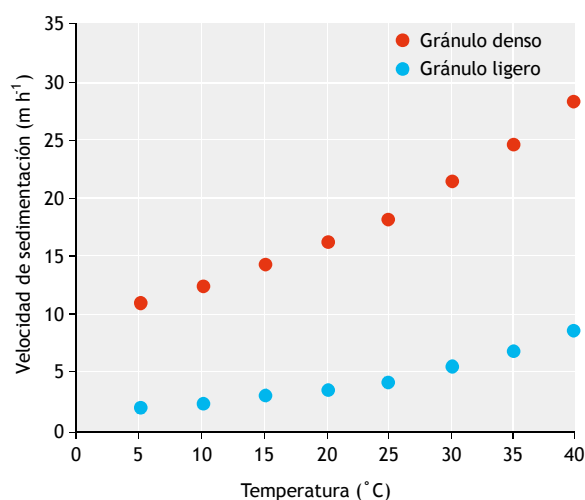
El ejemplo de la Figura 6.17 muestra que la velocidad de sedimentación de un gránulo pequeño con un diámetro de  $400\ \mu\text{m}$  y una densidad de  $1\ 010\ \text{kg m}^{-3}$  varía entre  $2\ \text{m h}^{-1}$  y  $9\ \text{m h}^{-1}$  para temperaturas comprendidas entre  $5$  y  $40\ ^\circ\text{C}$  (Winkler *et al.*, 2012). A temperaturas bajas, la separación de los flocúlos de los gránulos pequeños y ligeros (con velocidades de sedimentación típicas por debajo de  $5\ \text{m h}^{-1}$ ) puede ser problemática. Investigaciones previas han demostrado experimentalmente que un proceso de puesta en operación a bajas temperaturas es difícil. Además, todos los procesos microbianos se desarrollan más lentamente a bajas temperaturas (Brdjanovic *et al.*, 1997, Kettunen y Rintala, 1997, Lettinga *et al.*, 2001), limitando así la granulación a una temperatura aún más baja. Un aumento en la densidad o del diámetro de los gránulos aumentará significativamente la velocidad de sedimentación y facilitará así la separación.

#### • Ejemplo

Las velocidades de sedimentación calculadas para una partícula con el mismo diámetro (0.4 mm) pero una mayor densidad ( $1\ 050\ \text{kg m}^{-3}$ ) a diferentes temperaturas se muestran en la Tabla 6.12 y la Figura 6.18.

**Tabla 6.12** Velocidad de sedimentación de gránulos con diámetro de partícula de 0,4 mm y densidad de  $1\ 050\ \text{kg m}^{-3}$  a diferentes temperaturas.

T	°C	5	10	15	20	25	30	35	40
$N_a$	$\text{m}^2\ \text{s}^{-1}$	1.5e-06	1.3e-06	1.1e-06	1.0e-06	9.4e-07	8.2e-07	7.4e-07	6.6e-07
$\rho_a$	$\text{kg m}^{-3}$	1000	1000	999	998	997	996	994	992
Re	-	0.8	1.0	1.4	1.7	2.1	2.8	3.6	4.7
$v_s$	$\text{m h}^{-1}$	10.7	12.1	14.0	15.8	17.7	20.9	23.9	27.9



**Figura 6.18** Cálculo de las velocidades de sedimentación a diferentes temperaturas para gránulos ligeros ( $1\ 010\ \text{kg m}^{-3}$ ) y densos ( $1\ 050\ \text{kg m}^{-3}$ ) con un diámetro de partícula de 0.4mm.

Las partículas más grandes y más densas dan como resultado números de Reynolds mayores que 1. Para estas partículas las velocidades teóricas de sedimentación calculadas de acuerdo con la ley de Stokes se desviarán de las velocidades reales de sedimentación. Para la mayoría de las aplicaciones, estos errores ( $<10\%$ ) son aceptables y la ley de Stokes sigue siendo una buena aproximación. Cálculos de velocidad de sedimentación más precisos son posibles pero requieren un método de cálculo avanzado incluyendo un procedimiento iterativo para determinar el Re. Ilustraciones de este enfoque se pueden encontrar en Winkler *et al.* (2012).

## 6.4.6 Recomendaciones

### 6.4.6.1 Validación de resultados

Las velocidades de sedimentación calculadas (Sección 6.4.5) pueden ser validadas experimentalmente realizando pruebas de sedimentación con gránulos recolectados a partir de tamices con diferentes tamaños de malla (Sección 6.4.4). Las diferentes fracciones de tamaño se pueden verter en la propia columna de sedimentación o en un cilindro, y se mide el tiempo hasta que el gránulo alcanza el fondo del sedimentador, con el fin de expresar su velocidad de sedimentación en metros por hora.

### 6.4.6.2 Aplicación para lodos floculentos

Los métodos experimentales descritos en las secciones 6.4.3 y 6.4.4 también pueden aplicarse a lodos activados en TSSs (particularmente en la región superior de los mismos donde se sabe que ocurre la sedimentación discreta). Sin embargo, este tipo de aplicación no es actualmente muy común debido a que el alto potencial de floculación de los lodos hace que la atención se dirija principalmente hacia la sedimentación retardada (ya que éste es el régimen predominante a la concentración donde el lodo activado entra en el TSS y es el que principalmente se utiliza para determinar su diseño y capacidad). Por otro lado, para el lodo granular, el régimen de sedimentación dominante es el discreto, haciendo que la atención se dirija a las mediciones del tamaño y la densidad.

## 6.5 MEDICIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN EN TSP

### 6.5.1 Introducción

Los tanques de sedimentación primaria (TSP) se utilizan como pretratamiento en las PTARs. Las campañas de medición realizadas desde principios de los años setenta sobre las descargas urbanas han demostrado claramente que muchos contaminantes se presentan en forma de partículas en suspensión. Además, las partículas transportadas en suspensión se reconocen como altamente sedimentables a pesar de su tamaño relativamente pequeño (30 a 40  $\mu\text{m}$ ). Por lo tanto, la

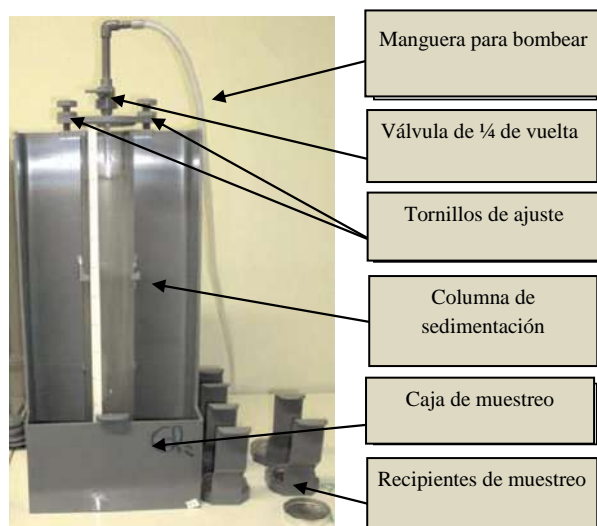
separación gravitacional en los TSPs puede servir como una herramienta valiosa para separar partículas gruesas y sedimentables del agua residual previo a cualquier tratamiento biológico.

Como en las aguas residuales crudas las concentraciones del material particulado o suspendido son relativamente bajas en comparación con las concentraciones en los TSSs, el régimen de sedimentación en TSP es de naturaleza discreta (tanto no floculenta como floculenta) y la velocidad de sedimentación depende de las propiedades individuales de las partículas. Dada la variedad de densidades, formas y tamaños de las partículas en suspensión en las aguas residuales (tener en cuenta la ley de Stokes), se hace difícil y costoso calcular las velocidades de sedimentación de diferentes partículas a partir de mediciones de tamaño y densidad. Esta sección presenta un método para medir directamente la distribución de las velocidades de sedimentación en muestras representativas de aguas residuales. Esta medición puede realizarse utilizando el protocolo ViCAs, desarrollado por Chebbo y Gromaire (2009). El ViCAs (por sus siglas en francés, *Vitesse de Chute en Assainissement*) es una prueba para medir la velocidad de sedimentación de las partículas en una columna en condiciones estáticas. La prueba proporciona una visión del comportamiento de las partículas presentes en una muestra de aguas residuales con el fin de obtener una idea sobre su composición. Como tal, puede servir de información importante para diferentes aplicaciones. En los tanques de sedimentación primarios, los resultados de los experimentos de ViCAs se pueden utilizar como entrada para los modelos de clarificadores primarios (Bachis *et al.*, 2015) o para estudiar el efecto de la dosificación química en la distribución de velocidad de sedimentación para mejorar el tratamiento. Además, los experimentos de ViCAs pueden ser aplicados en el diseño de tanques de retención de alcantarillado combinado o donde el conocimiento de la distribución de velocidad de sedimentación puede usarse para determinar un tiempo de retención hidráulico (TRH) óptimo, y la correspondiente reducción de carga a la planta de tratamiento.

### 6.5.2 Principio general

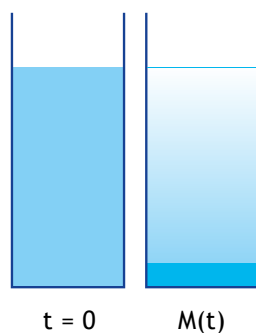
La prueba ViCAs se realiza sedimentando una muestra en una columna ViCAs (Figura 6.19).





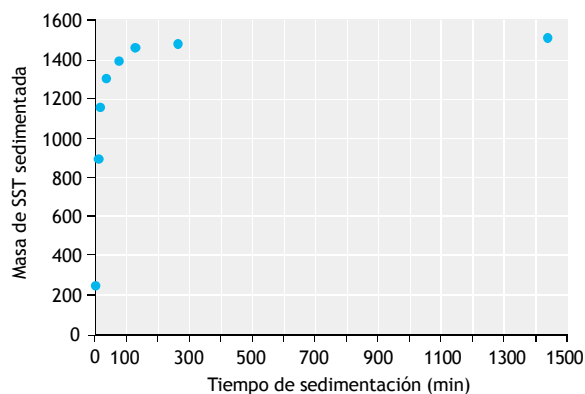
**Figura 6.19** Equipo para la prueba ViCAs (foto: Chebbo y Gromaire, 2009).

El protocolo ViCAs se basa en el principio de las suspensiones homogéneas (Figura 6.20). Al comienzo de la medición, los sólidos se distribuyen uniformemente sobre toda la altura de sedimentación. Entonces se asume que las partículas sedimentan individualmente, sin formar agregados y sin difusión. Los sólidos se recuperan el fondo de la columna, después de haber sedimentado durante un tiempo predeterminado.



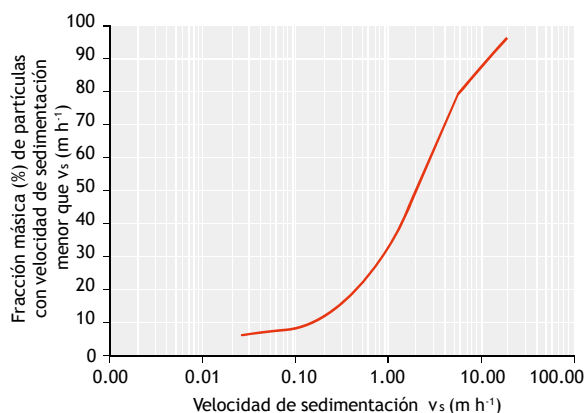
**Figura 6.20** Principio de suspensión homogénea.

Entonces la masa se recupera de los recipientes donde se colecta, lo que permite determinar el aumento de la masa acumulada  $M(t)$  del material sedimentado en función del tiempo  $t$  (Figura 6.21).



**Figura 6.21** Crecimiento acumulado de la masa sedimentada en función del tiempo.

En la práctica, la curva acumulativa de la masa sedimentada consiste en  $n$  puntos ( $7 < n < 12$ ), correspondientes a  $n$  muestras tomadas a diferentes tiempos de sedimentación. Las mediciones de la masa sedimentada en función del tiempo permiten calcular la distribución de la velocidad de sedimentación  $f(v_s)$ . La Figura 6.22 muestra un ejemplo de una curva de distribución de velocidad de sedimentación para una muestra típica de aguas residuales.



**Figura 6.22** Curva de distribución de velocidad de sedimentación  $f(v_s)$  para una muestra típica de agua residual.

### 6.5.3 Muestreo y preservación de las muestras

El ensayo se puede llevar a cabo utilizando una muestra compuesta o mezclando varias muestras de composición similar (por ejemplo, recolectando 5 botellas de 1 L en un intervalo de 10 minutos). Durante el muestreo, se eliminan los sólidos suspendidos que pueden perturbar el

ensayo y, si es necesario, la muestra puede filtrarse directamente mediante un filtro grueso, lo cual no afecta su composición. Los análisis deben realizarse dentro de un máximo de 24 horas después de la recolección de la muestra, para evitar la floculación. Si la concentración inicial supera los  $1\,000\text{ mg L}^{-1}$ , es necesario diluir la muestra. Para realizar la dilución, la muestra se divide en dos, de manera que se tienen 5 L por una parte y 15 L por la otra. De la muestra de 15 L, se extraen 5 L de sobrenadante después de 24 h de sedimentación y es el líquido que se utiliza para realizar la dilución.

### 6.5.4 Equipos

Para ejecutar el protocolo de ViCAs se necesita el siguiente equipamiento:

1. Columna ViCAs con su soporte y dos vasos asociados.
2. Banda de goma para mantener la columna fija y estable.
3. Cronómetro.
4. Vaso de precipitado de 5 L.
5. Espátula (para homogeneización).
6. Bomba de vacío.
7. Tubo de conexión de plástico.
8. Erlenmeyer de 1 000 mL para crear un frasco trampa y proteger la bomba.

La figura 6.23 muestra el equipo ViCAs y el sistema de llenado listo para su uso.



**Figura 6.23** Aparato ViCAs con equipo de llenado (foto: Gromaire M.C. y Chebbo G, manual ViCAs).

### 6.5.5 Protocolo analítico

La muestra a analizar se vierte en la caja de muestra (figura 6.19) y se aspira rápidamente mediante vacío, hacia la columna. Se mantiene en vacío durante toda la duración del ensayo, es decir, la muestra se “cuelga” en la columna. Las partículas sedimentadas en un cierto tiempo  $\Delta t$  se recogen en vasos o recipientes colocados debajo de la columna. Tanto los vasos como la columna tienen el mismo diámetro. Los vasos se llenan primero con agua del grifo y luego se sumergen a su vez en la caja de muestras y se mueven bajo la columna. Al final de un tiempo particular  $\Delta t$ , se filtra el contenido de los vasos y se miden los SST y SSV de los sólidos recuperados.

- **Preparación de la muestra**

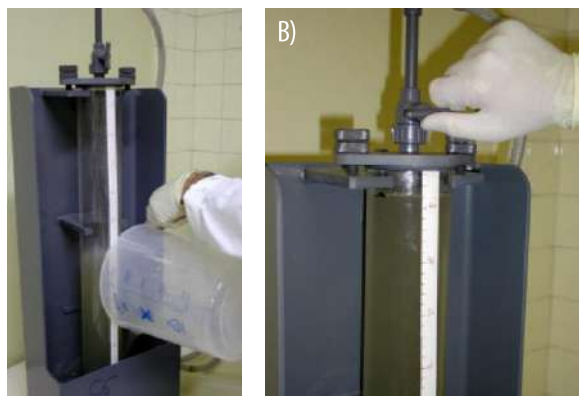
- a. Homogenizar la muestra utilizando la espátula y verter 5 L en un vaso de precipitados apropiado.
- b. Agitar de nuevo y tomar una muestra de 500 mL que se utilizará para determinar la concentración inicial de SST en la columna.

#### Llenado de la columna

- a. Mezcle la muestra de 4.5 L antes de verterla rápidamente en la caja de muestras (Figura 6.24A).
- b. Succione el líquido en la columna (en 2 a 5 segundos) y luego cierre la válvula con un  $\frac{1}{4}$  de vuelta (Figura 6.24B)
- c. Detenga la bomba de vacío.

Es importante observar que:

- a. La fase de llenado requiere algún entrenamiento porque tiene que ser hecho muy rápidamente.
- b. Para obtener una prueba más exitosa, es mejor tener dos operadores.
- c. Un volumen insuficiente de la muestra o el cierre tardío de la válvula puede dar lugar a fugas de aire en la columna. El llenado tendría entonces que repetirse.
- d. Es indispensable el uso de un dispositivo de protección como una botella de Woulff.



**Figura 6.24** Llenado de la caja con una muestra (A) y cierre de la válvula al vacío (B) (foto: Gromaire M.C. y Chebbo G., manual ViCAs).

- **Inicio de la prueba de sedimentación**

- Inmediatamente después de cerrar la válvula con un  $\frac{1}{4}$  de vuelta, deslice el primer vaso debajo de la columna: coloque suavemente el vaso en la caja de muestras y deslícela debajo de la base de la columna.
- Ponga en funcionamiento el cronómetro y desconecte el equipo de bombeo.
- Coloque un pedazo de cinta adhesiva para medir la altura del agua en la columna al final del ensayo (puede haber una variación en la altura del agua debido al intercambio de vasos).

- **Cambio de vasos**

- Diez segundos antes de la hora de cambio, introduzca suavemente un vaso lleno de agua en la ranura (Figura 6.25).
- Deslice los dos vasos suavemente a la nueva posición y retire el vaso viejo (Figura 6.26).

Es importante destacar que:

- Para un análisis completo, el cambio de vaso se lleva a cabo a los 2 min, 6 min, 14 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y más de 22 h para un total de 8 vasos.
- Este paso es complicado porque no se debe perder el contenido del vaso y se debe minimizar cualquier turbulencia causada por mover los vasos debajo de la columna.

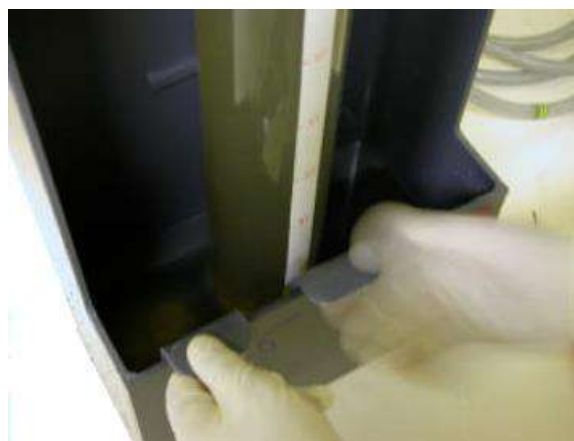
- **Determinación de la concentración final**

La concentración final en la columna se determina colectando el volumen total de la columna y analizando su contenido. Este paso permite realizar una comprobación del balance de masas, que es esencial para determinar la validez de la prueba.

- Después de tomar la última muestra, tapar el extremo de la columna, retirar la columna de su soporte y verter su contenido en la jarra de 5 L
- Mezclar bien el contenido y tomar una muestra de 500 mL para determinar la concentración final de SST.



**Figura 6.25** Introducción de un vaso nuevo lleno de agua (foto: Gromaire M.C. y Chebbo G., ViCAs manual).



**Figura 6.26** Moviendo los vasos a sus nuevas posiciones (foto: Gromaire M.C. y Chebbo G., ViCAs manual).

- **Análisis de SST y SSV**

Los SST y SSV inicial y final contenidos en el vaso, se miden de acuerdo con los métodos 2540 D y 2540 E de Standard Methods (APHA *et al.*, 2012).

### 6.5.6 Cálculos y presentación de resultados

#### 6.5.6.1 Comprobación del balance de masas

Se realiza un balance de masas para estimar las pérdidas de sólidos durante el ensayo y así evaluar la calidad de la medición.

El porcentaje de error del balance de masas E (%) se puede calcular como sigue:

$$E = \frac{M_{ini} - (M_{set} + M_{fin})}{M_{ini}} (100) \tag{Ec. 6.18}$$

Donde,  $M_{ini}$  es la masa inicial en la columna (mg),  $M_{fin}$  es la masa final en la columna (mg), y  $M_{set}$  es la suma de las masas recuperadas en los vasos (mg).

#### 6.5.6.2 Cálculo de la distribución de la velocidad de sedimentación

Un análisis teórico (Chebbo y Bachoc, 1992, Chancellor *et al.*, 1998) muestra que la curva acumulativa  $M(t)$  puede representarse como:

$$M(t) = S(t) + t \frac{dM(t)}{dt} \tag{Ec. 6.19}$$

Donde,  $M(t)$  es la masa acumulada de partículas depositadas en el fondo de la columna entre los tiempos  $t = 0$  y  $t$ ,  $S(t)$  es la masa de partículas sedimentadas entre  $t = 0$  y  $t$  que tienen una velocidad de sedimentación superior de  $H/t$ , con  $H$  como altura del agua en la columna,  $t \frac{dM(t)}{dt}$ , es la masa de partículas sedimentadas en el tiempo  $t$  que tiene una velocidad de sedimentación menor de  $H/t$  (y por lo tanto inicialmente localizada a una altura en la columna de agua menor que  $H$ ).

Para obtener la distribución de la velocidad de sedimentación de la muestra, es necesario determinar la curva  $S(t)$  que posteriormente puede ser transformada en la distribución acumulativa de velocidad de sedimentación  $f(v_s)$  (Figura 6.22).

Prácticamente, una función continua  $M(t)$  se ajusta numéricamente a los valores medidos  $M(t_i)$ , y luego se utiliza para resolver analíticamente Ec. 6.20.

La siguiente expresión se puede usar para  $M(t)$ :

$$M(t) = \frac{b}{1 + \left(\frac{c}{t}\right)^d} \tag{Ec. 6.20}$$

Donde  $b$ ,  $c$  y  $d$  son tres parámetros numéricos que pueden ser determinados por el método de los mínimos cuadrados. Se deben respetar las siguientes restricciones:  $0 < b \leq M_{init}$ ,  $c > 0$  y  $0 < d < 1$ . La Figura 6.27 presenta un ejemplo del resultado de ajustar la curva.

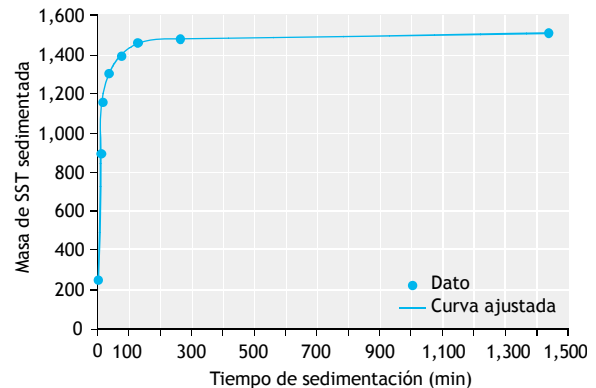


Figura 6.27 Ejemplo de curva ajustada de una serie acumulativa de sólidos suspendidos.

La curva ajustada  $M(t)$  también puede usarse para calcular  $S(t)$ :

$$S(t) = M(t) - t \cdot \frac{dM(t)}{dt} = \frac{b \cdot \left(1 + (1-d) \cdot \left(\frac{c}{t}\right)^d\right)}{\left(1 + \left(\frac{c}{t}\right)^d\right)^2} \tag{Ec. 6.21}$$

De lo que sigue:

$$f(v_s) = 100 \cdot \left(1 - \frac{S(t)}{M_{set} + M_{fin}}\right) \text{ con } v_s = \frac{H}{t} \tag{Ec. 6.22}$$

#### 6.5.6.3 Recomendaciones

- Manipulaciones**

Los errores del balance de masas serán menores del 10% si hay una manipulación cuidadosa. Un error superior al 15% debería dar lugar a una invalidación del análisis de ViCAs.

- Frecuencia de muestreo**

Los tiempos de muestreo son los que generalmente se usan para hacer el fraccionamiento de los SST de la muestra. Pueden estar sujetos a cambios dependiendo del proyecto y del tipo de muestra. Además, el operador

puede cambiar el  $\Delta t$  utilizado, siempre que se respete un intervalo mínimo de 7 y un máximo de 15 intervalos.

#### • Reproducibilidad

Se pueden realizar pruebas de reproducibilidad para confirmar los resultados de una prueba ViCAs. El éxito de la prueba depende de la meticulosidad de la persona en el seguimiento del protocolo y la manipulación del equipo. Especialmente importante es el cambio de los vasos ubicados debajo de la columna y la filtración de los sólidos recuperados. La Figura 6.28 muestra los resultados de una prueba de reproducibilidad del efluente primario de la planta de tratamiento de aguas residuales de Québec-Est.

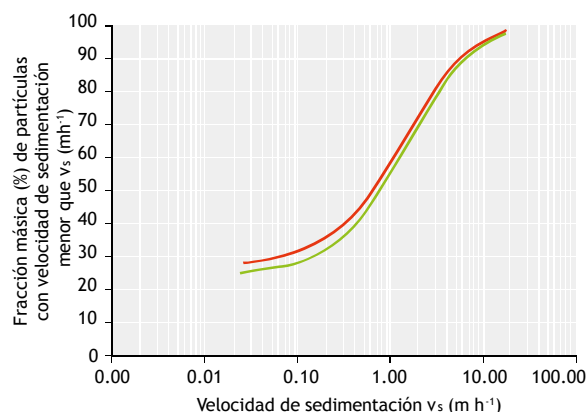


Figura 6.28 Prueba de reproducibilidad del ViCAs.

## Referencias

- Amaral, A., Ferreira, E., (2005). Activated sludge monitoring of a wastewater treatment plant using image analysis y partial least squares regression. *Anal. Chim. Acta.* 544: 246-253.
- Andreadakis, A.D., (1993). Density of activated sludge solids. *Water Res.* 27: 1707-1714.
- Bachis, G., Maruéjould, T., Tik, S., Amerlinck, Y., Melcer, H., Nopens, I., Lessard, P., Vanrolleghem, P.A., (2015). Modelling y characterisation of primary settlers in view of whole plant y resource recovery modelling. *Wat. Sci. Tech.* 72: 2251-2261.
- Bassin, J.P., Winkler, M.-K.H., Kleerebezem, R., Dezotti, M., van Loosdrecht, M.C.M., (2012). Improved phosphate removal by selective sludge discharge in aerobic granular sludge reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 109: 1919-1928.
- Bathe, S., de Kreuk, M.K., McSwain, B.S., Schwarzenbeck, N., (2005). Discussion Outcomes, In *Aerobic Granular Sludge*. IWA Publishing. ISBN 978-1843395096.
- Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J., (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 33: 2283-2290.
- Beun, J.J., van Loosdrecht, M. c. M., Heijnen, J.J., (2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Res.* 36: 702-712.
- Beun, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., (2000). Aerobic granulation. *Water Sci. Technol.* 41: 41-48.
- Bin, Z., Zhe, C., Zhigang, Q., Min, J., Zhiqiang, C., Zhaoli, C., Junwen, L., Xuan, W., Jingfeng, W., (2011). Dynamic y distribution of ammonia-oxidizing bacteria communities during sludge granulation in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor. *Water Res.* 45: 6207-6216.
- Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J., Heijnen, J.J., (1997). Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal. *J. Environ. Eng.* 123: 144-153.
- Brischke, K., Wahlberg, W., Dingeman, T., Schump, D., (1997). Performance quantified: the impact of final clarifier performance on effluent quality, in: *Procs. 70<sup>th</sup> Annual WEF Conference y Exposition.* 237-244.
- Chancelier, J., Chebbo, G., Lucas-Aiguier, E., (1998). Estimation of settling velocities. *Water Res.* 32: 3461-3471.
- Chang, I., Lee, C., (1998). Membrane filtration characteristics in membrane-coupled activated sludge system - the effect of physiological states of activated sludge on membrane fouling. *Desalination.* 120: 221-233.
- Chebbo, G., Bachoc, A., (1992). Characterization of suspended solids in urban wet weather discharges. *Wat. Sci. Tech.* 25: 171-179.
- Chebbo, G., Gromaire, M.-C., (2009). VICAS - An Operating protocol to measure the distributions of suspended solid settling velocities within urban drainage samples. *J. Environ. Eng.* 135: 768-775.
- da Motta, M., Pons, M., Roche, N., (2001a). Automated monitoring of activated sludge in a pilot plant using image analysis. *Water Sci. Technol.* 43: 91-96.
- da Motta, M., Pons, M., Roche, N., Vivier, H., (2001b). Characterization of activated sludge by automated image analysis. *Biochem. Eng. J.* 9: 165-173.
- Daiger, G.T., Roper, E.T., (1985). The relationship between SVI y activated-sludge settling characteristics. *J. Water Poll. Control Fed.* 57: 859-866.
- Dammel, E.E., Schroeder, E.D., (1991). Density of activated sludge solids. *Scanning.* 25: 841-846.
- Das, D., Keinath, T.M., Parker, D., Wahlberg, E.J., (1993). Floc breakup in activated sludge plants. *Water Environ. Res.* 65, 138-145.
- De Clercq, J., Jacobs, F., Kinnear, D.J., Nopens, I., Dierckx, R. a, Defranco, J., Vanrolleghem, P.A., (2005). Detailed spatio-temporal solids concentration profiling during batch settling of activated sludge using a radiotracer. *Water Res.* 39: 2125-2135.
- De Clercq, J., Nopens, I., Defranco, J., Vanrolleghem, P.A., (2008). Extending y calibrating a mechanistic hindered y compression settling model for activated sludge using in-depth batch experiments. *Water Res.* 42: 781-791.
- de Kreuk, M.K., (2006). *Aerobic Granular Sludge: Scaling up a new technology.* T.U. Delft.
- de Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M., (2004). Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci. Technol.* 49.
- Dick, R.I., Vesilind, P.A., (1969). The Sludge Volume Index - What is it? *J. WPCF.* 41:1285-1291.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., (1995). *Standard Methods for Examination of Water & Wastewater*, 19<sup>th</sup> edition. American Public Health Association, Washington, DC.



- Ekama, G.A., Barnard, J.L., Gunthert, F.W., Krebs, P., McCorquodale, J.A., Parker, D.S., (1997). Secondary Settling Tanks: Theory, Modelling, Design y Operation. International Association on Water Quality.
- Etterer, T., Wilderer, P.A., (2001). Generation y properties of aerobic granular sludge. *Water Sci. Technol.* 43: 19-26.
- Giancoli, D.C., (1995). Physics. Principles with applications. New Jersey: Prentice Hall. ISBN 9780130606204.
- Härtel, L., Pöpel, H.J., (1992). A dynamic secondary clarifier model including processes of sludge thickening. *Water Sci. Technol.* 25: 267-284.
- Jenneé, R., Banadda, E., Smets, I., Van Impe, J., (2004). Monitoring activated sludge settling properties using image analysis. *Water Sci. Technol.* 50: 285.
- Juang, Y.-C., Sunil, S.A., Lee, D.J., Tay, J.H., (2010). Stable aerobic granules for continuous-flow reactors: Precipitating calcium y iron salts in granular interiors. *Bioresour. Technol.* 101: 8051-8057.
- Kawamura, S., Hanna Jr, G.P., Shumate, K.S., (1967). Application of colloid titration technique to flocculation control. *Am. Water Work. Assoc.* 59: 1003-1013.
- Kawamura, S., Tanaka, Y., (1966). Application of colloid titration technique to coagulant dosage control. *Water Sew. Work.*
- Kettunen, R.H., Rintala, J.A., (1997). The effect of low temperature y adaptation on the methanogenic activity of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 570-576.
- Kinnear, D.J., (2000). Evaluating Secondary Clarifier Performance y Capacity, in: Proceedings of the 2000 Florida Water Resources Conference, Tampa, FL.
- Koopman, B., Cadée, K., (1983). Prediction of thickening capacity using diluted sludge volume index. *Water Environ. Res.* 17: 1427-1431.
- Lee, D.-J., Chen, Y.-Y., (2015). Magnesium carbonate precipitate strengthened aerobic granules. *Bioresour. Technol.* 183: 136-140.
- Lee, S.-E., Koopman, B., Bode, H., Jenkins, D., (1983). Evaluation of alternative sludge settleability indices. *Water Res.* 17: 1421-1426.
- Lettinga, G., Rebac, S., Zeeman, G., (2001). Challenge of psychrophilic anaerobic wastewater treatment. *Trends Biotechnol.* 19: 363-370.
- Li, X.-M., Liu, Q.Q., Yang, Q., Guo, L., Zeng, G.M., Hu, J.M., Zheng, W., (2009). Enhanced aerobic sludge granulation in sequencing batch reactor by Mg<sup>2+</sup> augmentation. *Bioresour. Technol.* 100: 64-67.
- Liu, Q.S., Liu, Y., Tay, S., Show, K., Ivanov, V., Benjamin, M., Tay, J.H., (2005). Startup of Pilot-Scale Aerobic Granular Sludge Reactor by Stored Granules. *Environ. Technol.* 26: 1363-1370.
- Liu, Y.-Q., Tay, J.-H., (2007). Cultivation of aerobic granules in a bubble column y an airlift reactor with divided draft tubes at low aeration rate. *Biochem. Eng. J.* 34: 1-7.
- Locatelli, F., François, P., Laurent, J., Lawniczak, F., Dufresne, M., Vazquez, J., Bekkour, K., (2015). Detailed velocity y concentration profiles measurement during activated sludge batch settling using an ultrasonic transducer. *Separ. Sci. Technol.* 50: 1059-1065.
- Mañas, A., Pocquet, M., Biscans, B., Sperandio, M., (2012). Parameters influencing calcium phosphate precipitation in granular sludge sequencing batch reactor. *Chem. Eng. Sci.* 77: 165-175.
- Mancell-Egala, W., Kinnear, D., Jones, K., De Clippeleir, H., Takács, I., Murthy, S., (2016). Limit of stokesian settling concentration characterizes sludge settling velocity. *Water Res.* 90: 100-110.
- Mesquita, D.P., Amaral, A.L., Ferreira, E.C., (2013). Activated sludge characterization through microscopy: a review on quantitative image analysis y chemometric techniques. *Anal. Chim. Acta* 802: 14-28.
- Mikkelsen, L.H., Keiding, K., (2002). The shear sensitivity of activated sludge: an evaluation of the possibility for a standardised floc strength test. *Water Res.* 36: 2931-2940.
- Mohlman, F.M., (1934). The Sludge Index. *Sewage Work. J.* 6: 119-122.
- Morgan, J.W., Forster, C.F., Evison, L., (1990). A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic y activated sludges. *Water Res.* 24: 743-750.
- Nielsen, P.H., Daims, H., Lemmer, H., (2009). FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification y quantification of microorganisms in activated sludge y biofilms by FISH. IWA Publishing. ISBN 9781843392316.
- Nielsen, P.H., Saunders, A.M., Hansen, A.A., Larsen, P., Nielsen, J.L., (2012). Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater - a model system in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23: 452-459.
- Parker, D.S., Kaufman, W.J., Jenkins, D., (1970). Characteristics of biological flocs in turbulent regimes. *SERL Report No. 70-5*. University of California, Berkeley, CA.
- Parker, D.S., Stenquist, R.J., (1986). Flocculator-Clarifier performance. *J. Water Pollut. Control Fed.* 58: 214-219.
- Parker, D.S., Wahlberg, E.J., Gerges, H.Z., (2000). Improving secondary clarifier performance y capacity using a structured diagnostics approach. *Water Sci. Technol.* 41: 201-208.
- Pitman, A.R., (1984). Settling of nutrient removal activated sludges. *Water Sci. Technol.* 17: 493-504.
- Podolsky, R.D., (2000). Temperature y water viscosity: Physiological versus mechanical effects on suspension feeding. *Science.* 265: 100-103.
- Qin, L., Liu, Y., Tay, J.-H., (2004). Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochem. Eng. J.* 21: 47-52.
- Shi, X.-Y., Yu, H.-Q., Sun, Y.-J., Huang, X., (2009). Characteristics of aerobic granules rich in autotrophic ammonium-oxidizing bacteria in a sequencing batch reactor. *Chem. Eng. J.* 147: 102-109.
- Stobbe, C.T., (1964). Über das Verhalten des belebten Schlammes in aufsteigender Wasserbewegung. Technische Hochschule Hannover.
- Tay, J., Pan, S., He, Y., Tay, S., (2004). Effect of Organic Loading Rate on Aerobic Granulation. I: Reactor Performance. *J. Environ. Eng.-ASCE* 130: 1094-1101.
- Tay, J.-H., Liu, Q.-S., Liu, Y., (2001). The effects of shear force on the formation, structure y metabolism of aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 227-233.
- Van Dierdonck, J., den Broeck, R., Vansant, A., Van Impe, J., Smets, I., (2013). Microscopic image analysis versus sludge volume index to monitor activated sludge bioflocculation - a case study. *Sep. Sci. Technol.* 48: 1433-1441.
- Vanderhasselt, A., Vanrolleghem, P.A., (2000). Estimation of sludge sedimentation parameters from single batch settling curves. *Water Res.* 34: 395-406.
- Vesilind, P.A., (1968). Design of prototype thickeners from batch settling tests. *Water Sew. Work.* 115: 302-307.
- Wahlberg, E.J., Keinath, T.M., Parker, D.S., (1994). Influence of activated sludge flocculation time on secondary clarification. *Water Environ. Res.* 66: 779-786.
- Wahlberg, E.J., Merrill, D.T., Parker, D.S., (1995). Troubleshooting activated sludge secondary clarifier performance using simple diagnostic tests, in: Procs. 68th Annual WEF Conference y Exposition. 435-444.
- White, M.J.D., (1976). Design y control of secondary settling tanks. *Water Pollut. Control.* 74: 459-467.
- White, M.J.D., (1975). Settling of activated sludge. Technical Report TR11. Water Research Centre, England.

- Winkler, M.K., Kleerebezem, R., Strous, M., Chandran, K., van Loosdrecht, M.C.M., (2013). Factors influencing the density of aerobic granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 7459-7468.
- Winkler, M.K.H., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., de Bruin, L.M.M., van den Brand, T.P.H., van Loosdrecht, M.C.M., (2011a). Selective sludge removal in a segregated aerobic granular biomass system as a strategy to control PAO-GAO competition at high temperatures. *Water Res.* 45: 3291-3299.
- Winkler, M.K.H., Kleerebezem, R., Kuenen, J.G., Yang, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., (2011b). Segregation of Biomass in Cyclic Anaerobic/Aerobic Granular Sludge Allows the Enrichment of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria at Low Temperatures. *Environ. Sci. Technol.* 45: 7330-7337.
- Winkler, M.K.H., Bassin, J.P., Kleerebezem, R., van der Lans, R.G.J.M., van Loosdrecht, M.C.M., (2012). Temperature y salt effects on settling velocity in granular sludge technology. *Water Res.* 46: 3897-3902.
- Zheng, Y.-M., Yu, H.Q., Liu, S.H., Liu, X.Z., (2006). Formation y instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere.* 63: 1791-1800.

# MICROSCOPIA

Autores:

Jeppé L. Nielsen

Robert J. Seviour

Per H. Nielsen

Revisor:

Jiři Wanner

## 7.1 INTRODUCCIÓN

Un método ampliamente aplicado para estudiar la microbiología de los sistemas de lodo activado es la microscopía. La microscopía proporciona una visión del mundo oculto de los microorganismos, que no puede ser visto de otra manera a simple vista. En este capítulo se describen protocolos para el examen microscópico de muestras de lodos activados. Estos incluyen técnicas de tinción para proporcionar una impresión de la enorme diversidad taxonómica y funcional que se encuentra entre los microorganismos en lodos activados. La tinción puede permitir distinguir entre las poblaciones de bacterias, hongos y protozoarios. El estudio de estos microorganismos requiere el uso correcto del microscopio para revelar diferencias en su forma y tamaño y para diagnosticar estructuras celulares. En el mercado existen diversos microscopios de luz estándar elaborados por diferentes fabricantes con un rendimiento adecuado para fines rutinarios. Sin embargo, el uso de técnicas microscópicas más sofisticadas puede mejorar el nivel de información que se obtenga.

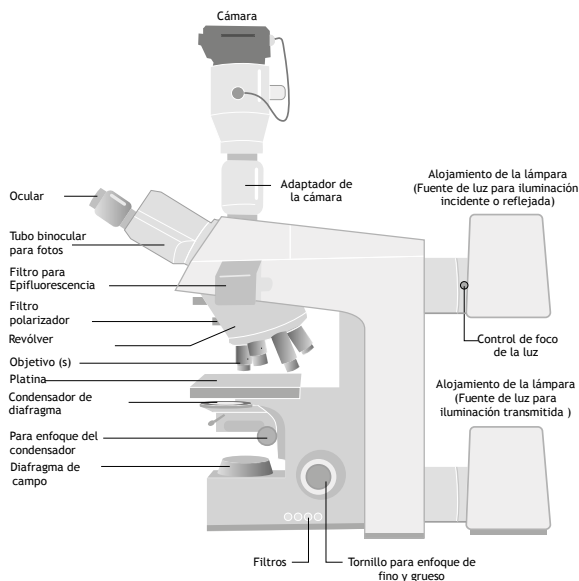
En este capítulo se explican los principios básicos del microscopio de luz y de luz fluorescente y se proporcionan metodologías para técnicas de tinción

relevantes e interpretación de datos. El objetivo de los protocolos experimentales esbozados aquí es el de servir como una guía fácil de usar, para la caracterización del examen morfológico celular, técnicas de tinción (por ejemplo DAPI: dihidrocloruro de 4', 6-diamidino-2-fenilindol, Neisser, Gram, Blue Nile) para detectar la viabilidad celular y la acumulación intracelular de compuestos de almacenamiento que incluyen poli-hidroxi-alcanoatos (PHA) y gránulos de poli-fosfato (poli-P) y la identificación *in situ* de poblaciones microbianas utilizando Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH, de sus siglas en inglés).

Las combinaciones de las técnicas antes descritas proporcionan poderosas herramientas para elucidar las características metabólicas de las células en un solo nivel celular. La combinación de FISH con técnicas de tinción suele ser problemática, por lo que se requiere una planificación cuidadosa para asegurar que la interpretación de esta información sea inequívoca. Este capítulo proporciona la base para llevar a cabo protocolos estándar de microscopía.

## 7.2 EL MICROSCOPIO DE LUZ

El objetivo del microscopio es proporcionar suficiente aumento o ampliación para distinguir entre los objetos examinados. El microscopio más comúnmente utilizado es un microscopio de campo brillante que proyecta un haz de luz enfocada sobre la imagen en una lámina de cristal o portaobjeto. Hoy en día, casi todos estos microscopios son (i) binoculares (Figura 7.1), lo que significa que ambos ojos son usados para ver el objeto, haciendo que el uso persistente sea menos agotador, y (ii) compuesto, donde se usa más de un sistema de lentes para lograr la resolución requerida de la muestra.



**Figura 7.1** Microscopio compuesto.

Los lentes de los oculares y de los objetivos proporcionan la potencia de resolución y aumento del microscopio, mientras que el sistema de lentes del condensador, maximiza la resolución de los sistemas, aumentando la apertura numérica o la capacidad de captura de la luz de los lentes del objetivo al enfocar la fuente de luz sobre la muestra (Figura 7.2). Su posición es crítica para la optimización del rendimiento, y por lo tanto debe suministrar un cono de luz capaz de llenar la abertura del objetivo. La resolución refleja la capacidad del microscopio de discriminar entre dos entidades muy próximas. Si están más cerca de la distancia de resolución, aparecen borrosas en la imagen del microscopio. El tamaño real, el tamaño de la imagen y el aumento están relacionados de la siguiente manera:

$$\text{Tamaño de la imagen} = \text{Tamaño real} \cdot \text{Aumento} \quad \text{Ec. 7.1}$$

La distancia entre dos objetos distintos se denomina resolución  $d$  y su relación con la apertura numérica (AN) y la longitud de onda ( $\lambda$ ) puede expresarse con la siguiente expresión:

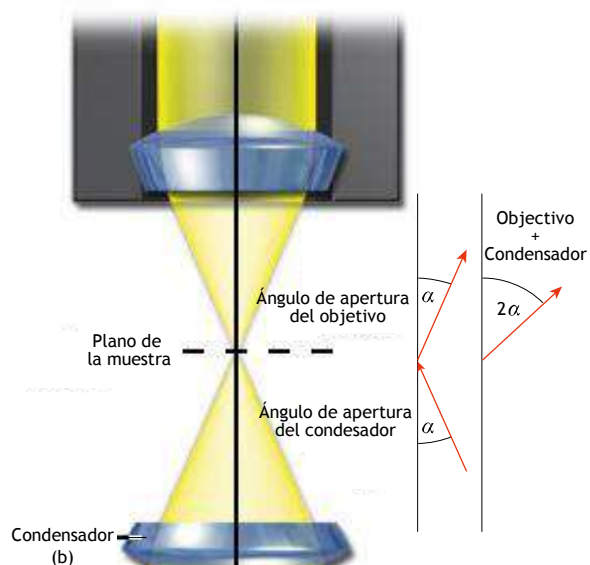
$$d = \frac{1.22 \cdot \lambda}{N \cdot \sin \alpha} \quad \text{o} \quad d = \frac{1.22 \cdot \lambda}{AN_{\text{objetivo}} + AN_{\text{condensador}}} \quad \text{Ec. 7.2}$$

Donde,

$\lambda$  es la longitud de onda de la luz;

$\alpha$  es igual a la mitad del ángulo de apertura del objetivo

$N$  es el índice de refracción del medio de inmersión usado debajo del lente del objetivo.



**Figura 7.2** Paso de luz ilustrando el concepto de apertura numérica, y condensadores.

A mayores ampliaciones usadas (100x), se tiene una capacidad de captura de luz baja (alta AN), por tanto, es necesario aumentar el índice de refracción (IR) del medio entre la muestra y el lente del objetivo. Para microscopios de luz, se obtiene la mayor resolución cuando el ángulo de apertura del condensador coincide con el objetivo. Los lentes con el aire como medio no pueden tener una AN que exceda 0.65, mientras que en agua y ciertas inmersiones tales como los aceites la AN de la lente del objetivo puede teóricamente aumentarse a aproximadamente 1.515, y la resolución del microscopio

es entonces de aprox.  $0.2 \mu\text{m}$ , lo que resulta adecuado para visualizar y estudiar la mayoría de las bacterias, aunque no los virus. Las reflexiones de luz y la pérdida de intensidad de iluminación pueden eliminarse usando aceite de inmersión con un IR que coincida con el IR del cristal del lente. La AN de un objetivo depende también en parte de la cantidad de corrección para cualquier aberración óptica. Los objetivos con alta corrección tienen AN mucho mayor para el aumento respectivo (Tabla 7.1).

La reflexión de la luz y la pérdida de intensidad de iluminación pueden eliminarse usando aceite de inmersión con un IR que coincida con el del cristal del lente. La AN de un objetivo depende también en parte de la cantidad de corrección para cualquier óptica. Los objetivos altamente corregidos tienen AN mucho mayor para el aumento respectivo (Tabla 7.1).

**Tabla 7.1** Ejemplos de objetivo, su apertura numérica (AN) y corrección óptica.

Aumento	Objetivo Plano Acromático (AN)	Objetivo Plano de Fluorita (AN)	Objetivo Plano Apocromático (AN)
2×	0.06	0.08	0.10
4×	0.10	0.13	0.20
10×	0.25	0.30	0.45
20×	0.40	0.50	0.75
40×	0.65	0.75	0.95
40× (aceite)	n/a	1.30	1.40
63×	0.75	0.85	0.95
63× (aceite)	n/a	1.30	1.40
100× (aceite)	1.25	1.30	1.40

## 7.2.1 Aplicación estándar de la microscopía óptica

Para generar imágenes de alta calidad, el microscopio debe ser configurado y utilizado correctamente. A continuación se describe una rutina recomendada para configurar el microscopio. Los operadores más experimentados podrán omitir algunos de los pasos en el procedimiento, ya que pueden haber adquirido familiaridad con el microscopio y las muestras bajo observación. Los microscopios son instrumentos de precisión, sensibles y caros de reparar o reemplazar. Por lo tanto, requieren un manejo y mantenimiento

cuidadosos. Así, se recomienda considerar las siguientes sugerencias:

- Evite grandes variaciones de temperatura, guarde el equipo en un lugar fresco y oscuro y protéjalo del polvo. Utilice siempre una cubierta contra el polvo cuando no esté en uso.
- Los lentes de los objetivos deben limpiarse con un paño para lentes. No seque el objetivo con un pañuelo seco, ya que esto puede provocar arañazos. Comience por soplar el polvo o cualquier material suelto con un plumero óptico presurizado.
- Tenga cuidado de no diseminar el aceite de inmersión residual en otros oculares u objetivos limpios. Utilice un limpiador comercial o disolvente (por ejemplo, alcohol etílico al 70% - EtOH) para eliminar cualquier aceite o grasa. No se aconseja la inundación o la colocación de disolventes directamente sobre el lente, y siempre se debe utilizar un paño para lentes.
- Mantenga el microscopio limpio en todo momento.
- Los objetivos sumergidos en aceite deben limpiarse inmediatamente después de su uso, limpiándolos con un paño de lentes. Si no es así, el aceite puede secarse y, por lo tanto, debe eliminarse con una solución adecuada de limpieza de lentes. No utilice ningún disolvente (por ejemplo, alcohol) ya que esto podría ocasionar daños en el lente.

## 7.2.2 Objetivos de bajo poder

En la primera configuración del microscopio para un óptimo rendimiento, siempre se debe empezar usando un aumento pequeño, por ejemplo un objetivo 10× o menor. Los oculares deben ajustarse a una posición adecuada para la visión con ambos ojos. Luego deben seguirse los siguientes pasos:

- Baje la platina e inserte el portaobjetos preparado para que el espécimen esté centrado en el cono de luz después de pasar por el condensador.
- Baje el lente hasta que se encuentre a unos pocos milímetros de la superficie deslizante. Mire hacia abajo el ocular mientras gira cuidadosamente la perilla de enfoque grueso (tornillo macrométrico) hasta que la imagen se vuelva



visible, y luego, ajustando con la perilla de enfoque fino (tornillo micrométrico), busque una imagen nítida de la muestra.

- Ajuste el iris del diafragma para optimizar el contraste hasta que la imagen sea nítida. Compruebe, con el ocular extraído, que aproximadamente entre 2/3 a 2/4 del fondo del lente está totalmente iluminado. Si no, ajuste la posición del condensador hasta que el iris del diafragma esté bien enfocado y, si es necesario, reajuste hasta que se superponga al círculo de luz. La mejor resolución es cuando el condensador se eleva hasta su altura máxima.
- Vuelva a insertar el ocular y examine la preparación utilizando el ajuste de enfoque fino y la platina ajustable.

### 7.2.3 Objetivos de alto poder

En un microscopio de buena calidad, todos los objetivos deben ser parafocales, lo que significa que todos los objetivos tienen ajustes de enfoque muy similares.

- Gire la boquilla (el revólver) hasta el objetivo de alto poder y luego realice el ajuste fino para que la imagen sea nítida.
- Ajuste el iris del diafragma para aumentar la iluminación y optimizar el contraste y luego volver a observar la muestra.

### 7.2.4 Objetivo de inmersión

Compruebe el medio de inmersión requerido para el objetivo de gran aumento (normalmente escrito en el objetivo o indicado por un anillo negro (aceite) o azul (agua). Agregue una pequeña gota de aceite de inmersión o agua (<2 cm de diámetro) sobre el portaobjeto mientras gira el objetivo hacia su lugar. El espacio entre el portaobjeto y el lente debe estar llena con el medio de inmersión.

Algunos microscopios están equipados solamente con objetivos de aceite o agua. Éstos deben ser usados agregando una gota pequeña del medio requerido sobre el portaobjeto y bajando lentamente el lente del objetivo hasta que toque el medio, apreciado por un cambio claro en el cono de luz. A continuación, realice un ajuste fino mientras mira a través de los oculares hasta obtener una imagen nítida. Si esto falla, repita todo el procedimiento. Evite usar cualquier medio que no sea el designado. En

otras palabras, no cambie de un objetivo de inmersión de aceite a un objetivo de agua o aire o cualquier otra combinación. Limpie y seque el portaobjeto antes de cambiar los objetivos.

### 7.2.5 Consideraciones importantes

Cuando se realizan investigaciones microscópicas debe considerarse:

- Cuando la imagen se agranda más allá del poder físico de resolución del microscopio la ampliación es infructuosa. Las ampliaciones óptimas se logran generalmente usando 500 – 1 000 veces la AN del objetivo. Por esta razón, si el objetivo no proporciona suficiente resolución, evite el uso de oculares de alta ampliación adicional. Por ejemplo:  
 $63\times (\text{objetivo}) \cdot 12.5\times (\text{ocular}) = 787.5.$
- Una vez que el condensador se haya enfocado correctamente, no debería ser necesario ajustarlo más.
- El diafragma del iris necesita ser ajustado para que el cono de la luz coincida con el AN del objetivo y, por lo tanto, usualmente debe reajustarse cada vez que se cambie el objetivo.
- Los operarios menos experimentados tienden a usar sólo un ojo mientras miran a través de los oculares. Mantenga los dos ojos abiertos. Esto podría requerir alguna práctica para acostumbrarse a ello.
- Cuando se usan lentes de inmersión, las burbujas de aire pueden perjudicar notablemente la calidad de la imagen. Estas se pueden detectar quitando el ocular y examinando el plano focal posterior a través de los tubos de observación del microscopio. Si se observa, apriete suavemente la cubierta. Alternativamente, limpie los lentes de los objetivos y el portaobjetos de la muestra y luego vuelva a aplicar el aceite.
- La suciedad o el aceite seco en el lente del objetivo (o en el portaobjeto) de las inspecciones anteriores podrían causar imágenes borrosas no deseadas debidas a la luz dispersa. Limpie el lente con un paño de dedicado a eso.
- El enfoque desigual en el campo de visión o las dificultades para obtener imágenes nítidas puede deberse a la forma en que el portaobjeto está colocado sobre la platina. Compruebe que el portaobjeto esté colocado correctamente.
- Los problemas de enfoque de la muestra pueden deberse a que el cubreobjeto se adhiere al objetivo.

- Utilice el grosor correcto para el cubreobjeto. Los objetivos utilizados en la mayoría de los microscopios biológicos están diseñados para usarse con los cubreobjetos N ° 1.5 (0.17 mm de espesor). Compruebe esto con el proveedor.
- Utilice el aceite de inmersión correcto y evite mezclar aceites con diferentes IR. Por lo general, el aceite de inmersión con un IR de 1.515 puede usarse para todos los objetivos que posean AN mayor que 0.95. Consulte con el proveedor en caso de duda.
- Las burbujas de aire pueden producir sombras o zonas poco claras en el campo visual, pero por lo general pueden superarse elevando el objetivo y volviendo a focalizar o verificando si hay suficiente medio de inmersión. Si la dificultad persiste, retire y limpie el portaobjeto y el objetivo.
- La iluminación insuficiente puede deberse a un ajuste incorrecto del condensador o a una apertura inadecuada del diafragma.

## 7.2.6 Iluminación de campo brillante y de campo oscuro

El principio del microscopio de luz se basa en la reflexión y dispersión de la luz que pasa de la fuente de luz a través de la muestra a los lentes oculares. Las variaciones en el IR de los componentes de la muestra permiten generar imágenes basadas en contrastes, transmisiones y reflexiones.

Al alinear el microscopio para optimizar el brillo y la iluminación de la imagen (consulte la sección sobre la iluminación de Köhler), se obtiene una buena imagen, con alta resolución y un control adecuado del contraste y la profundidad.

La técnica del microscopio de luz más comúnmente utilizada es la de iluminación de campo brillante (CB). Esta técnica es adecuada para observar objetos con alta absorción de la luz natural, como las células vegetales o las células teñidas. Sin embargo, la mayoría de las células bacterianas son pequeñas y aparecen como objetos transparentes en CB, por lo tanto carecen de contrastes suficientes. La tinción puede compensar este bajo contraste, y la mayoría de los protocolos de tinción

microbiológicos comunes (por ejemplo, la tinción Gram, Neisser, etc.) se usan junto con la CB.

La microscopía de contraste de fase (CF) es una técnica de microscopía óptica que convierte los cambios de fase de la luz que pasa a través de una muestra transparente en cambios de brillo en la imagen (aprovecha las pequeñas diferencias de IR de las distintas partes de una célula). La microscopía de CF permite estudiar muestras con bajos contrastes y, por lo tanto, es adecuado para examinar especímenes fijos y células vivas no teñidas. Estos tipos de muestras tienen muy bajas diferencias de absorbancia en comparación con su medio circundante, y dichas diferencias en el índice de refracción no pueden ser detectadas por microscopía de CB. En la microscopía de CF, un anillo en la abertura del condensador genera un cono hueco de cero iluminación que se proyecta sobre el plano focal posterior del objetivo. Un anillo de fase coincidente en el lente del objetivo absorbe la luz no difractada y modifica ligeramente, aumentando la longitud de onda. Este método funciona mejor con especímenes relativamente delgados (<5  $\mu\text{m}$ ). El CF requiere el uso de objetivos particulares y con anillos de fase alineados.

## 7.2.7 Microscopía fluorescente

Algunas moléculas contienen fluorocromos que pueden absorber los fotones de la luz con energías específicas y de esta manera llegar a ser 'excitados'. Este estado de excitación dura aproximadamente  $10^{-7}$  segundos y termina con la emisión de un fotón con una energía ligeramente inferior, y por lo tanto con una longitud de onda mayor. Estos fluorocromos existen como componentes de compuestos naturales que se encuentran frecuentemente en la naturaleza (por ejemplo, pigmentos tales como clorofilas, vitaminas, etc.). Sin embargo, hoy en día se aplican ampliamente nuevos compuestos sintetizados químicamente, con altos coeficientes de extinción para marcar biomoléculas específicas y teñir tejidos y células para su identificación. La diversidad de estos marcadores fluorescentes, tintes y marcadores específicos para biomoléculas, y tintes dinámicos para medir las condiciones químicas (pH,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{O}_2$ , etc.) crece rápidamente día tras día (Tabla 7.2).

**Tabla 7.2** Colorantes usados comúnmente en microscopía de sistemas microbianos complejos.

Tinción	Sinónimo o nombre químico	Objetivo	Estructura química	Excitación/Emisión
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	Colorante de unión para ADN permeable a la célula, con preferencia para ADN enriquecido en adenina y tiamina	$C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$	$\lambda_{ex} \sim 359$ nm, $\lambda_{em} \sim 461$ nm; $\lambda_{ex}$ 340 nm, $\lambda_{em}$ 488 nm (solo DAPI), $\lambda_{ex}$ 364 nm, $\lambda_{em}$ 454 nm (DAPI-DNA-Komplex: 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7)
Ioduro de Propidium	2,7-diamino-9-phenyl-10 (diethylaminopropyl)-phenanthridium iodide methiodide	Tinción fluorescente de ácido nucleico impermeable a la membrana	$C_{27}H_{34}N_4 \cdot 2I$	Excitable a 536 nm y emite a 617 nm (rojo)
Calcofluor	Blanco de calcoflúor	Sensor $Ca^{2+}$ fluorescente; unión fluorocromática, no específica para alginato, celulosa y quitina en las paredes celulares	$C_{40}H_{44}N_{12}O_{10}S_2$	$\lambda_{ex}$ 355 nm, $\lambda_{em}$ 433 nm
Rojo Nilo	9-(diethylamino)-5H-benzo[a]fenoxazin-5-uno	Tinción lipolítica o lipofílica	$C_{20}H_{18}N_2O_2$	$\lambda_{ex}$ 552 nm, $\lambda_{em}$ 636 nm
Azul Nilo	Azul básico 12, Azul Nilo sulfato	Tinción lipolítica con objetivos en las grasas neutras	$C_{20}H_{20}N_3O \cdot 4SO_4$	$\lambda_{ex}$ 630 nm, $\lambda_{em}$ 665 nm
DCFDA	2',7'-diclorofluorescein diacetato	Detección fluorogénica permeable a las células que contienen especies reactivas al oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO)	$C_{24}H_{14}Cl_2O_7$	$\lambda_{ex}$ 504 nm, $\lambda_{em}$ 524 nm
Hoechst 33342	Bisbenzimidida	Tinción fluorescente lipofílica para identificación de ADN; un A/T-ADN específico	$C_{27}H_{28}N_6O \cdot 3HCl$	$\lambda_{ex} < 380$ nm, $\lambda_{em}$ 450-495 nm
Rojo Congo	C.I. Rojo Directo; Rojo Cosmos; Rojo algodón	Colorante amiloidofílico que específicamente tiñe agregados de celulosa	$C_{32}H_{22}N_6O_6S_2 \cdot 2Na$	N/A
Cristal violeta	Violeta Genciana Cloruro de Hexametilpararosanilina	Componente de la tinción de Gram que permite diferenciar entre bacterias gram-positivas y gram-negativas	$C_{25}H_{30}N_3 \cdot Cl$	N/A
Negro Sudán B	Solvente Negro 3; Negro Graso HB	Colorante diazo soluble en grasa usado para tinción de triglicéridos y lípidos neutros	$C_{29}H_{24}N_6$	$\lambda_{ex} \sim 596-605$ nm, tinción azul-negro
Rojo Neutro	Rojo Básico 5; Rojo de Toluileno	Colorante vital usado como indicador y para tinción biológica	$C_{15}H_{17}N_4 \cdot Cl$	N/A
BCECF-AM	Spiro(isobensofuran-1(3H), 9'-(9H)xanten)-2',7'-ácido propiónico	Indicador fluorescente para membrana permeables para medir pH citoplasmático	Mezcla de $C_{30}H_{20}O_{11}$ , $C_{35}H_{28}O_{15}$ y $C_{40}H_{36}O_{19}$	$\lambda_{ex}$ 505 nm, $\lambda_{em}$ 520 nm
Naranja Acridina	3,6-Bis(dimetilamino)acridina	Colorante ácido nucleico fluorescente de unión, que interactúa con el ADN y el RNA	$C_{17}H_{19}N_3$	Cuando se une al ADN emite fluorescencia verde ( $E_m = 525$ nm) y con el ARN, la emite roja ( $E_m = \sim 650$ nm).
Faloidin-TRITC	Faloidin-tetrametil rodamina B isotiocianato	Tinción fluorescente para identificar actina filamentosa	$C_{62}H_{72}N_{12}O_{12}S_4$	$\lambda_{ex}$ 540-545 nm, $\lambda_{em}$ 570-573 nm
Bisbenzimidida	Hoechst 33342 trihidrocloruro	A/T-ADN específico ampliamente usado para observar ADN celular	$C_{27}H_{28}N_6O \cdot 3HCl$	$\lambda_{ex}$ 350 nm, $\lambda_{em}$ 461 nm
Fluoresceína isotiocianato	FITC; Fluoresceína 5-isotiocianato	Sustancia amino-reactiva la identificación en nucleótidos y proteínas	$C_{21}H_{11}NO_5S$	$\lambda_{ex}$ 492 nm, $\lambda_{em}$ 518 nm

Rodamina B isotiocianato	RBITC	Sensor fluorescente para identificación de nucleótidos y proteínas	$C_{29}H_{30}ClN_3O_3S$	$\lambda_{ex}$ 543 nm, $\lambda_{em}$ 580 nm
Sudán IV	Rojo Escarlata	Tinción de triglicéridos, lípidos y lipoproteínas	$C_{24}H_{20}N_4O$	N/A
Safranina	Rojo Básico 2	Tinción de bacterias Gram negativas	$C_{20}H_{19}ClN_4$	N/A
1,3,6,8-Ácido pirenetetrasulfónico sal tetrasódica	Pirenetetrasulfonato tetrasódico 1,3,6,8-; HPTS	Sensor fluorescente e indicador de pH	$C_{16}H_6O_{12}S_4 \cdot 4Na$	$\lambda_{ex}$ 454 nm, $\lambda_{em}$ 511 nm
5-Ciano-2,3-di-(p-tolil) cloruro de tetrasolium	CTC	Tinción vital	$C_{16}H_{14}ClN_5$	$\lambda_{ex}$ 490 nm, $\lambda_{em}$ 630 nm

Las moléculas fluorescentes tienen longitudes de onda de absorción y emisión muy específicas (alta especificidad) y siguen la ley Lambert-Beer, haciéndolas adecuadas para la determinación cuantitativa bajo una amplia gama de condiciones fisiológicas y físicas. La aplicación de una fuente de luz y el uso de filtros apropiados para discriminar entre la excitación de longitudes de onda más corta y la emisión de luz de longitud de onda más larga, proporciona condiciones altamente selectivas para visualizar con bajas interferencias una molécula fluorescente individual. La mayoría de los microscopios de fluorescencia están equipados con epi-iluminación/excitación e incorporan espejos dicróicos específicos o divisores cromáticos de radiación luminosa. Esto último permite una separación de la luz de emisión fluorescente deseada de cualquier otra luz de la excitación reflejada que no sea absorbida y de la transmisión de luz no originada por el fluorocromo aplicado. La microscopía de fluorescencia se puede combinar fácilmente con otras técnicas microscópicas incluyendo la microscopía de contraste de fase.

La alineación del microscopio (iluminación de Köhler) es el paso más crítico en todos los microscopios ópticos para obtener una óptima resolución. Se recomiendan los siguientes pasos:

- Centrar y enfocar la fuente de luz. Esto puede llevarse a cabo retirando el difusor de luz (si es aplicable) y luego, sin el condensador, proyectar la luz sobre un trozo de papel colocado en el soporte del condensador. Ajuste el área circular de tal manera que la imagen de la fuente de luz cubra dicha área.
- Ajustar el iris del diafragma situado más cerca de la fuente de luz (diafragma del campo) hasta que se aprecien los bordes afilados.

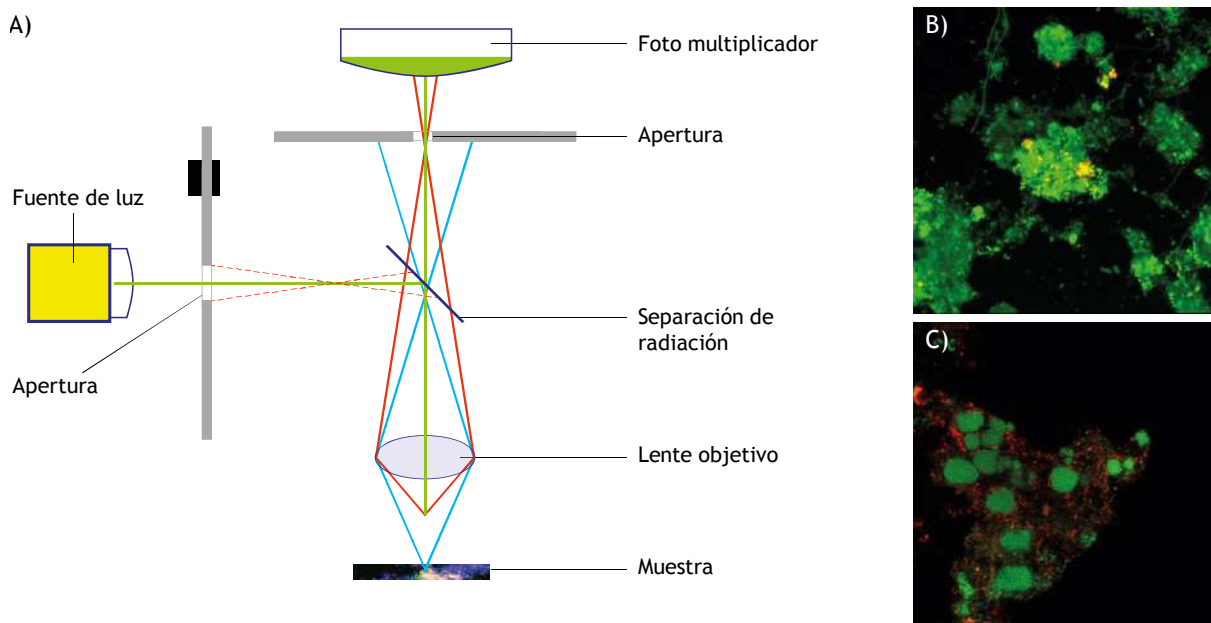
- Enfocar ajustando el tornillo de enfoque del condensador. Tanto la muestra como el diafragma del iris deben estar enfocados.
- Centrar la imagen del iris de campo utilizando las perillas o tornillos para centrar el condensador (normalmente situados en el condensador).
- Abrir el iris de campo de modo que los bordes queden justo más allá del campo de visión.
- Optimizar el contraste de la imagen, dependiendo de la muestra, ajustando el iris del diafragma del condensador. No utilizar esta abertura para controlar la intensidad de la luz.
- Ajustar la intensidad de la luz con el reóstato del iluminador o mediante la inserción de filtros de densidad neutra (para fotografía en color).

En un microscopio Köhler iluminado el contraste de la muestra se obtiene ajustando el diafragma del condensador. La intensidad de iluminación se varía ajustando el voltaje de la fuente de luz o mediante filtros de densidad neutra delante del iluminador.

## 7.2.8 Microscopía confocal de escaneo láser

La microscopía confocal de escaneo o barrido láser (CLSM por sus siglas en inglés) es ampliamente utilizada por su calidad superior de imagen. Esta calidad proviene del intercambio de la fuente de luz utilizada en la microscopía epifluorescente con el láser que tiene altas intensidades por área. Esto permite aplicar y usar aperturas pequeñas o específicas que usualmente no es posible alcanzar con otras tecnologías porque la luz generada por la pérdida del enfoque impide que la información alcance los fotomultiplicadores (Figura 7.3). Esto proporciona la base para imágenes menos borrosas y, además, permite el seccionamiento óptico, pero

requiere utilizar un equipo especializado para CLSM lo cual también requiere de operadores calificados.



**Figura 7.3** (A) Principio del microscopio confocal de escaneo láser. Imágenes (B) y (C) Ilustran la misma muestra después de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) visto mediante microscopía epifluorescente, y mediante microscopio confocal de escaneo láser, respectivamente. (Imágenes: J.L. Nielsen).

## 7.3 INVESTIGACIONES MORFOLÓGICAS

En los sistemas de lodos activados, la mayoría de las bacterias responsables de la eliminación de contaminantes (por ejemplo, de C, N y P) crecen en forma de flóculos que facilitan la sedimentación y la separación del efluente tratado. Este proceso de formación de flóculos es el resultado de la adición de componentes al aguas residuales y de una excreción activa de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) por "bacterias formadoras de flóculos". Los flóculos consisten en bacterias a menudo agrupadas en microcolonias, partículas orgánicas e inorgánicas, y bacterias filamentosas que proporcionan el núcleo o la columna vertebral de la matriz del flóculo, alrededor del cual se agregan los microorganismos.

Las propiedades de sedimentación y compactación del lodo activado están directamente relacionadas con el tamaño y la estructura de los flóculos, y reflejan sus componentes químicos, físicos y biológicos. La

presencia y abundancia de bacterias filamentosas son especialmente importantes para obtener o no, buenas propiedades de sedimentación. El desequilibrio entre las bacterias formadoras de flóculos y las filamentosas puede conducir tanto al abultamiento de los lodos (donde los filamentos se extienden desde la superficie del flóculo y forman puentes inter-floculares) como al crecimiento disperso (en donde los flóculos son pequeños debido a una baja presencia de bacterias formadoras de flóculos). El abultamiento filamentoso también puede resultar de la formación de flóculos grandes, irregulares y de estructura más abierta. Las cantidades excesivas de (ciertas) bacterias formadoras de flóculo ocasionan de vez en cuando una sobreproducción de SPE hidrófobas, lo que puede dar lugar a la formación de flóculos débiles y flotantes (como los causados por organismos del denominado agrupamiento zoogloal o de zoogreas) (Eikelboom, 2000; Jenkins *et al.*, 2004).

Los exámenes morfológicos por sí solos o en combinación con análisis químicos (SPE, iones, etc.) y mediciones físicas (propiedades de sedimentación, compactación, etc.) del lodo pueden revelar información importante de la operación y mantenimiento de la PTAR.



Se recomienda combinar la información obtenida del examen microscópico con la observación directa de la planta. Dicha información puede consistir en, por ejemplo, el color del licor mezclado, el porcentaje de la superficie del tanque de aireación cubierta por espuma, la profundidad de la capa de lodo en el clarificador secundario, el tipo de material flotante ubicado en la superficie del clarificador (efervescente con burbujas o grasiento y pegajoso, etc).

La caracterización microscópica general de los flóculos incluye la descripción de su tamaño, forma y estructura general, la presencia de fibras orgánicas y partículas inorgánicas, o células aisladas, y el reconocimiento de diferentes morfotipos de bacterias filamentosas y su cantidad. Más detalles sobre la caracterización microscópica del lodo activado pueden encontrarse en los manuales de Eikelboom (2000), Jenkins *et al.* (2004) y Seviour y Nielsen (2010).

### 7.3.1 Identificación microscópica de organismos filamentosos

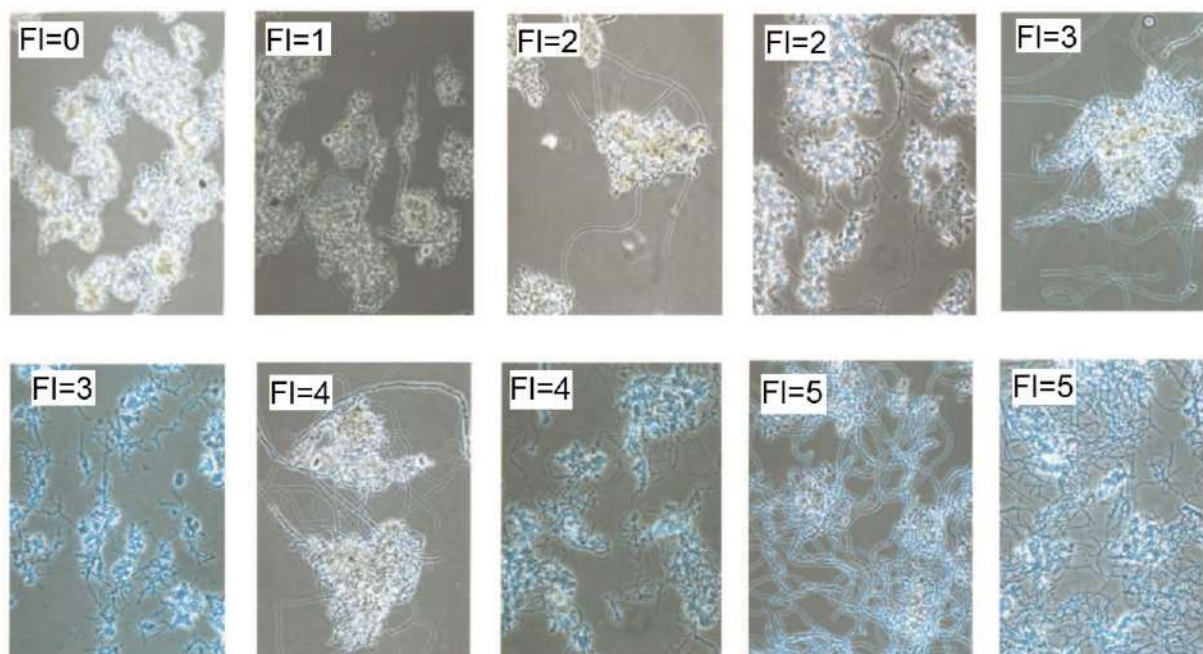
Para una identificación inequívoca y precisa de las bacterias filamentosas se considera importante encontrar medidas adecuadas para controlar el abultamiento de los lodos (Nielsen *et al.*, 2009; Seviour y Nielsen, 2010). Esta identificación precisa requiere la aplicación de herramientas moleculares incluyendo FISH y la secuenciación de 16S ARNr (véase el capítulo 8). En lodos activados unos pocos morfotipos filamentosos se pueden caracterizar y hasta cierto punto identificar tentativamente, utilizando los manuales de Eikelboom (2000) y Jenkins *et al.* (2004). Sin embargo, hoy en día está claro que la mayoría de los microorganismos filamentosos no se pueden caracterizar adecuadamente de esta manera. Por lo tanto, la recomendación es utilizar la microscopía asociándola con métodos moleculares para permitir la identificación *in situ* de éstas y otras bacterias, y restringir los estudios morfológicos a caracterizaciones preliminares y, hasta donde sea apropiado, solo para confirmar los datos obtenidos con las técnicas moleculares. Dado que existe una larga

tradicción de caracterización morfológica microscópica y de "identificación" de bacterias filamentosas en lodos activados, especialmente por parte de la industria, estos métodos se describen en el presente capítulo dado que este enfoque sigue siendo ampliamente utilizado.

La caracterización de las bacterias filamentosas se basa en el análisis de sus particularidades morfológicas, sus reacciones a la tinción de Gram y Neisser, y rasgos fisiológicos, tales como la acumulación de gránulos elementales de azufre intracelulares. En el manual de Eikelboom (2000) se describen algunas características particulares para distinguir las diversas especies de organismos filamentosos:

- Forma y longitud de los filamentos.
- Forma de las células.
- Diámetro del filamento.
- Motilidad-deslizamiento.
- Crecimiento asociado de otras bacterias
- Ramificación.
- Septos entre celdas adyacentes (visible o no visible).
- Presencia de vaina.
- Gránulos de compuestos internos almacenados (especialmente gránulos de azufre).
- Tinción de Gram.
- Tinción Neisser.

La microscopía se ha utilizado para estimar la abundancia de bacterias filamentosas en lodos activados y su influencia inmediata en las propiedades de sedimentación. El llamado Índice de Filamentos (IF, ó FI por sus siglas en inglés, *Filamentous Index*) es una medida semi-cuantitativa eficiente para clasificar en niveles. La escala varía de 0 (filamentos ausentes) a 5 (número excesivo de filamentos) (Figura 7.4). Esta evaluación es sencilla de realizar con microscopios de contraste de fase de baja amplificación (10x) y se considera confiable. Eikelboom (2000) recomienda realizar dicha cuantificación regularmente (cada 1-2 semanas) o cuando se observan cambios en las propiedades de la sedimentación del lodo.



**Figura 7.4** Ejemplo de muestras de flóculos de lodos activados con diferentes índices filamentosos (IF) (fotos: Eikelboom, 2000 por cortesía de IWA Publishing).

### 7.3.2 Identificación de protozoos y metazoos

La comunidad microbiana en los lodos activados está constituida, además de por procariontes, por protozoos y metazoos bacteriófagos y carnívoros. Estos son importantes para la ecología de los sistemas, dan forma a las comunidades de lodos y contribuyen a mejorar la calidad del efluente final. Así, son ampliamente utilizados para dar seguimiento al rendimiento de la PTAR. Su importancia ecológica proviene de que se alimentan de bacterias asociadas a flóculos y bacterias aisladas suspendidas, y por lo tanto reducen la turbidez de la fase líquida del efluente final. Los protozoos se pueden dividir en flagelados, amebas, ciliados libres y ciliados unidos, mientras que los metazoos incluyen rotíferos, nemátodos y cierto tipo de gusanos. La descripción de la fauna de protozoos y metazoos puede proporcionar información relacionada con las posibles causas de una mala operación de la planta y, a menudo, se correlaciona con sus parámetros físico-químicos. La Tabla 7.3 muestra algunas generalizaciones comúnmente utilizadas para predecir el rendimiento de la PTAR y la calidad del efluente. Estas generalizaciones deben utilizarse con cautela (Seviour y Nielsen, 2010). Se

pueden llevar a cabo exámenes periódicos sobre la presencia de protozoos para obtener información sobre la baja carga o sobrecarga de la planta, si hay suficiente aireación, tiempo de retención de lodos adecuado, etc.

Si se aplica una mayor resolución taxonómica, es posible encontrar bioindicadores más específicos para dar seguimiento al rendimiento de la PTAR. Sin embargo, es una tarea ardua que requiere un alto grado de experiencia. Además, aún no está claro cuán importante son algunos de estos protozoos como indicadores del rendimiento de la planta de tratamiento de aguas residuales. Estudios recientes han aplicado FISH para identificar protozoos (Xia *et al.*, 2014), pero debido a las dificultades prácticas, sólo se ha publicado hasta ahora un número pequeño de sondas de detección de estos organismos. Especies de protozoos tales como *Vorticella picta* han sido utilizadas como indicadores de una baja carga orgánica de lodos, mientras que la *Vorticella microstoma* y la *Opercularia coarctata* son indicadores de una alta carga orgánica (Madoni, 1994). Otros estudios han propuesto que la presencia de *Acineta tuberosa*, *Zoothamnium* y *Euplotes sp.* sea usada como indicador de una alta calidad de los efluentes y, por lo tanto, de un buen funcionamiento de las plantas (Salvado *et al.*, 1995).

**Tabla 7.3** Generalizaciones de la presencia y abundancia de protozoos y metazoos para la evaluación del comportamiento de una planta de lodos activados.

Microorganismo	Características	Ejemplos	Indicios de abundancia	Manifestación en plantas de tratamiento de aguas residuales
Flagelados	Se han encontrado un alto número de ellos durante la recuperación, posteriormente a la descarga de tóxicos o baja concentración de OD	-	Alta carga orgánica	Desempeño pobre
Amebas	Alto durante la puesta en marcha y recuperación	-	Alta carga orgánica	Operación inestable
Ciliados libre-nadadores	Presentes en buenas condiciones de formación de flóculos	Euplotes, Aspidisca	Alta carga orgánica	Buenas condiciones de operación
Ciliados flagelados	En bajas concentraciones de OD o toxicidad, pierden sus flagelos	Vorticela	Baja carga orgánica	Buenas condiciones de operación
Ciliados de rastreo	-	-	-	Buenos desempeño
Rotíferos	Requieren alta concentración de OD	Euchlanis	Baja carga orgánica	Buenas condiciones de operación y estabilidad
Alta cantidad de invertebrados	-	Nemátodos, Tardígrados, Anélidos	Baja carga orgánica	Alta carga de amonio. Los tardígrados y anélidos son susceptibles a la toxicidad al amonio.

## 7.4 EXAMEN MICROSCÓPICO DE MUESTRAS DE LODO ACTIVADO

### 7.4.1 Montaje de la muestra de lodo activado

Para el examen de microscopía de luz se utilizan dos aproximaciones: i) soportes húmedos adecuados para examinar las características de los lodos, tales como la estructura de los flóculos, la morfología del filamento, la identificación de los protozoos y los metazoos, y ii) los frotis fijos para las preparaciones teñidas.

Se prepara un soporte húmedo añadiendo una gota (aproximadamente de 1 cm de diámetro) de lodo activado fresco sobre un portaobjetos de vidrio y luego colocando suavemente un cubreobjetos sobre la parte superior de la gota. Si la gota es demasiado grande, entonces podría ser más difícil concentrarse en la muestra, de otro modo el cubreobjetos flotará y la muestra se filtrará a su alrededor con el riesgo de que contamine el microscopio. Si es demasiado pequeño,

la muestra contendrá burbujas de aire que interfieren y se secará prematuramente. El sellado de los bordes con esmalte de uñas o vaselina a lo largo de la cubierta reducirá estos problemas. Después de ello, la preparación ya estará lista para el análisis microscópico.

Un frotis fijo inmoviliza la biomasa sobre el portaobjetos, pero puede reducir el contraste de la muestra. La muestra es ligeramente teñida sobre el portaobjetos y luego se puede esparcir fácilmente usando una pipeta. El frotis se deja secar al aire a temperatura ambiente. Para las muestras de lodos activados normalmente no es necesario la fijación mediante calor pasando la preparación a través de una llama, corriendo el riesgo de dañar la muestra.

Debido a la grasa remanente usada en algún proceso de preparación anterior, las superficies de los portaobjetos pueden presentar características hidrófobas, creando frecuentemente problemas ya que pueden hacer que el frotis se seque de manera irregular. Por lo tanto, los portaobjetos deben ser

desengrasados cuidadosamente antes de su uso. Se recomienda el lavado ácido de los portaobjetos y cubrirlos con gelatina o poli-L-lisina. Los portaobjetos lavados con ácido se preparan dejándolos en una solución de HCl 1 M (60 ° C) precalentados durante una noche y luego enjuagándolos primero en agua destilada seguido de una solución de etanol al 95% antes de secar. Para mejorar la adhesión de la muestra, sumerja los portaobjetos en una solución de gelatina al 0.5% (peso/volumen, p/v) durante 5 min a 70 °C. Alternativamente, los portaobjetos lavados con ácido se pueden sumergir en una solución de poli L-lisina al 0.01% durante 5 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se secan al aire en posición vertical en un ambiente libre de polvo. La fijación de la muestra a portaobjetos revestidos de gelatina o poli-L-lisina a una temperatura más alta (40-60 °C) mejora su adherencia.

La deposición inmediata de la muestra de lodo activado sobre el portaobjetos normalmente mantendrá la estructura espacial de los flóculos. Sin embargo, una homogenización suave de los flóculos antes de la inmovilización de la muestra ayuda frecuentemente a los protocolos de tinción para visualizar las estructuras celulares de interés. Esto puede conseguirse frotando suavemente dos portaobjetos con una muestra de 20 µL entre sí.

El procedimiento de criosección puede revelar una alta resolución de la muestra observada manteniendo intacta su organización espacial. Este procedimiento implica incrustar la muestra en parafina o una resina polimerizante (por ejemplo, Tissue-Tek O.C.T.). La incrustación en parafina generalmente garantiza segmentos de tejido sin dañar, pero requiere el calentamiento de la muestra y la eliminación de la cera con xileno, mientras que la aplicación de la resina de polimerización en frío se realiza a temperatura ambiente y no requiere tratamiento químico adicional.

Un procedimiento de criosección simple implica mezclar la muestra de lodo activado (o biopelícula) y el material de inclusión (Tissue-Tek O.C.T.) en la tapa de un tubo Eppendorf. Después de permitir que el material de incrustación migre a la muestra durante toda la noche a 4°C, se transfiere a nitrógeno líquido. El secado en láminas finas de 5-20 µm se lleva a cabo

a -20°C. Las rodajas deben colocarse inmediatamente sobre un portaobjetos (a temperatura ambiente), donde se funden y se dejan secar durante 3 horas. Posteriormente, se puede hacer una tinción adicional de la muestra.

## 7.4.2 Tinción de Gram

La tinción de Gram es una tinción para distinguir entre dos grupos bacterianos principales, Gram-positivos (coloración púrpura) y Gram-negativos (coloración roja) (Figura 7.5).

Esta técnica de tinción refleja diferencias básicas de la composición y organización de la pared celular. Las paredes de células Gram-positivas contienen altos niveles de peptidoglucano (mureína), que se contrae en presencia del de-colorante (etanol al 70%), reteniendo la mezcla compleja de cristal violeta/yodo. En bacterias Gram-negativas, las capas de peptidoglucano están presentes, pero en cantidades mucho más bajas. Además, las células Gram-negativas tienen una membrana de lipopolisacárido situada fuera del peptidoglucano. En presencia del colorante, esta membrana se rompe y las células se vuelven permeables, permitiendo que la solución del complejo de cristal violeta/yodo se elimine. A continuación, se aplica una solución de contra coloración adecuada a las células (safranina), y por tanto se tiñen de rojo.

### 7.4.2.1 Reactivos y soluciones para la tinción de Gram

- Solución de cristal violeta**  
 Solución estándar de cristal violeta (solución A):  
 Disolver 20 g de cristal violeta (85% de colorante) en 100 ml de etanol al 95%. Filtrar la muestra.  
 Solución estándar de oxalato (solución B):  
 Disolver 1 g de oxalato de amonio en 100 mL de agua.  
 Solución de trabajo: Diluir la solución A (1:10) en la solución B. La solución de trabajo se puede almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente hasta por un año.
- Solución de yodo de Gram**  
 Disuelva 1 g de cristal de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 5 mL de agua. Añada entonces 240 mL de agua destilada y 60 mL de solución de bicarbonato de sodio al 5 % (p/v). Mezclar bien. La solución se



puede almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente hasta por un año.

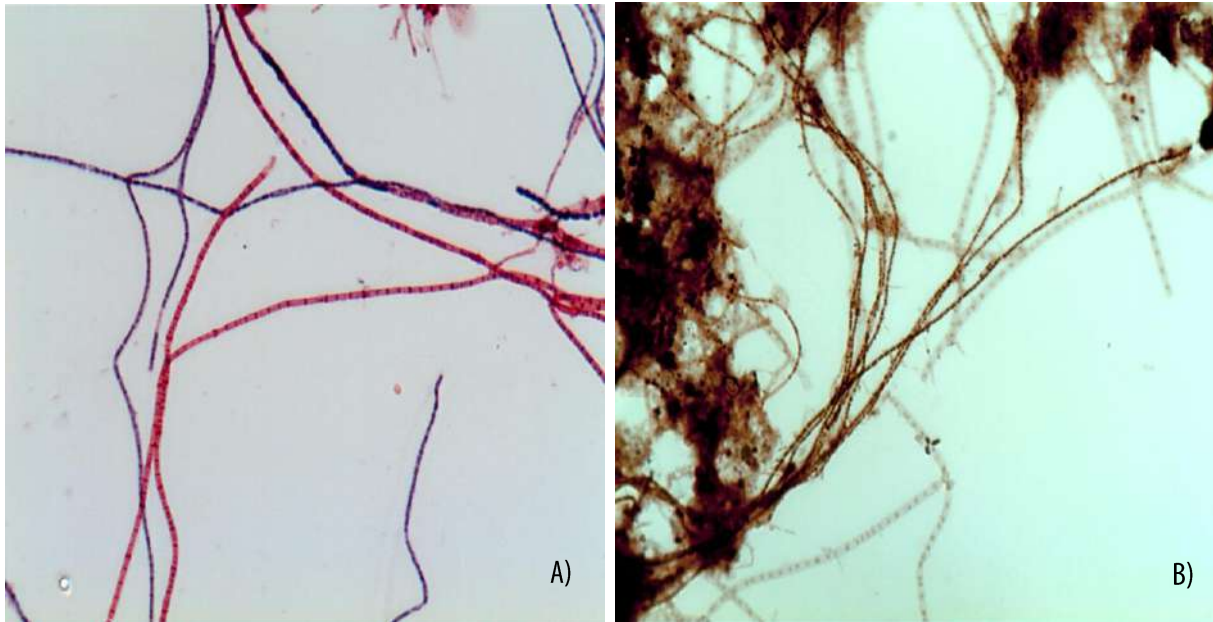
- **Contratinción**

Mezclar 2.5 g de Safranin O con 100 mL de etanol al 95%. Se puede almacenar hasta 1 año a temperatura ambiente.

- **Solución decolorante**

Mezclar iguales volúmenes de etanol al 95 % etanol y acetona. Se puede almacenar hasta 1 año a temperatura ambiente.

Los kits comerciales de tinción de Gram ya listos para usar están disponibles por diversos fabricantes.



**Figura 7.5** Ejemplos típicos de tinción de Gram (A) y Neisser (B) de una muestra de lodo activado (foto: B. McIlroy).

#### 7.4.2.2 Procedimientos

- Preparar un frotis fijo, con la intención de lograr una monocapa de células como se describió anteriormente.
- Añadir la solución de cristal violeta a la muestra y dejar reposar durante 30 segundos.
- Lavar suavemente la preparación con agua corriente del grifo durante aproximadamente 5 segundos. Sacuda el exceso de agua.
- Mojar el frotis con solución de yodo de Gram durante 1 min.
- Lavar suavemente la preparación con agua corriente del grifo durante aproximadamente 5 segundos. Sacuda el exceso de agua.
- Decolorar con solución decolorante, dejando caer lentamente la solución por encima del frotis en el portaobjetos ligeramente inclinado. Esto debería permitir que la solución decolorante fluya lentamente a través del frotis. Continúe hasta que no eluda más color púrpura del frotis (la decoloración excesiva decolorará las células Gram-positivas, y una decoloración muy moderada puede dar falsas células Gram positivas, también se pueden observar señales falsas de tinción de Gram, en muestras almacenadas y muertas, que son casos en los que las células positivas manchan como Gram negativas).
- Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente durante aproximadamente 5 segundos. Sacudir el exceso de agua.
- Cubrir la preparación con la solución de contratinción (Safranin) durante 30 segundos.
- Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente durante aproximadamente 5 segundos. Sacudir el exceso de agua.
- Deje que la lámina se seque al aire, o bien con papel de filtro.



Un frotis bien preparado debe ser apenas visible a simple vista. Examine la preparación mediante la adición de una gota de aceite de inmersión en el centro, y examine con un objetivo de campo brillante 100. No utilice cubreobjetos. Una preparación teñida de Gram se puede almacenar indefinidamente a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células Gram-positivas adquieren un color púrpura y las Gram-negativas un color rojo. El color puede variar de azul a casi negro. Un filtro azul realzará el contraste. Algunas células pueden aparecer como intermedios o teñidas de manera desigual, y se denominan como Gram variable.

Si existen flóculos grandes y frotis demasiado densos, la muestra se puede diluir u homogeneizar para mejorar su visibilidad en el microscopio. El yoduro de hexidio (HI) es un colorante fluorescente que al unirse y reaccionar con las células permite determinar el estado Gram de un cultivo por su absorción diferencial a través de las paredes celulares bacterianas (Haugland, 1999).

### 7.4.3 Tinción Neisser

La tinción de Neisser es útil para detectar la presencia de gránulos metacromáticos, los llamados cuerpos polares de Babes-Ernst, en células bacterianas (Figura 7.5). Bajo un pH definido, tanto el azul de metileno como el cristal violeta se unirán a estos cuerpos polares (cuerpos de volutín incluyendo el poli-P), pero no al resto de la célula bacteriana. Los cuerpos polares se hacen visibles como puntos oscuros. La tinción de Neisser se basa en la unión del colorante a alto pH a materiales cargados negativamente en las paredes celulares o gránulos. Es útil para detectar filamentos profundamente localizados dentro del flóculo y para la tinción de bacterias acumuladoras de fósforo (PAOs) responsables de la eliminación biológica mejorada de fósforo (EBPR).

#### 7.4.3.1 Reactivos y soluciones para la tinción Neisser

- **Solución de azul de metileno**  
Filtre la muestra. Disolver 0.1 g de azul de metileno en 100 mL de agua destilada. Añada 5 mL de etanol al 96% y 5 mL de ácido acético glacial.
- **Solución de cristal violeta**  
Disolver 0.33 g de cristal violeta en 100 mL de agua destilada y 3.3 mL de etanol al 96 %. Filtre la muestra.

- **Solución contra-tinción**

Mezclar 33.3 mL de solución de crisoidina al 1% con 100 mL de agua destilada. Alternativamente, utilice 0.2% de solución Bismark marrón.

- **Solución de trabajo**

Preparar una mezcla fresca que contenga dos partes de solución de azul de metileno y una parte de solución de cristal violeta.

También, varios proveedores venden kits comerciales de tinción Neisser listos para usar.

#### 7.4.3.2 Procedimiento

- Preparar un frotis fijo como se describió anteriormente.
- Mojar la muestra con la solución de trabajo recién preparada y dejar reposar durante 15 s.
- Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y asegurar que los dos lados de la preparación se enjuaguen.
- Mojar el frotis con la solución contra tinción y dejar durante 1 minuto.
- Enjuagar suavemente la preparación con agua corriente y asegurar que los dos lados de la preparación se enjuaguen.
- Dejar que el portaobjetos se seque o utilice papel de filtro.
- Examinar bajo el microscopio con inmersión de aceite utilizando un objetivo de campo brillante de alto aumento, iluminación directa y sin cubreobjetos.

Un frotis bien preparado debe ser apenas visible a simple vista. Una preparación teñida con Neisser se puede mantener guardada a temperatura ambiente en la oscuridad indefinidamente. Las células Neisser-positivas aparecen en color azul/gris o púrpura mientras las Neisser-negativas aparecen en tonos amarillo/marrón. Frecuentemente, los recubrimientos exocelulares y el material capsular de polisacárido también se tiñen. Las células Neisser negativas tienen poco contraste y pueden ser difíciles de apreciar.

#### 7.4.4 Tinción DAPI

La tinción con ácido nucleico DAPI tiñe preferentemente el ADN de doble cadena, emitiendo una luz azul fluorescente. Su afinidad parece estar asociada con

rácimos ricos en adenina y tiamina (AT). La solución DAPI se une especialmente al surco menor de la doble hélice de ADN, donde se incrementa la fluorescencia natural debido al desplazamiento de moléculas de agua tanto de DAPI como de las de ADN de menor ranura (Trotta y Paci, 1998). La molécula DAPI también se une al ARN, aunque en un modo de unión diferente que podría implicar una intercalación selectiva (Tanious *et al.*, 1992). Se ha informado que otras moléculas adsorben la solución DAPI, incluyendo los poli-fosfatos (poli-P), donde el complejo emite una luz de una longitud de onda en el intervalo amarillo. La especificidad de la tinción DAPI depende del protocolo y de la concentración utilizada. Las células que contienen poli-P en concentraciones superiores a  $400 \mu\text{mol g}^{-1}$  de peso seco se pueden visualizar cuando se aplica DAPI a una concentración de al menos 5 a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A concentraciones mayores, la tinción DAPI también se une y fluoresce con otros constituyentes celulares tales como los lípidos. A concentraciones más bajas, la fluorescencia azul resultante se relaciona principalmente con su unión al ADN. Se usan frecuentemente dos formas de colorante, el di-hidrocloruro de DAPI y el di-lactato de DAPI, más soluble en agua. El DAPI fue sintetizado por primera vez en 1971.

#### 7.4.4.1 Reactivos y soluciones para la tinción DAPI

- **Soluciones estándar DAPI**

Preparar una disolución patrón de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  DAPI disolviéndola en agua destilada ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) o dimetilformamida (DMF). El dihidrocloruro de DAPI puede tomar algún tiempo para disolverse completamente. Otros disolventes (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato de PBS) son problemáticos debido a dificultades de solubilidad. Para el almacenamiento a largo plazo, la solución madre DAPI puede ser dividida en alícuotas y almacenada a  $-20^\circ \text{C}$ . Para almacenamientos a corto plazo, puede mantenerse a  $4^\circ \text{C}$ , si se protege de la exposición directa a la luz.

#### 7.4.4.2 Procedimiento

La contra-tinción por DAPI se puede realizar directamente con muestras líquidas o muestras de frotis fijo como se describió anteriormente.

- a. **Para muestras en suspensión:** mezclar la solución patrón de DAPI a una concentración final de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  directamente en un pequeño volumen de la muestra. Dejar que el colorante migre a la muestra y

se una a ella a temperatura ambiente durante 5 a 30 minutos (dependiendo de la naturaleza de la muestra). Protegerlo de la exposición directa a la luz. Eliminar el exceso de colorante por centrifugación y enjuagar la muestra con agua estéril hasta que se minimice cualquier fluorescencia de fondo.

- b. **Para muestras inmovilizadas:** Cubrir la muestra a teñir con una solución de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DAPI. Permita que migre a la muestra y que reaccione a temperatura ambiente durante 5 a 30 min, dependiendo de la naturaleza de la muestra. Manténgalo protegido de la exposición directa a la luz. Elimine cualquier exceso de DAPI por centrifugación y enjuague con abundante agua estéril hasta que la fluorescencia de fondo sea mínima. Inmovilizar la muestra suspendida como se describe para muestras de frotis. Deje que se seque al aire. Un teñido con DAPI se puede almacenar a  $-20^\circ \text{C}$  por tiempo indefinido. Aplique directamente la muestra una gota de agente que intensifique la imagen (como Citifluor, Vectashield o una mezcla de los mismos). Cubrir con un cubreobjetos y examinarlo bajo microscopía de epifluorescencia. El máximo de excitación para DAPI unido al ADN es de 358 nm, y el máximo de emisión es de 461 nm.

#### 7.4.5 Tinción CTC

El cloruro de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazolio (CTC) es un colorante redox que produce cristales de formazán fluorescente (CTF) en entornos reducidos, como en células activas que respiran con transporte de electrones activos. El formazán se deposita intracelularmente en forma de cristales grandes y por lo tanto se puede usar como un indicador celular redox. Aunque se ha descrito como un indicador no específico, sigue siendo valioso como indicador rápido de la actividad filamentosa en muestras de lodos activados. Una ventaja de la tinción de actividad de CTC es que normalmente no requiere ninguna etapa de lavado, ya que el CTC no reducido no absorbe luz por encima de 400 nm.

#### 7.4.5.1 Reactivos y soluciones para la tinción CTC

- 1 % (v/v) de solución acuosa de CTC.

#### 7.4.5.2 Procedimiento

- a. 200  $\mu\text{L}$  de 50 mM son añadidos a un tubo de ensayos que contenga 2 mL de la muestra de lodo. Deje que

la muestra repose durante 1-4 horas a temperatura ambiente con agitación moderada.

- b. Las células teñidas se pueden apreciar a través de un filtro negro de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  o simplemente añadiendo una pequeña gota sobre un portaobjeto y dejar que se seque al aire.
- c. Los filtros se secan al aire y se montan con aceite de inmersión en los portaobjetos de vidrio. Examinar a través del microscopio utilizando una excitación de 450 nm y una emisión de alrededor de 630 nm.
- d. Las células que contienen formazán son relativamente foto-estables y pueden almacenarse a 4°C durante varios días si es necesario.

## 7.5 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *in situ*

La hibridación con oligonucleótidos de ADN marcados fluorescentemente ha permitido la visualización de células microbianas individuales en entornos complejos y su identificación *in situ*. Esta técnica puede proporcionar información importante para la enumeración cuantitativa de grupos microbianos de interés y su distribución espacial dentro de la muestra. No discrimina entre células que pueden o no ser cultivadas todavía.

La técnica de FISH, descrita en detalle en otras publicaciones (Nielsen, 2009), se basa en el principio de hibridación con sondas marcadas con fluorocromos del ADN para identificar sitios de ribosomas ARNr en células de interés impermeabilizadas (Figura 7.6).

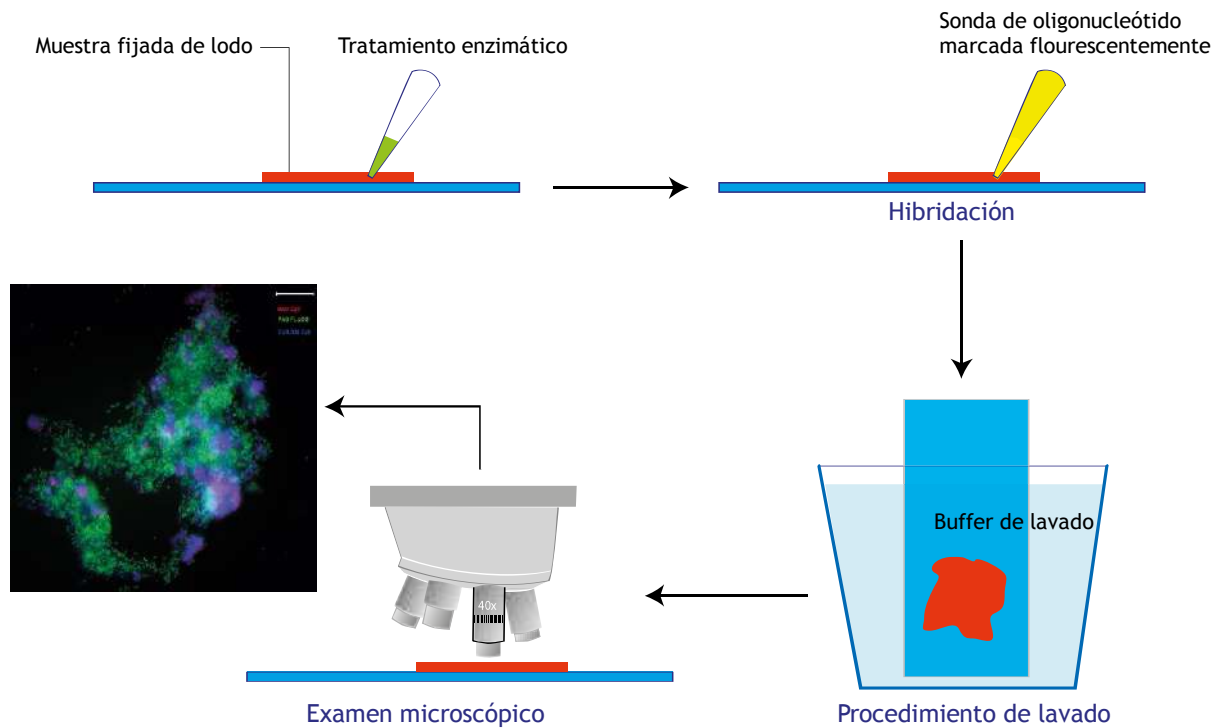
Las sondas moleculares contienen pequeños fragmentos de ADN preparados para ser hibridados de manera específica con sus secuencias complementarias en la estructura del ARNr de las células objetivo metabólicamente activas. Un aspecto poderoso de la técnica de FISH es que puede diseñarse y aplicarse para identificar un grupo filogenético específico (hasta el nivel de especie) o para identificar a miembros de un filo bacteriano completo o cualquier otro grupo jerárquico filogenético superior. Al aplicar la técnica, sólo las células que tienen la secuencia objetivo apropiada en su molécula de ARNr 16S se hibridarán con la sonda de ADN utilizada, y debido a que una célula individual contiene múltiples ribosomas, se genera una señal de fluorescencia suficiente para permitir su detección microscópica.

A pesar de que el método puede aplicarse ampliamente en la microbiología, se han reconocido algunas limitaciones de FISH. Aunque el lodo activado se caracteriza generalmente por un alto nivel de actividad metabólica que resulta en altos recuentos ribosómicos celulares y altas señales de fluorescencia, algunas células pueden emitir niveles detectables de fluorescencia, por varias razones. Estas señales de baja emisión podrían compensarse parcialmente utilizando fluorocromos con mayores coeficientes de extinción, enzimas que amplifican intensidades de señal (CARD-FISH, véase protocolos detallados en Pernthaler y Pernthaler, 2007), o utilizando múltiples sondas marcadas (DOPE-FISH, Stoecker *et al.*, 2010).

En ocasiones, la técnica de FISH puede tener limitaciones debido a que las sondas de FISH no pueden penetrar por completo la muestra a través de la pared/membrana y a la célula objetivo, produciendo resultados negativos o falsos. Esto se observa a menudo en ciertos cultivos, con el organismo *Mycolata*, el cual tiende a estabilizar las espumas en sistemas de lodos activados (Seviour y Nielsen, 2010). Por lo tanto, es necesaria que exista cierta pre-permeabilización celular. Tampoco fluorescerán si la sonda está diseñada para dirigirse a una región inaccesible del ARNr, y se necesitarán diseñar y aplicar sondas auxiliares para superar este problema (Fuchs *et al.*, 2000). La autofluorescencia de la muestra también suele ser un problema serio con las muestras de lodos activados. Los problemas metodológicos y las dificultades de la técnica FISH han sido discutidos a detalle en otras publicaciones (Moter y Göbel, 2000). Bouvier y Del Giorgio (2003) describen y discuten ciertos factores importantes que influyen en la sensibilidad y calidad de la técnica FISH. Éstos pueden resumirse de la siguiente manera:

- Auto-fluorescencia de compuestos que son fluorescentes naturalmente presentes en la muestra o en las células.
- Secuencia de la sonda (energía de unión, autocomplementación, etc.).
- Concentración de la sonda.
- Tipo de sonda.
- Microorganismo (la naturaleza de la membrana puede influir en la permeabilidad y sufrir lisis celular).
- Sitio de destino en el ARNr (la accesibilidad puede verse obstaculizada).
- Procedimiento de fijación (podría modificar químicamente la muestra/células).

- Presencia de desoxirribonucleasas (ADNas), o peroxidasas (para CARD-FISH).
- Tiempo de hibridación.
- Temperatura.
- Concentración de sal.
- Concentración de formamida (metanamida).
- Tiempo de lavado.
- Fenómenos de adsorción.



**Figura 7.6** Representación esquemática del procedimiento FISH.

La información sobre la secuencia de la sonda y su naturaleza estricta se puede encontrar en la literatura y en la base de datos de las sondas (Loy *et al.*, 2003) y se puede acoplar a múltiples fluorocromos. En general, funcionan bien los fluorocromos tales como Cy3, Cy5, FLUOS, TAMRA y variantes de Alexa, que proporcionan señales de baja atenuación y alta intensidad, sin comprometer la de baja permeabilización. Las sondas de oligonucleótidos con o sin fluorocromos, e inclusive preparadas a la medida con el objetivo de identificar específicamente ciertos organismos, pueden adquirirse en un gran número de proveedores disponibles en internet.

Es importante resaltar que el procedimiento FISH debe optimizarse para cada sonda y muestra basándose en un enfoque empírico/práctico.

### 7.5.1 Reactivos y soluciones para FISH

- **Fijador (Paraformaldehído 8%), para células Gram negativas**  
Mezclar 4 g de paraformaldehído (PFA) en 30 mL de agua destilada (dH<sub>2</sub>O) a 60 °C, añadir una gota de NaOH 2 N para facilitar su disolución (trabajar en una campana de extracción); añadir 16.6 mL de 3xPBS (véase más adelante). Ajustar a 50 mL con dH<sub>2</sub>O. Filtrar la solución a través de un filtro de policarbonato de 0.22 µm para eliminar cualquier material particulado o suspendido. La solución se debe utilizar fresca, pero se puede almacenar durante unos días en refrigeración o en alícuotas a -20 °C.
- **Lisozima para la permeabilización de células**  
Disolver la lisozima hasta una concentración final de 10 mg mL<sup>-1</sup> (~ 360 000 U mL<sup>-1</sup>) en EDTA 0.05 M 0.1 M<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.0). Preparar fresco cuando sea

necesario, y mantenerlo en hielo. Se puede almacenar en alícuotas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **Proteínasa K para la permeabilización de células**  
Disolver la proteínasa K (de la albúmina de *Tritirachium*) a  $20\,000\text{ U mL}^{-1}$  en la solución tampón de Tris-EDTA (EDTA  $0.01\text{ M}$ , Tris-HCl  $0.1\text{ M}^{-1}$ , pH 8.0). Preparar fresco cuando sea necesario, y mantenerlo en hielo. Se puede almacenar en alícuotas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- **Solución tampón salina de fosfato (3 x PBS)**  
Mezclar una solución  $0.1\text{ M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  con otra  $0.1\text{ M}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hasta que se alcance un pH 7.4. Mezclar  $22.8\text{ g}$  de NaCl en  $300\text{ mL}$  de esta solución de fosfato y añadir  $\text{dH}_2\text{O}$  hasta  $1\text{ L}$ . Esterilice en un autoclave, y almacene a temperatura ambiente.
- **Solución tampón Tris-EDTA r (TE buffer)**  
Solución  $0.01\text{ M}$  de EDTA,  $0.1\text{ M}$  Tris-HCl, pH 8.0. Esterilice por filtración y guarde a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- **1 M Tris-HCl, pH 8.0**  
Disolver  $121.1\text{ g}$  de Tris en  $800\text{ mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ , añadir  $42\text{ mL}$  de HCl concentrado, dejar enfriar, ajustar el pH y llenar hasta  $1\text{ L}$  con  $\text{dH}_2\text{O}$ . Esterilice en autoclave, y almacene a temperatura ambiente.
- **5 M NaCl**  
Disolver  $292.2\text{ g}$  de NaCl en  $800\text{ mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ , y rellenar hasta  $1\text{ L}$  con  $\text{dH}_2\text{O}$ . Filtración estéril, y guardar a temperatura ambiente.
- **Agua destilada estéril ( $\text{dH}_2\text{O}$ )**  
Esterilice en autoclave agua destilada.
- **Solución de dodecilsulfato de sodio al 10 % (10 % SDS)**  
Calentar  $50\text{ g}$  de SDS (calidad de electroforesis) en  $400\text{ mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$  a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y ajustar el pH a 7.2 con HCl concentrado, llenar hasta  $500\text{ mL}$ . No se requiere esterilización. Almacenar a temperatura ambiente.
- **0.5 M EDTA**  
Disolver  $18.6\text{ g}$  de EDTA en  $80\text{ mL}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$  ajustando el pH a 8.0 (aproximadamente se requieren  $2\text{ g}$  de gramos de NaOH) y rellenar hasta  $100\text{ mL}$  con  $\text{dH}_2\text{O}$ . Esterilizar por filtración y guardar a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 7.5.2 Procedimiento

- a. **Colección de la muestra.** Se recogen muestras frescas y se fijan inmediatamente de la manera descrita a continuación (pueden mantenerse a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2-3 días sin causar un impacto dañino en las células).
- b. **Fijación.** A menos que se conozca la población que será objeto de observación, en general la muestra se fija para células Gram positivas y Gram negativas.
  - (i) **Células Gram-positivas:** Mezcle volúmenes iguales de lodo activado (licor mezclado) y etanol al 96%. Conservar en el congelador (a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
  - (ii) **Fijación Gram-negativa:** Centrifugar  $5\text{ mL}$  de muestra durante  $8\text{ min}$  a aproximadamente a  $3400\text{ x g}$ . Eliminar el sobrenadante y reemplazarlo con 4% de una solución de PFA/PBS fría. La suspensión celular se fija durante 3 horas a aproximadamente  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Centrifugar durante  $8\text{ min}$  a aproximadamente  $3400\text{ x g}$ . Eliminar el sobrenadante (PFA) y desechar adecuadamente. Añadir  $5\text{ mL}$  de agua del grifo fría y mezclar antes de centrifugar durante  $8\text{ min}$  a aproximadamente  $3400\text{ x g}$ . Eliminar el sobrenadante. Repita este paso una vez más. Añadir  $5\text{ mL}$  de agua del grifo esterilizada y fría y mezclar. La muestra ya está lista para el procedimiento de FISH.  
La muestra fijada puede mantenerse a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante varios meses. Antes de su uso se debe tratar de la siguiente manera:  
Centrifugar durante  $8\text{ min}$  aproximadamente a  $3400\text{ x g}$ . Se retira el sobrenadante y se sustituye por una solución fría de PBS/EtOH 1:1. Si la muestra se ha mantenido en PBS/EtOH 1:1, se debe lavar una vez y volver a suspender en agua del grifo antes de la inmovilización.
- c. **Inmovilización en cristal.** Extender  $15\text{ }\mu\text{L}$  de la muestra en un portaobjetos de vidrio o en cada celda de una lámina recubierta de teflón. Utilice la punta de la pipeta para distribuir uniformemente la muestra. Dejar secar las muestras en una campana de extracción hasta que estén completamente secas (15-30 minutos). El secado a  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$  parece mejorar la unión muestras diluidas a la superficie de la lámina en comparación con el secado a temperatura ambiente.
- d. **Deshidratación.** Deshidratar la preparación con alcohol mediante etapas escalonadas como sigue:  $3\text{ min}$  en etanol al 50%, seguido de  $3\text{ min}$  en etanol al



80% y 3 min en etanol al 96%. El etanol puede ser utilizado varias veces, por lo que se puede almacenar en una campana. Deje que los portaobjetos se sequen completamente antes de la hibridación de FISH. Las muestras teñidas con DAPI no deben deshidratarse, ya que se desvanecen rápidamente en presencia de etanol.

- e. **Permeabilización.** Algunas células (por ejemplo, la *Mycolata*) requieren un pre-tratamiento para facilitar la permeabilización de su pared / envoltura celular. Esto se puede lograr mejor enzimáticamente con la exposición a la Lisozima y la proteinasa K, o químicamente (tratamiento ácido suave). Las enzimas a utilizar, sus concentraciones y condiciones de incubación, etc., dependen de la naturaleza de la muestra y de las células, optimizándose para cada muestra. Sin embargo, muchas de las muestras de lodos activados pueden ser sometidas a las pruebas FISH sin previa permeabilización enzimática o química o mediante la aplicación de un tratamiento suave. Cuando sea necesario, deberán utilizarse los métodos detallados en los siguientes protocolos:

i. **Permeabilización con lisozima**

- Aplique 10-15  $\mu\text{L}$  de lisozima fría (36 000-360 000 U  $\text{mL}^{-1}$ ) a la muestra sobre un portaobjetos. Coloque el portaobjetos en posición horizontal, en un tubo de polietileno de 50 mL, que contenga un papel suave empapado con 2 mL de  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- Incubar la preparación a 37 °C durante 10-60 min, dependiendo de la naturaleza de las células,
- Lavar el portaobjetos 3 veces en  $\text{dH}_2\text{O}$ , y una vez en etanol absoluto, y dejar que se seque al aire.

La preparación puede almacenarse a -20 °C durante varios meses.

ii. **Permeabilización con proteinasa K**

- Aplique 10-15  $\mu\text{L}$  de proteinasa K fría (2 000-20 000 U  $\text{mL}^{-1}$ ) en cada portaobjetos y transfiera a un tubo de polietileno de 50 mL revestido con un papel de servilleta humectado. Incubar durante 20-60 min a 37°C.
- Lavar el portaobjetos 3 veces en  $\text{dH}_2\text{O}$ , luego una vez en etanol absoluto, y dejar que el portaobjetos se seque al aire.

La preparación puede almacenarse a -20 °C durante varios meses.

iii. **Permeabilización con hidrólisis ácida**

- Sumergir la preparación con células deshidratadas en ácido clorhídrico (HCl 1 M) a 37 °C durante 30 min.
  - Lavar el portaobjetos con  $\text{dH}_2\text{O}$ , luego una vez en etanol absoluto y dejar que se seque al aire.
- f. **Hibridación.** Para lograr una mejor hibridación de las sondas de oligonucleótidos fluorescentes, deben tenerse en cuenta todos los factores que afectan el éxito y el resultado del enfoque cada vez que se examina un nuevo sistema.

- (i) Preparar la o las soluciones tampones para hibridación (Tabla 7.4) respetando estrictamente las condiciones dictadas para cada tipo de sonda de oligonucleótidos, las cuales se pueden encontrar en probeBase (Loy *et al.*, 2003) para cada sonda. Si no hay experiencia previa con la sonda, las nuevas condiciones deberán ser determinadas para cada sonda nueva de una manera empírica.

- (ii) Transferir 8  $\mu\text{L}$  de la solución tampón para hibridación dentro de un área de 1-2  $\text{cm}^2$  sobre un portaobjetos de vidrio o en cada celda de un portaobjetos revestido con teflón que cuente con una o más celdas.

- (iii) Añadir 1  $\mu\text{L}$  de cada sonda (concentración de la sonda 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) y mezclar cuidadosamente (evite el contacto con la sonda) con la solución tampón para hibridación (deben utilizarse pipetas estériles para todo el trabajo con las sondas de genes). Si se hace necesario añadir más sondas a la misma celda no importa el orden en que se haga la adición. Se deben usar concentraciones equimolares de cada sonda. Coloque la preparación horizontalmente en un tubo Greiner estéril (50 mL) con un trozo de papel de algodón humedecido con 1-2 mL de la misma solución tampón para hibridación. Colocar el tubo en el horno de hibridación (46 °C) durante 1 hora y media.

g. **Lavado.**

- (i) Preparar 50 mL de la solución tampón de lavado (Tabla 7.5) y precalentar en un baño de agua a 48 °C antes del lavado.
- (ii) Después de la hibridación, retire cuidadosamente el portaobjeto del tubo Greiner usando unas pinzas.
- (iii) Vierta unos mililitros de la solución tampón de lavado precalentado en la parte superior del portaobjetos para eliminar el exceso de solución de la sonda de las celdas del

- portaobjetos (Precaución: no directamente sobre la muestra).
- (iv) Colocar el portaobjetos en el tubo de Greiner de 50 mL precalentado (48 ° C) conteniendo la solución tampón de lavado en un baño de agua a 48 ° C durante 15 minutos para lavar las muestras no fijadas.
  - (v) Retire de nuevo cuidadosamente el portaobjetos con un par de pinzas. Enjuague con dH<sub>2</sub>O fría sumergiendo el portaobjetos en un vaso de precipitados de vidrio para eliminar cualquier NaCl cristalizado.
  - (vi) Permita que las preparaciones se sequen al aire.

**Tabla 7.4** Solución tampón para hibridación (46 °C) para el procedimiento de FISH en función del porcentaje de formamida (FA) a agregar.

FA %	FA $\mu$ L	dH <sub>2</sub> O $\mu$ L	5 M NaCl $\mu$ L	1 M Tris/HCl $\mu$ L	10% SDS $\mu$ L
0	0	1,600	360	40	2
5	100	1,500	360	40	2
10	200	1,400	360	40	2
15	300	1,300	360	40	2
20	400	1,200	360	40	2
25	500	1,100	360	40	2
30	600	1,000	360	40	2
35	700	900	360	40	2
40	800	800	360	40	2
45	900	700	360	40	2
50	1,000	600	360	40	2
60	1,200	400	360	40	2
65	1,300	300	360	40	2
70	1,400	200	360	40	2

**Tabla 7.5** Buffer de lavado (48 °C) para el procedimiento FISH.

FA %	1 M Tris/HCl (pH 8,0) $\mu$ L	10% SDS $\mu$ L	5 M NaCl $\mu$ L	0.5 M EDTA $\mu$ L
0	1,000	50	9000	0
5	1,000	50	6,300	0
10	1,000	50	4,500	0
15	1,000	50	3,180	0
20	1,000	50	2,150	500
25	1,000	50	1,490	500
30	1,000	50	1,020	500
35	1,000	50	700	500
40	1,000	50	460	500
45	1,000	50	300	500
50	1,000	50	180	500
55	1,000	50	100	500

- h. Microscopía (EPI-fluorescente y CLSM). Las preparaciones secas pueden analizarse posteriormente microscópicamente.
  - (i) Coloque una pequeña gota de Citifluor (o Vectashield, o una mezcla de ambos) en los portaobjetos y poner un cubreobjetos en la parte superior. Asegúrese de que el Citifluor se distribuya a todas las celdas del portaobjetos.
  - (ii) Si las preparaciones no se evalúan el mismo día de la hibridación, se pueden almacenar a -20°C durante algunas semanas, y la intensidad de la señal de fluorescencia permanecerá virtualmente sin cambios.

## 7.6 TÉCNICAS COMBINADAS DE TINCIÓN

Se pueden combinar muchas técnicas diferentes de tinción para proporcionar una mejor comprensión de las relaciones entre la identificación bacteriana y su función. Este enfoque es importante y puede proporcionar información ecofisiológica de las células individuales en comunidades complejas. De este modo, permite la detección de compuestos almacenados intracelularmente tales como poli-P y PHA en poblaciones de interés y ayudan a explicar qué organismos son responsables de las transformaciones químicas en procesos tales como la EBPR. También pueden identificar células que son capaces de sintetizar enzimas o células extracelulares específicas cuyas superficies son hidrófobas, lo cual es una característica celular importante vinculada a la formación de espuma (Tabla 7.6).

**Tabla 7.6** Técnicas de tinción que pueden combinarse para vincular la identificación con la función.

Identificación	FISH, Gram	Referencias
Consumo de sustrato	Micro-autoradiografía	Nierychlo <i>et al.</i> , 2015
Propiedades de la superficie	Adhesión de microesferas a la célula	Nielsen <i>et al.</i> , 2001
Componentes de la superficie	Lectinas, anticuerpos	Böckelmann <i>et al.</i> , 2002
Actividad exoenzimática	Fluorescencia ligada a enzimas	Nielsen <i>et al.</i> , 2002, 2010a Kragelund <i>et al.</i> , 2007 van Ommen Kloeckey Geesey, 1999
Productos almacenados intracelularmente	PHA, poly-P, Azufre	Nielsen <i>et al.</i> , 2010b

La mayoría de las bacterias en comunidades naturales mixtas complejas como las de lodos activados no se pueden aislar y cultivar en cultivos puros. Incluso el establecimiento de cultivos enriquecidos en el laboratorio es probable que modifique los parámetros selectivos naturales, bióticos y abióticos. Por lo tanto, es necesario estudiar sus funciones directamente en los hábitats naturales. Muchos de estos estudios se han llevado a cabo mediante el uso de metodologías combinadas como las que se describen aquí, con la intención de que otros investigadores las adopten en sus estudios (Nielsen *et al.*, 2010a, b).

A continuación, se da un ejemplo de cómo aplicar la técnica FISH en combinación con (i) tinción DAPI y (ii) tinción PHA para detectar e identificar las bacterias capaces de almacenar poli-P (PAOs) y bacterias que acumulan grandes cantidades de bioplásticos en la forma de PHA en sistemas de lodos activados diseñados para eliminar microbiológicamente el fósforo. Estos datos contribuirán a una mejor comprensión de la compleja microbiología de estos procesos (por ejemplo, cómo las PAOs pueden superar a otros organismos) para allanar el camino para una eventual optimización basada en el conocimiento de las plantas de tratamiento de aguas residuales con EBPR. Es notable que la mayoría de las PAOs nunca se han aislado en el cultivo puro, pero se estudian ya sea como cultivos enriquecidos (a escala de laboratorio) o en sistemas de tratamiento de escala real.

La tinción con DAPI puede detectar todas las bacterias a partir de su unión no específica al ADN. Sin embargo, también se ha sabido que DAPI tiñe los gránulos intracelulares de poli-fosfato en células bacterianas cuando se aplica a concentraciones elevadas. Los espectros de fluorescencia de los complejos DAPI-ADN presentan una máxima emisión de fluorescencia de alrededor de 450 nm (azul), mientras que los complejos DAPI-poli-P producen un desplazamiento de la banda espectral con una emisión de alrededor de 525-550 nm (verde-amarillo). Mientras que el ADN se tiñe habitualmente mediante soluciones de trabajo que contienen  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DAPI, la detección de poli-P se lleva a cabo incubando células con  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DAPI.

## 7.6.1 Tinción FISH – DAPI

### 7.6.1.1 Reactivos y soluciones para la tinción DAPI

- **Soluciones estándar DAPI y almacenamiento** (ver Sección 7.4.4.1)
- **Reactivos usados para FISH** (ver Sección 7.5.1)

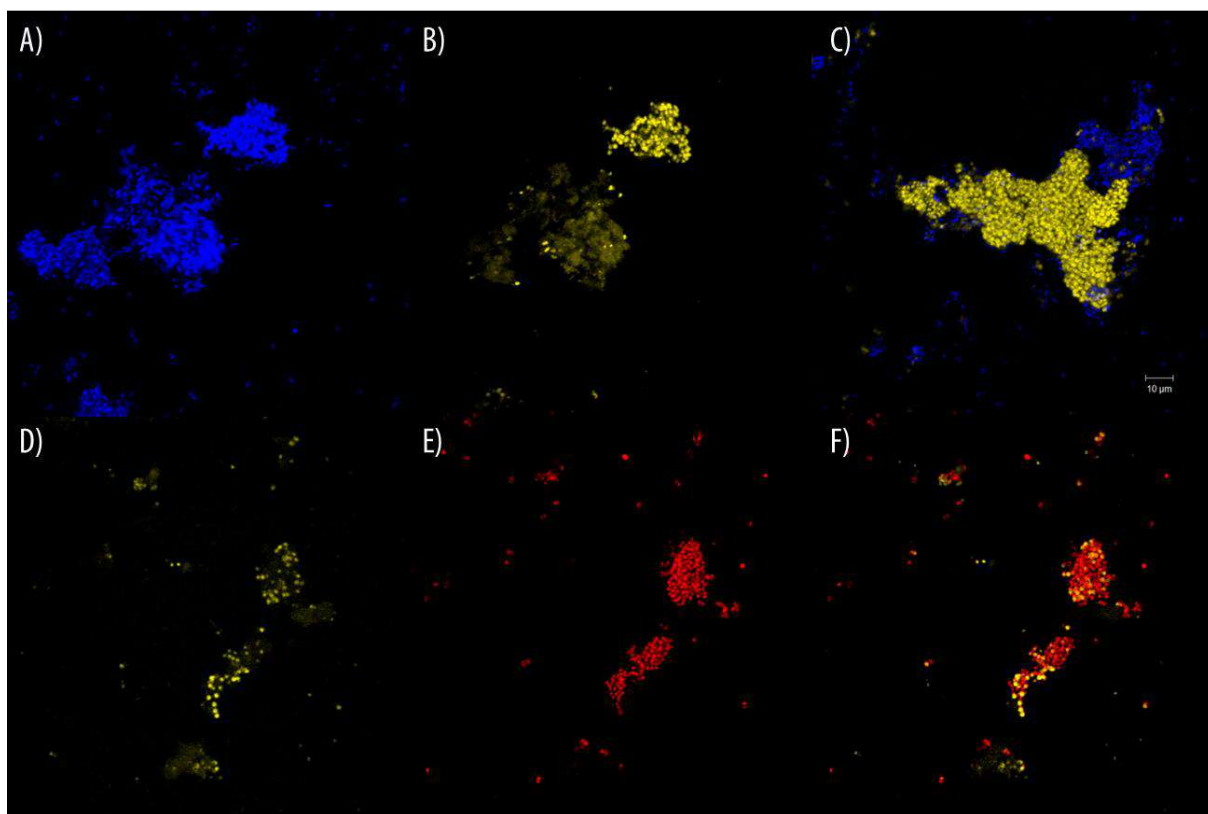
### 7.6.1.2 Procedimiento

- Realice el FISH como se describió anteriormente, usando sondas concebidas para la identificación de PAOs, y las condiciones apropiadas para la fijación, inmovilización y la hibridación de la sonda.
- Después de incubar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente (puede requerirse una tinción más larga para algunas muestras), retire cualquier exceso de DAPI por centrifugación y enjuague con abundante agua estéril hasta que la fluorescencia de fondo sea mínima.
- Deje secar al aire una preparación teñida mediante FISH y DAPI se puede almacenar indefinidamente a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Aplique una gota de agente anti-descolorante (Citifluor, Vectashield o una mezcla) directamente sobre la muestra.

Cubrir con un cubreobjetos y examinar bajo el microscopio de epifluorescencia. El máximo de excitación para DAPI unido a dsDNA es 358 nm y 525-550 nm para poli-P. El máximo de emisión es 461 nm.

Un conjunto de filtros con una máxima excitación de paso de 350 nm y un filtro de paso de emisión de 500 nm, se combina con el espejo dicróico apropiado (véanse las instrucciones del fabricante).

Los mejores resultados para el uso combinado de FISH con tinción con DAPI-poli-P se obtienen con sondas marcadas con colorantes de fluorescencia desplazados hacia el color rojo tales como Cy3 para FISH.



**Figura 7.7** Uso combinado de tinción DAPI (azul) para tinción de poly-P (amarillo) y FISH (rojo) para identificación de células. Imagen (A) e imagen (B), y (D), (E) y (F) muestran, respectivamente, el mismo campo microscópico.

## 7.6.2 TINCIÓN FISH – PHA

### 7.6.2.1 Reactivos y soluciones para tinción PHA

- **Reactivos para tinción de PHA**
  - (i) 1 % (v/v) solución acuosa de Azul de Nilo
  - (ii) 8 % (v/v) ácido acético
- **Reactivos para FISH** (ver Sección 7.5.1)

### 7.6.2.2 Procedimiento

- a. Diluir con agua el lodo activado recién recolectado hasta una concentración final de aproximadamente 1 g de SSLM L<sup>-1</sup>, y transferir 20 µL a un portaobjetos recubierto de gelatina. Deje secar. La homogeneización puede ser útil para aumentar la resolución.
- b. Coloree la muestra sumergiendo el portaobjetos en una suspensión de solución acuosa al 1% de Azul Nilo (calentada a 55 ° C) durante 10 min.
- c. Elimine el exceso de color enjuagando cuidadosamente con dH<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.
- d. Lavar durante 1 min en ácido acético al 8% las células teñidas.
- e. Eliminar el exceso de ácido acético aclarando cuidadosamente con dH<sub>2</sub>O.
- f. Deje secar al aire la preparación.
- g. Añadir una gota de dH<sub>2</sub>O al portaobjetos, y examinar con un microscopio de epifluorescencia (longitud de onda de excitación 630 nm). Una respuesta de tinción de PHA positiva se demostrará por la presencia de gránulos de PHA fluorescentes dentro de la célula, y se distinguirá fácilmente de las células teñidas negativamente.
- h. Registre cualquier campo de interés con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) o un microscopio de escaneo láser y almacene las coordenadas para ese campo en el tornillo del micrómetro. Alternativamente marque la posición

- del cono de luz con un lápiz a un costado de la preparación.
- i. Retire la preparación y deje que se seque al aire.
  - j. Fijar la muestra directamente en el portaobjeto con PFA o EtOH seguido de una etapa de permeabilización (si es necesario) como se describe en el procedimiento FISH. Deje que la preparación se seque al aire.
  - k. FISH se lleva a cabo como se describe en la Sección 7.5. Para una clara diferenciación de las señales de fluorescencia de la tinción de PHA y la hibridación FISH, asegurarse de que se utilicen sondas de oligonucleótidos marcadas con un fluorocromo

fuerte, claramente distinguible de los espectros de emisión de PHA (tales como FLUOS, Cy5).

- l. Reubicar las coordenadas donde las imágenes de PHA fueron adquiridas y evalúe la señal de FISH. Obtener las imágenes antes y después de aplicar el FISH y evaluar la identidad de las células con tinción positiva de PHA.

La tinción para PHA puede llevarse a cabo en muestras fijadas en etanol o PFA, pero debe evitarse la fijación directa en el portaobjeto entre la tinción para PHA y el procedimiento FISH.

## Referencias

- Bouvier, T., Del Giorgio, P.A. (2003). Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol Ecol.* 44(1): 3-15.
- Böckelmann, U., Manz, W., Neu, T.R., y Szewzyk, U. (2002). Investigation of lotic microbial aggregates by a combined technique of fluorescent *in situ* hybridization and lectin-binding-analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 49:75-87.
- Eikelboom, D.H. (2000) Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. IWA Publishing, London, UK. ISBN 1900222302.
- Eikelboom, D.H. (2006) Identification and control of filamentous microorganisms in industrial wastewater treatment plants. IWA Publishing, London, UK. ISBN 1843390965.
- Fuchs, B.M., Glöckner, F.O., Wulf, J., y Amann, R. (2000). Unlabelled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S ARNr of fluorescently labelled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3603-3607.
- Haugland, R.P. (1999). Molecular probes. Handbook of fluorescent probes and research chemicals, 7<sup>th</sup> ed. Molecular Probes, Eugene, Oregon, US. ISBN 0965224007.
- Jenkins, D., Richard, M.G., y Daigger, G.T. (2004) Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems. 3<sup>rd</sup> ed. IWA Publishing, London, UK. ISBN 9781566706476.
- Kragelund, C., Remesova, Z., Nielsen, J.L., Thomsen, T.R., Eales, K.L., Seviour, R.J., Wanner, J., y Nielsen, P.H. (2007). Ecophysiology of mycolic acid containing Actinobacteria (Mycolata) in activated sludge foams. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61:174-184.
- Lopez-Vazquez, C.M., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2008). Factors affecting the microbial populations at full-scale Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands. *Water Res.*, 42(10-11): 2349-60
- Loy, A., Horn, M., y Wagner, M. (2003). probeBase: an online resource for ARNr-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research*, 31(1): 514-516.
- Moter, A., y Göbel, U.B. (2000). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 85-112.
- Nierychlo, M., Nielsen, J.L., y Nielsen, P.H. (2015). Studies of the ecophysiology of single cells in microbial communities by (quantitative) microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization (MAR-FISH). In Hydrocarbon and lipid microbiology protocols, McGenity *et al.* (eds.), Springer Protocols Handbooks, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. ISBN 9783662451793.
- Nielsen, P.H., Kragelund, C., Seviour, R.J., y Nielsen, J.L. (2009). Identity and ecophysiology of filamentous bacteria in activated sludge. *FEMS Mic. Review.* 33(6): 969-998.
- Nielsen J.L. (2009). Protocol for Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) with ARNr-targeted oligonucleotides. In: FISH Handbook for biological wastewater treatment, Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH. Nielsen, P.H., Daims, H., y Lemmer, H. (Eds). ISBN 978-1843392316.
- Nielsen, J. L., Mikkelse, L. H., y Nielsen, P. H. (2001) *In situ* detection of cell surface hydrophobicity of probe-defined bacteria in activated sludge. *Water Sci. Tech.* 43: 97-103.
- Nielsen, J.L., Kragelund, C., y Nielsen, P.H. (2010a). Ecophysiological analysis of microorganisms in complex microbial systems by combination of fluorescence *in situ* hybridization with extracellular staining techniques. In: Methods in Molecular Biology. Bioremediation. Humana Press Inc. Cummings, S. (Ed.). 599: 117-128. ISBN 9780444010827.
- Nielsen, J.L., Kragelund, C., y Nielsen, P.H. (2010b). Combination of fluorescence *in situ* hybridization with staining techniques for cell viability and accumulation of PHA and poly-P in microorganisms in complex microbial systems. In: Methods in Molecular Biology. Bioremediation. Humana Press Inc. Cummings, S. (Ed.). 599: 103-116. ISBN 9780444010827.
- Nielsen, P. H., Roslev, P., Dueholm, T.E., y Nielsen, J.L. (2002). *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants. *Water Sci. Technol.* 46: 73-80.
- Pernthaler, A., y Pernthaler, J. (2007). Fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microbes. Methods in Molecular Biology, vol. 353: Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes. 2<sup>nd</sup> ed. Hilario E. y Mackay J. (Eds). Humana Press Inc., Totowa, NJ. ISBN 9780444010827.
- Salvadó, H., Gracia, M.P., Amigó, J.M. (1995), Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activated sludge plants, *Wat. Res.*, 29: 1041-1050.



Seviour, R.J. y Nielsen, P.H. (2010). Microbial ecology of activated sludge. Seviour, R.J. y Nielsen, P.H. (Eds). IWA publishing, London, UK. ISBN 9781843390329.

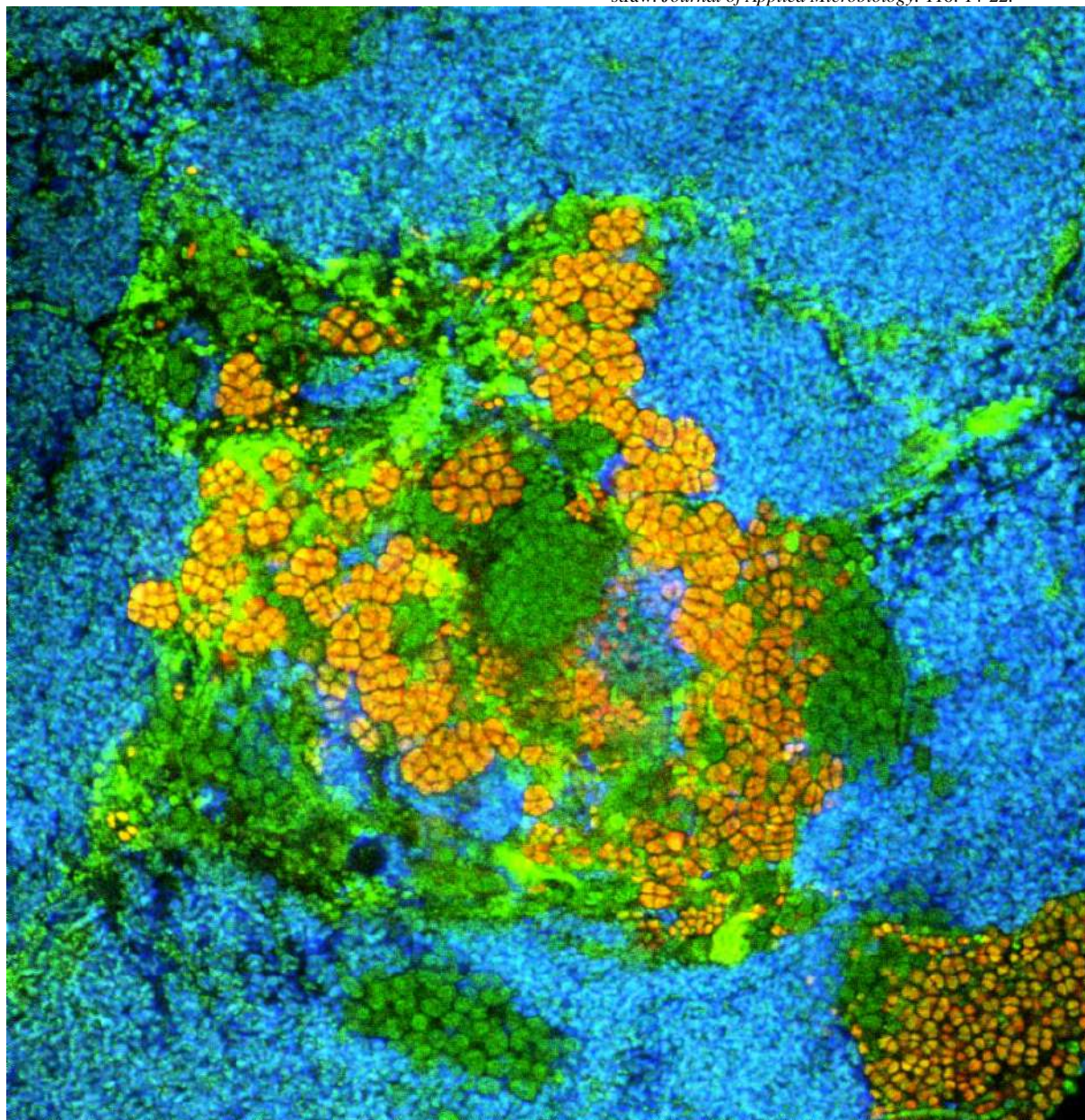
Stoecker, K., Dorminger, C., Daims, H., y Wagner, M. (2010). Double labelling of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases ARNr accessibility. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(3): 922-926.

Trotta, E., y Paci, M. (1998). Solution structure of DAPI selectively bound in the minor groove of a DNA T.T mismatch-containing

site: NMR and molecular dynamics studies. *Nucleic Acids Res.* 26(20): 4706-4713.

van Ommen Kloecke, F., y Geesey, G.G. (1999) Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge flocs. *Microb. Ecol.* 38: 201-214.

Xia, Y., Kong, Y.H., Seviour, R., Forster, R.J., Kisidayova, S., y McAllister, T.A. (2014). Fluorescence *in situ* hybridization probing of protozoal Entodinium spp. and their methanogenic colonizers in the rumen of cattle fed alfalfa hay or triticale straw. *Journal of Applied Microbiology*. 116: 14-22.



**Figura 7.8** Resultados de la aplicación del procedimiento FISH en muestras de lodo de reactores EBPR. Azul: Accumulibacter (PAOs por la sonda PAOmix – Cy5); rojo: Defluviicoccus (GAOs objetivo de la sonda DF2mix – Cy3); verde: Eubacteria (objetivo de la sonda EUB338 mix), (Imagen: McIlroy, 2016).

# MÉTODOS MOLECULARES

Autores:

Søren M. Karst

Mads Albertsen

Rasmus H. Kirkegaard

Morten S. Dueholm

Per H. Nielsen

Revisor:

Holger Daims

## 8.1 INTRODUCCIÓN

Los métodos moleculares se pueden aplicar en el campo del tratamiento de las aguas residuales para realizar una identificación rápida, confiable y económica de microorganismos relevantes. En algunos casos, es posible también relacionar su identificación con una función biológica en particular, aunque frecuentemente se encuentran sorpresas. Un ejemplo reciente son algunos organismos nitrificantes, que se pensaba que tenían una fisiología simple y bien descrita, pero que ahora se conoce que cuentan con diversos procesos fisiológicos (Daims *et al.*, 2015). La función tiene que ver tanto con su fisiología (heterótrofos, nitrificadores, fermentadores, etc.) como con su morfología (filamentosos, o células simples), lo que es importante debido al efecto que ejercen en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. Al identificar su identidad y función, es posible hasta cierto punto manipular su presencia para mejorar e inclusive optimizar el desempeño de las plantas depuradoras, por ejemplo asegurando la presencia de organismos nitrificadores o favoreciendo la eliminación de especies filamentosas indeseables.

La identificación molecular de los microorganismos generalmente se basa en el gen 16S rARN. Sin embargo, en algunos casos la identificación se lleva a cabo

utilizando en su lugar la secuenciación de genes funcionales. Por ejemplo, en el caso de microorganismos oxidantes de amonio, se pueden secuenciar los genes que codifican la enzima amonio monooxigenasa (AMO) (Rotthauwe *et al.*, 1997; Okano *et al.*, 2004), ya que éstos proporcionan una mayor resolución filogenética, lo cual es útil para estudios que requieren una mayor precisión.

Los métodos más comunes para la identificación aplicados en el campo del tratamiento de las aguas residuales han sido el PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR), técnicas de generación de librerías de clones y de información genética condensada representativa y confiable de las células (*fingerprinting*) tales como la electroforesis de gel con gradiente desnaturizante (DGGE; Muyzer, 1999) o el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción terminales (T-RFLP) (Marsh, 1999; Marzorati *et al.*, 2008). Sin embargo, actualmente estos métodos ya no se utilizan con frecuencia ya que son más complicados y proporcionan menos información comparado con sus contrapartes basadas en la secuenciación de alto rendimiento o alto flujo.

La secuenciación de alto rendimiento o de alto flujo se puede aplicar para estudios metagenómicos o de



metatranscripción, donde se secuencian todo el ADN o los genes expresados (ARNm) de una cierta comunidad. Sin embargo, el alcance de éstos métodos va más allá de los contemplados en el presente libro ya que requieren una gran experiencia y habilidad en biología molecular y bioinformática.

En su lugar, para el análisis periódico de comunidades microbianas, se recomienda la secuenciación amplicon de alto rendimiento, el cual se describirá con mayor detalle en el presente capítulo. El método proporciona una lista de microorganismos presentes en una muestra dada y un estimado de su abundancia relativa. Una de las primeras plataformas de secuenciación utilizada para la secuenciación de amplicon de alto flujo fue el Roche 454 (frecuentemente conocido como “pirosecuenciación”). Sin embargo, ésta se volvió obsoleta (en 2016) y a la fecha la plataforma Illumina domina el mercado de la secuenciación de amplicon. Comparada con técnicas anteriores, con la plataforma Illumina es posible analizar cientos de muestras de una manera rápida, fácil y económica.

La identificación de microorganismos se hace generalmente comparando secuencias desconocidas con una serie de referencias conocidas que tienen una taxonomía definida. En este capítulo recomendamos usar la base de datos MiDAS ([midasfieldguide.org](http://midasfieldguide.org)), que es una base de datos depurada enfocada en microorganismos relacionados con el campo del tratamiento de aguas residuales. En esta base de datos, los nombres canónicos o putativos para la mayoría de las categorías taxonómicas a nivel de género han sido incluidos y pueden ser usados con un vocabulario común para todos los investigadores especialistas en el campo para referirse a dichos organismos. La base de datos MiDAS también proporciona información funcional disponible acerca de 150 de los microorganismos más abundantes presentes en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) danesas y probablemente del mundo (McIlroy *et al.*, 2015).

Este capítulo se enfoca en la aplicación de ciertos métodos utilizados actualmente en la microbiología de las aguas residuales: la extracción de ADN, el qPCR y la secuenciación del amplicon.

## 8.2 EXTRACCIÓN DE ADN

### 8.2.1 Consideraciones generales

Para cualquier análisis de composición microbiana que utilice la secuenciación de ADN resulta esencial contar

con un protocolo optimizado y estandarizado para la extracción de ADN. Esto se debe a que los microorganismos tienen diferentes niveles de resistencia a diferentes métodos de lisis (Thomas *et al.*, 2012; Guillén-Navarro *et al.*, 2015). Por ello, los microorganismos que cuentan con paredes celulares más resistentes a los procesos de lisis podrían parecer menos abundantes si se usan protocolos de extracción subóptimos (Bollet *et al.*, 1991; Filippidou *et al.*, 2015). Además, si las muestras de lodos activados contienen ciertas sustancias químicas, algunas técnicas podrían no ser exitosas debido a la generación de posibles efectos inhibidores (Guo y Zhang, 2013). De esta manera, el método de extracción del ADN necesita ser suficientemente robusto para enfrentar los retos que presentan las características de las aguas residuales y los lodos activados. A pesar de diversos esfuerzos enfocados en la investigación y desarrollo de diferentes protocolos para la extracción de ADN, es poco probable que llegue a existir un protocolo perfecto. Los sesgos introducidos durante la extracción del ADN pueden solamente minimizarse, pero no evitarse (Guo y Zhang, 2013; Albertsen *et al.*, 2015). El objetivo de esta sección es ofrecer una revisión breve de las etapas involucradas en la extracción del ADN y proporcionar recomendaciones generales para su aplicación en muestras procedentes de plantas de tratamiento de lodos activados. Además, se presenta un protocolo optimizado para lodos activados basado en el protocolo desarrollado por Albertsen *et al.* (2015).

### 8.2.2 Muestreo

Es de suma importancia que la muestra sea representativa de los lodos activados presentes en el tanque de proceso de la planta o en el reactor a escala de laboratorio. Para sistemas a escala real, se recomienda tomar una muestra grande (1 L) de un tanque bien mezclado, homogeneizar y finalmente tomar submuestras de tres alícuotas de 2 mL (3x2 mL) que pueden ser rápidamente congeladas y mantenidas a -20 °C (inclusive por años) hasta que sean analizadas. Idealmente, se deben almacenar suficientes muestras (réplicas) para estimar la varianza de los resultados de los análisis de las muestras y para tener un volumen extra disponible de biomasa en caso de que se cometa algún error y de que algunos análisis deban repetirse. Es importante minimizar el tiempo que pasa desde el muestreo hasta la congelación ya que el cambio de las condiciones fuera del ambiente original podría favorecer el crecimiento de unas especies en detrimento de las otras, haciendo a la muestra inapropiada para llevar a cabo un análisis comparativo (Guo y Zhang, 2013).

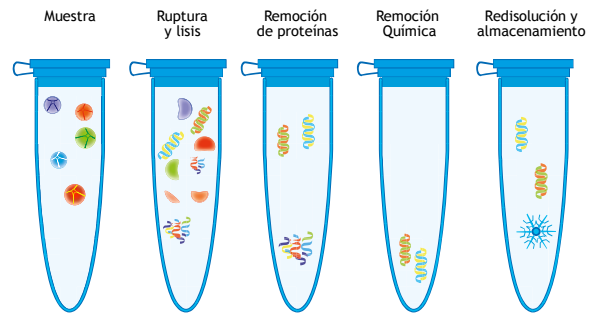
Preferentemente, el muestreo debe ser periódico o frecuente (por ej. cada semana) o cuando exista una variación en las condiciones ambientales u operativas de los sistemas (por ej. un cambio en las características de las aguas residuales, temperatura o pH). Las muestras recolectadas deben ser congeladas y almacenadas en un “banco biológico” para su análisis posterior (generalmente en un congelador a  $-20$  o  $-80$  °C dependiendo de los requerimientos de la técnica molecular a aplicar). Como el número de muestras puede crecer rápidamente es importante identificar cada una de ellas claramente y mantener un registro adecuado con los datos de identificación de la muestra, identificación del reactor, fechas, medidas químicas relacionadas y cualquier información que pudiera ser relevante para el posterior análisis microbiano.

### 8.2.3 Extracción de ADN

La extracción del ADN involucra ciertas etapas generales que se modifican y combinan en formas diferentes en los diversos kits comerciales disponibles dependiendo del organismo en cuestión, tipo de ambiente y el propósito del ADN extraído. Las etapas comunes son la separación y la lisis celular, la remoción de químicos y proteínas y la elución del ADN (Figura 8.1).

#### 8.2.3.1 Lisis celular

Se han desarrollado varios métodos para llevar a cabo la lisis de las células y liberar su ADN. Algunos métodos usan agentes químicos para romper las células; algunos otros se basan en una degradación enzimática de las estructuras celulares; y otros generan un estrés físico, como ciclos de congelación–descongelación; o un estrés mecánico, mediante ultrasonido o una agitación y mezclado con esferas (“bead beating”) (Bollet *et al.*, 1991; Tsai y Olson, 1991; Zhou *et al.*, 1996). También, existen kits listos para usar que emplean combinaciones de estas estrategias que han sido optimizadas para distintos tipos de muestras y células. Las características naturales de los lodos activados presentan un reto para varias de estas técnicas debido a que causan diferentes tipos de inhibición (Tullis y Rubin, 1980). Sin embargo, la lisis mecánica ha probado ser suficientemente robusta y menos susceptible a posibles efectos inhibidores (Salonen *et al.*, 2010; Guo y Zhang, 2013; Albertsen *et al.*, 2015). Frecuentemente, la lisis de las células se lleva a cabo con detergentes y sustancias surfactantes que favorecen la separación y remoción de los constituyentes de la membrana celular (como por ejemplo de los lípidos) en una etapa de centrifugación subsecuente.



**Figura 8.1** Principales etapas durante el proceso de extracción de ADN

Si en la etapa de lisis celular se modifican algunos parámetros, es importante ensayar los efectos sobre el rendimiento y la integridad del ADN extraído. Al incrementar la intensidad o duración de algunas etapas, es posible que se incremente el rendimiento hasta algún nivel de saturación. Sin embargo, un incremento excesivo en la duración o en la intensidad podría causar la ruptura de parte del ADN, aparte de que disminuye la cantidad de muestras que pueden ser manipuladas en un tiempo definido (Bollet *et al.*, 1991; Bürgmann *et al.*, 2001).

#### 8.2.3.2 Inhibición de la actividad de las nucleasas y remoción de proteínas

Las células microbianas poseen numerosas enzimas que están especializadas en la degradación del ADN (nucleasas), por lo que es esencial que éstas sean removidas o inhibidas tan pronto como sea posible después de la lisis celular. Un método común para remover la actividad de las nucleasas es la adición de proteasas, las cuales se especializan en la degradación de proteínas, incluyendo las nucleasas. Posteriormente las proteínas son removidas incrementando la concentración de sales en la muestra lo que provoca su precipitación. El precipitado puede ser separado mediante centrifugación, quedando el ADN en la solución y las proteínas en los sólidos que precipitan (*pellet*) en el fondo de los tubos de centrifugación (Miller *et al.*, 1999).

#### 8.2.3.3 Purificación

Junto con el ADN extraído se encuentra otro tipo de ácido nucleico que también se encuentra en la célula, el ARN. Las moléculas de ARN se pueden remover mediante la adición de la enzima RNasa que elimina específicamente el ARN, dejando intacto el ADN (Miller *et al.*, 1999). Siguiendo los mismos pasos, después de estas etapas es importante remover compuestos y sustancias no deseadas, tales como sales, detergentes, proteínas y otros reactivos usados en el proceso de la lisis celular. Esta

purificación se lleva usualmente a cabo precipitando el ADN con etanol, ya que el ADN es insoluble en etanol, y recuperando los sólidos precipitados mediante centrifugación (Bollet *et al.*, 1991). El ADN puede depurarse reemplazando el sobrenadante con etanol nuevo. Alternativamente, el ADN puede ser adsorbido en una matriz sobre un filtro o una sílica que permita llevar a cabo las etapas de lavado y una posterior liberación al alterar la concentración salina.

#### 8.2.3.4 Elución y almacenamiento

Después de que el ADN es aislado tanto de otros constituyentes celulares como de los químicos usados en la extracción, el etanol se puede eliminar mediante evaporación y el ADN puede disolverse en agua de alta calidad libre de ADNasa o en una solución con una solución amortiguadora protectora, como por ejemplo Tris-EDTA (TE) (Miller *et al.*, 1999). El ADN purificado puede congelarse y almacenarse por años, o mantenerse en refrigeración por algunas semanas.

#### 8.2.4 Cuantificación e integridad

Dependiendo del procesamiento posterior, es importante cuantificar el ADN y confirmar que no esté demasiado fragmentado. La mejor cuantificación se logra utilizando un método basado en fluorescencia que puede distinguir entre el ADN y el ARN, tal y como se implementa en los kits Qubit dsDNA. Estos kits pueden cuantificar el ADN con precisión a las bajas concentraciones requeridas en la mayoría de los métodos basados en la secuenciación (Singer *et al.*, 1997). Sin embargo, el popular sistema “nanodrop” (el cual es una metodología basada en espectrofotometría) puede proporcionar estimaciones aceptables para concentraciones más altas de ADN (> 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) cuando el ADN es muy puro. El espectro registrado por el sistema nanodrop también proporciona información adicional acerca de la pureza del ADN, esto último dado que la relación de las intensidades a diferentes longitudes de onda puede utilizarse para evaluar la potencial presencia de contaminantes. Este tipo de información puede usarse para evaluar si es necesario llevar a cabo etapas adicionales de purificación (Wilfinger *et al.*, 1997).

La distribución del tamaño del ADN puede ser determinada usando la electroforesis clásica en gel (McMaster y Carmichael, 1977) o técnicas más sensibles y típicamente más rápidas implementadas en sistemas especializados y completamente automatizados, como instrumentos tipo 'bioanalyzer' y 'tape-station' (Panaro *et al.*, 2000; Padmanaban *et al.*, 2013). La determinación

del tamaño se basa en el hecho de que los fragmentos de ADN más largos se mueven más lentamente a través de la matriz del gel que los fragmentos más pequeños cuando son expuestos a una corriente eléctrica. Comparando la distancia recorrida del ADN extraído con la distancia recorrida por fragmentos de tamaño conocido, es posible estimar la distribución de la longitud de los fragmentos de ADN a estudiar (McMaster y Carmichael, 1977). La estimación precisa de la longitud y concentración de ADN es crucial para algunos tipos de análisis moleculares.

#### 8.2.5 Extracción optimizada de ADN en sistemas de tratamiento de aguas residuales de lodos activados

Este protocolo explica la extracción del ADN de muestras obtenidas en lodos activados de PTAR. Este método de extracción está basado en el protocolo para suelos kit spin FastADN (MP Biomedicals), con algunas modificaciones, principalmente en la dinámica, y con una mayor duración del estrés mecánico ejercido por la agitación con esferas, según lo publicado por Alberten *et al.* (2015).

La clave en la extracción del ADN es ser consistente y por ello se sugiere que este protocolo sea seguido al pie de la letra. Si se decide o es necesario desviarse de los pasos o fases del presente protocolo se recomienda hacerlo de manera consistente, aplicándolo a todas las muestras durante todo el experimento.

##### 8.2.5.1 Materiales

Los materiales que se necesitan para la extracción del ADN son:

- Un spin kit FastADN para suelos (MP Biomedicals).
- Un FastPrep-24 (MP Biomedicals).
- Una microcentrífuga (preferentemente con refrigeración).
- Tubos de centrífuga, de 1.5 mL.
- Tubos Falcon, de 15 mL.
- Hielo.
- Etanol.
- Pipetas (en el rango de 1  $\mu\text{L}$  a 1000  $\mu\text{L}$ ).
- Puntas para pipeta libres de ADNasa (10  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ ).
- H<sub>2</sub>O de alta calidad libre de nucleasa (Qiagen).
- Un marcador permanente (resistente a la congelación).
- Una impresora de etiquetas (opcional).



- Equipo de seguridad personal: bata de laboratorio, espejuelos de seguridad, guantes.

### 8.2.5.2 Extracción del ADN

El tiempo total que se necesita para la extracción del ADN de una muestra es aproximadamente de 4 h.

1. Muestra inicial
    - a. Volumen: 500  $\mu$ L.
    - b. Sólidos totales (ST): 2 mg.

▲ **Etapa crítica** Nunca trate de centrifugar la muestra para concentrarla!
  2. Prepare y marque los tubos para llevar a cabo todos los pasos del protocolo de laboratorio (por muestra):
    - a. 1 tubo Lysing Matrix E (del kit).
    - b. 1 filtro SPIN<sup>TM</sup> (del kit).
    - c. 1 tubo para recolección (del kit).
    - d. 3 tubos libres de ADNasa de 1.5 mL.
    - e. 1 tubo Falcon de 15 mL.
  3. Descongele la alícuota de la muestra y manténgala en hielo hasta que sea utilizada.
  4. Dosifique en cada uno de los tubos Lysing Matrix E: 480  $\mu$ L de una solución buffer de fosfato (PBS) preparada a un pH 8.0 y 120  $\mu$ L de MT Buffer.
  5. Para cada muestra, agregue 250  $\mu$ L de PPS (solución para la precipitación de proteínas) a cada tubo de centrifuga de 1.5 mL.
  6. Resuspenda la matriz y agregue 1 mL en cada uno de los tubos Falcon de 15 mL.
- **Mezclado con esferas para la ruptura celular**
    1. Mezcle la muestra antes de su uso utilizando un vortex.
    2. Transfiera un volumen de la muestra equivalente a 2 mg ST<sup>1</sup> a un tubo Lysing Matriz E y dosifique la solución de PBS hasta que el volumen total añadido sea de 500  $\mu$ L.<sup>2</sup>
    3. Lleve a cabo el mezclado con las esferas (“bead-beating”) en el instrumento FastPrep-24.
      - a. Tiempo de ejecución: 4 x 40 s.
      - b. Velocidad: 6 m/s.
      - c. Adaptador: El adecuado y requerido por el sistema y muestras.
      - d. ▲ **Etapa crítica** Recuerde montar los tubos de una manera equilibrada, lo cual puede requerir

añadir un tubo extra lleno solo de agua para alcanzar el equilibrio.

- e. ▲ **Etapa crítica** Entre cada intervalo de 40 segundos, las muestras deben mantenerse en hielo durante 2 min para que se enfríen.

- **Precipitación de proteínas y enlazamiento del ADN a la matriz**

1. Centrifugue las muestras a más de 10,000 x g por 10 min, preferentemente a 4 °C.
2. Después de la centrifugación, transfiera los sobrenadantes a tubos de centrifuga de 1.5 mL con PPS y agite 10 veces manualmente.
3. ▲ **Etapa crítica** Mantenga los tubos en hielo hasta que todas las muestras hayan sido procesadas.
4. Centrifugue los tubos a 14,000 x g por 5 min para favorecer la formación del pellet en el fondo de los tubos a partir del precipitado.
5. Transfiera el sobrenadante a los tubos de 15 mL que contiene la suspensión de enlazamiento de la matriz.
6. Invierta manualmente en varias ocasiones por 2 min para permitir el enlazamiento del ADN a la matriz.
7. Coloque el tubo en un soporte por 3-5 min (o hasta que el líquido se clarifique) para permitir la sedimentación de la matriz de sílice.
8. Remueva y descarte hasta 2 x 750  $\mu$ L del sobrenadante, teniendo cuidado de no extraer parte de la matriz.
9. Resuspenda la matriz enlazante en el sobrenadante remanente.

- **Lavado y elución del ADN**

1. Transfiera aproximadamente 750  $\mu$ L de la mezcla a un filtro SPIN<sup>TM</sup> y centrifugue a 14,000 x g por 1 min.<sup>3</sup>
2. Vacíe el tubo de recolección.
3. ▲ **Etapa crítica** Asegure que se haya adicionado etanol al concentrado de SEWS-M.
4. Agregue 500  $\mu$ L del preparado de SEWS-M y cuidadosamente resuspenda el pellet accionando la pipeta o agitando con la punta de la pipeta.
5. Centrifugue a 14,000 x g por 1 min.
6. Vacíe el tubo y uselo de nuevo.
7. Centrifugue a 14,000 x g por 2 min para “secar” la matriz de los residuos de la solución de lavado.

<sup>1</sup> Generalmente es aceptable transferir alrededor de 1-4 mg de ST.

<sup>2</sup> Utilice una punta de pipeta que cuente con un orificio amplio que permita que los gránulos más grandes también sean transferidos.

<sup>3</sup> Si cuenta con más de 750 mL de muestra, este paso debe repetirse.

8. Descarte el tubo de recolección y reemplácelo por uno nuevo.<sup>4</sup>
9. Permita que el filtro SPIN™ se seque por 5 min a temperatura ambiente manteniendo la cubierta del tubo abierta.
10. Resuspenda cuidadosamente la matriz enlazante (encima del filtro SPIN) en 60 µL de DES. Use la punta de una pipeta para agitar la matriz hasta que se disuelva. Asegúrese de no dañar o romper el filtro.
11. Centrifugue a 14,000 x g por 1 min para transferir el ADN eluído a un tubo de captura limpio. Descarte el filtro SPIN.
12. Identifique apropiadamente el tubo, rotulándolo con un marcador resistente a la congelación o con una etiqueta impresa.
13. ■ **Pausa** Almacene el ADN a -20 °C para un almacenamiento a corto plazo y a -80 °C para un almacenamiento a largo plazo.

## 8.3 PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL (qPCR)

### 8.3.1 Consideraciones generales

Aunque las técnicas “de alto rendimiento” tales como los estudio metagénicos y la secuenciación de amplicon (ver Sección 8.4) han revolucionado la forma en la que se investigan las comunidades microbianas, el PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) continua siendo la técnica más sensible para la cuantificación de tipos específicos de ADN. Además, bajo condiciones óptimas, permite la detección de secuencias únicas dentro de las muestras analizadas, aunque estas condiciones se encuentran muy raramente en muestras ambientales debido a la presencia de sustancias inhibitorias para el PCR. Además el qPCR puede usarse para convertir los datos de abundancia relativa obtenidos de la secuenciación de amplicon en cantidades absolutas, aunque ésto no se lleva a cabo con frecuencia.

En los sistemas de tratamiento de aguas residuales, el qPCR puede ser usado para estimar la abundancia total de bacterias (Horz *et al.*, 2005) o para cuantificar bacterias que pertenezcan a grupos taxonómicos específicos (Matsuda *et al.*, 2007) usando sustancias iniciadoras o sondas conocidas como *primers* que identifican regiones conservadas o variables de los genes (16S o 23S del rARN), respectivamente. También puede

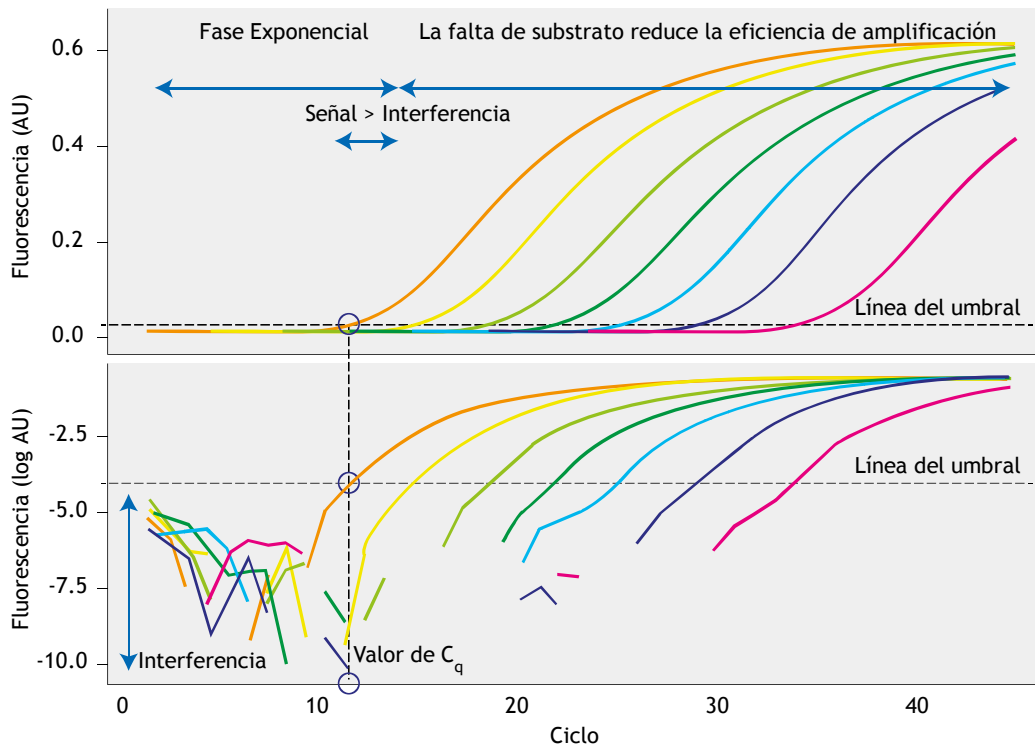
ser usado para estimar la abundancia de bacterias que pertenecen a grupos funcionales específicos, como nitrificadores o bacterias que acumulan polifosfatos, usando sondas que identifican genes funcionales claves (Ge *et al.*, 2015). El qPCR es también útil para identificar el destino de cepas de bioaumentación individuales. Esto se puede hacer usando *primers* que reconozcan secuencias genómicas únicas (Dueholm *et al.*, 2015). El qPCR puede usarse además para monitorear la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (Volkmann *et al.*, 2004) y virus infecciosos (Kitajima *et al.*, 2014). Combinando el qPCR con la transcripción inversa (RT-qPCR), se puede cuantificar la actividad de genes específicos (transcripción) (Nolan *et al.*, 2006), pero este aspecto no será abordado en este libro. El qPCR es un refinamiento del PCR clásico (leer Sección 8.4.3) (Saiki *et al.*, 1985) donde los productos del PCR son detectados después de cada ciclo de PCR (Figura 8.2). La técnica se basa en el hecho de que en el PCR típico, la secuencia objetivo es amplificada aproximadamente dos veces en cada ciclo hasta que alguno de los reactivos se vuelve limitante (Kubista *et al.*, 2006). El ciclo del PCR, para el cual un producto detectable aparece, es conocido como ciclo de cuantificación (Cq) y se relaciona con la abundancia de la secuencia objetivo o de interés en la muestra original (Brzoska y Hassan, 2014). Las tecnologías de qPCR más ampliamente usadas se basan en emisores de fluorescencia que permiten que los productos del PCR sean detectados en tiempo real en termocicladores equipados con detectores de fluorescencia (Brzoska y Hassan, 2014). Dos compuestos químicos diferentes son ampliamente usados para la detección, cada uno con sus ventajas y desventajas (Tabla 8.1). El primero se refiere al colorante del ácido nucleico SYBR Green I, el cual se hace altamente fluorescente al intercalarse en la cadena doble del ADN (dsADN) (Figura 8.3A) (Zipper *et al.*, 2004). El segundo consiste en sondas de hidrólisis de ADN de cadena sencilla (ssADN) que contienen un fluoróforo con una fluorescencia intrínsecamente alta en la terminal 5' y una molécula de extinción (*'quencher'*) en la terminal 3' (Figura 8.3B) (Holland *et al.*, 1991). Las sondas intactas no fluorescen debido a que la proximidad del fluoróforo y el *quencher* provocan una transferencia de energía del fluoróforo al *quencher* debido a la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) (Holland *et al.*, 1991). Durante la etapa de alineamiento, las sondas se enlazan a un segmento de ADN entre los *primers* de

<sup>4</sup> El tubo nuevo es el tubo que será utilizado para el almacenamiento de la muestra por lo que debe ser etiquetado e identificado adecuadamente.

secuenciación y son subsecuentemente hidrolizados durante la elongación por la actividad de la exonucleasa 5'–3' de la polimerasa de ADN. Esto libera al fluoróforo del *quencher*, produciendo una señal fluorescente (Holland *et al.*, 1991). Además de las técnicas anteriores, también existen técnicas menos comunes (Kubista *et al.*, 2006).

Antes de comenzar a trabajar con el qPCR, se recomienda leer las guías con información mínima

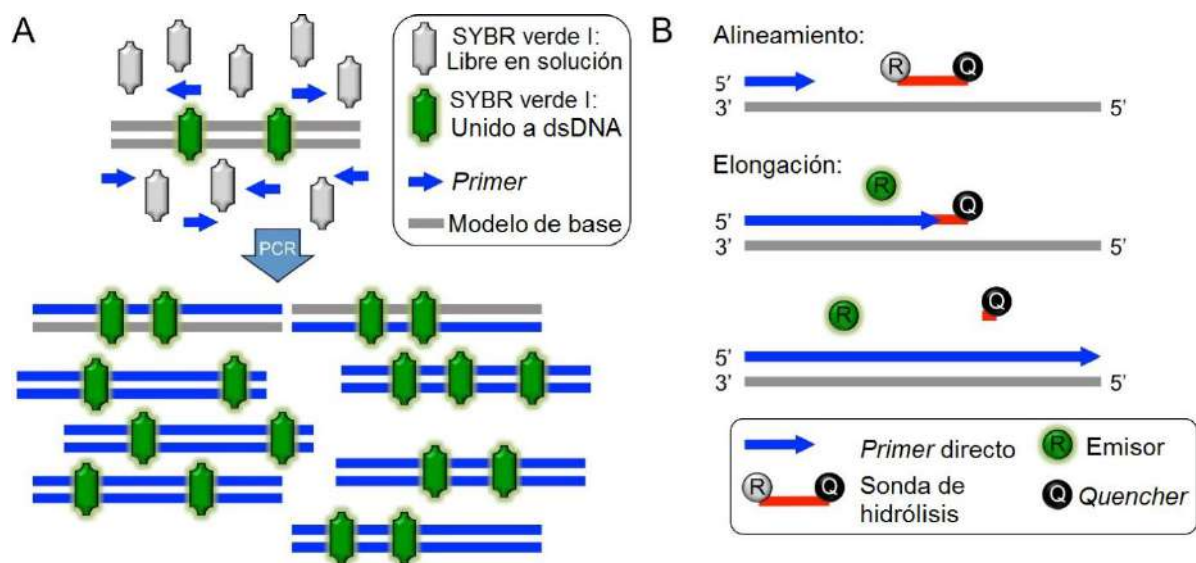
necesaria para la ejecución del PCR cuantitativo en tiempo real (MIQE, por sus siglas en inglés) (Bustin *et al.*, 2009). El objetivo de esta sección es introducir al lector en la teoría básica del qPCR y proporcionar detalles para adaptar los ensayos de qPCR de la literatura a las investigaciones llevadas a cabo en aguas residuales. Se pondrá especial énfasis en los controles requeridos y los errores relacionados con la interpretación de los datos.



**Figura 8.2** Curvas de amplificación de un análisis de qPCR. La figura superior muestra gráficas tradicionales de amplificación y la inferior representa los datos en escala logarítmica. El valor de C<sub>q</sub> se determina del ciclo de qPCR donde la curva de amplificación interseca una línea base ubicada en donde la señal de fluorescencia se encuentra significativamente por encima del nivel de interferencia o de baja definición. La línea base puede identificarse manualmente al graficar la amplificación en escala logarítmica (ver la gráfica inferior), pero con frecuencia se calcula mediante el software de qPCR. Se muestra un ejemplo para la curva de amplificación roja.

**Tabla 8.1** Comparación de SYBR Green I y detección basada en sondas de hidrólisis.

	SYBR Green I	Sonda de hidrólisis
Especificidad	Detecta todas las cadenas dobles de ADN amplificadas, incluyendo productos de reacción no específicos.	Solamente detecta productos de amplificación específicos.
Sensibilidad	Depende de la calidad del kit y del diseño y optimización del <i>primer</i> .	1 – 10 copias.
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede detectar la amplificación de cualquier secuencia de doble cadena de ADN.</li> <li>• No se requieren sondas, lo cual reduce los requerimientos de equipo y materiales y por consiguiente los costos de los análisis.</li> <li>• Se pueden enlazar múltiples colorantes a una única molécula amplificada, lo cual incrementa la sensibilidad para la detección de productos de la amplificación.</li> <li>• Bajos costos relativos de los <i>primers</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para generar una señal fluorescente se requiere una hibridación específica entre la sonda y el objetivo, lo que incrementa la definición y reduce las señales o resultados positivos falsos.</li> <li>• Las sondas pueden ser marcadas con diferentes emisores colorantes distinguibles. Esto hace posible obtener múltiples qPCR en un solo tubo de reacción.</li> <li>• Se elimina el procesamiento posterior al PCR, lo que reduce la labor del ensayo y los costos de materiales.</li> </ul>
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Debido a que SYBR Green I se enlaza a cualquier cadena doble de DNA (incluyendo secuencias de ADN de doble cadena no específicas) este puede generar señales positivas falsas o erróneas.</li> <li>• No puede utilizarse para qPCR múltiples (requiere el uso simultáneo de más de un <i>primer</i>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Una sonda diferente tiene que ser sintetizada para cada secuencia objetivo o de estudio única.</li> <li>• Costo relativamente alto de las sondas de identificación.</li> </ul>



**Figura 8.3** Mecanismos de los emisores comunes usados en qPCR. (A) Ensayo de SYBR Green I. El emisor fluorescente SYBR Green I es una cianina asimétrica con dos sistemas aromáticos. Cuando está libre en solución, el SYBR Green I virtualmente no tiene fluorescencia debido a la vibración de los dos sistemas aromáticos, los que convierten la energía de excitación electrónica en calor que se disipa al solvente adyacente. Sin embargo, cuando el SYBR Green I interactúa con el ADN de doble cadena (dsADN), las vibraciones son restringidas y la cianina asimétrica se hace altamente fluorescente (Nygren *et al.*, 1998). La fluorescencia del SYBR Green I consecuentemente refleja la abundancia total de dsADN. (B) Ensayo basado en la sonda de hidrólisis. La sonda de hidrólisis contiene un colorante emisor fluorescente en la terminal 5' y un colorante *quencher* en la terminal 3' que reduce considerablemente la fluorescencia del emisor de la sonda intacta debido a la transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET). La sonda se alinea con la cadena codificante entre los sitios de unión directo e inverso del *primer*. Durante cada etapa de elongación, la ADN polimerasa se corta y libera el colorante emisor de la sonda. Una vez separados del *quencher*, el colorante emisor emite su fluorescencia característica (Holland *et al.*, 1991). Consecuentemente la fluorescencia del emisor refleja el número total de amplificaciones objetivo o deseadas.

### 8.3.2 Materiales

- **Primers (iniciadores)**

La Tabla 8.2 ofrece una descripción de diversos ensayos relevantes de qPCR aplicados generalmente en el campo del tratamiento de aguas residuales. Los iniciadores o *primers* y las sondas se deben solicitar con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en soluciones concentradas desalinizadas y purificadas por HPLC, respectivamente. Las sondas diseñadas con la combinación del emisor 5'

6-FAM y el *quencher* 3' TAMRA son apropiados para la mayoría de las aplicaciones. Sin embargo, se puede lograr una mayor sensibilidad reemplazando el TAMRA con un *quencher* no fluorescente, tal como el *black hole quencher-1* (BHQ-1) (Biosearch Technologies, USA). El diseño de nuevos ensayos de qPCR requieren habilidades avanzadas de bioinformática que no son cubiertas en el presente libro. Para instrucciones de como diseñar ensayos de qPCR, consulte la literatura (Basu, 2015; Brzoska y Hassan, 2014).

**Tabla 8.2** Ejemplos de ensayos de qPCR generalmente aplicables en el área de tratamiento de aguas residuales.

Objetivo y química <sup>1</sup>	Descripción	Referencia
Mayoría de las bacterias (SH)	Desarrollo y evaluación de un ensayo qPCR universal para la amplificación del gen 16S rARN del dominio bacterial. El ensayo permite la cuantificación de la abundancia bacterial total dentro de una muestra.	(Nadkarni <i>et al.</i> , 2002)
Mayoría de las archaea (SH)	Evaluación de la cobertura de múltiples <i>primers</i> para el gen 16S rARN del dominio Archaea y bacterial. Los <i>primers</i> específicos permiten la determinación de la abundancia relativa de Archaea y bacterias en comunidades microbianas de varios habitats.	(Wang y Qian, 2009)
Mayoría de los hongos (SH)	Diseño y evaluación de un ensayo qPCR universal para la amplificación del gen 18S rARN en silicio e <i>in vitro</i> . El ensayo permite la cuantificación de la abundancia total de hongos dentro de una muestra.	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
Cepas individuales (SH)	Técnica general para el desarrollo de ensayos qPCR específicos para cepas usadas para diseñar un ensayo qPCR para la bio-aumentación de la cepa <i>Pseudomonas monteilii</i> SB3074. El ensayo fue subsecuentemente usado para evaluar la persistencia de la cepa en el lodo activado.	(Dueholm <i>et al.</i> , 2015)
Nitrificación (SH)	Ensayo de qPCR que tiene como objetivo parte de la subunidad alfa del gen de la amonio-monooxigenasa ( <i>amoA</i> ), que es una enzima clave en la oxidación del amonio llevado a cabo por bacterias nitrificantes (AOB) en muestras de suelo.	(Okano <i>et al.</i> , 2004)
Reducción de nitrato (SG)	Ensayos de qPCR que tienen como objetivo la identificación de enzimas reductasas para nitrato protobacteriales enlazadas a membrana ( <i>narG</i> ) y periplásmicas ( <i>napA</i> ) desarrolladas y usadas para determinar su abundancia relativa en varios ambientes.	(Bru <i>et al.</i> , 2007)
Oxidación anaeróbica del amonio (anammox) (SG)	Diseño y aplicación de un ensayo qPCR que específicamente tiene como objetivo la identificación del gen del 16S rARN para determinar su abundancia en suelos de humedales.	(Humbert <i>et al.</i> , 2012)
Degradación de hidrocarburos aromáticos (SH)	Diseño de un ensayo de qPCR que tiene como objetivo el gen <i>bssA</i> , el cual codifica la subunidad $\alpha$ de la <i>bencil succinato sintasa</i> , una enzima clave asociada con la degradación anaeróbica del tolueno y el xileno. El ensayo fue usado para estudiar las fugas de combustibles de tanques subterráneos que afectan las bacterias indígenas degradantes de tolueno.	(Beller <i>et al.</i> , 2002)
Resistencia a antibióticos (SH)	Diseño de ensayos qPCR que tienen como objetivo los genes de resistencia a antibióticos <i>vanA</i> , <i>ampC</i> , y <i>mecA</i> , los cuales están relacionadas con enterococci resistentes a vancomicina (VRE), <i>Enterobacterales</i> resistente a $\beta$ -lactam, y <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la <i>meticilina</i> (MRSA), respectivamente. Los ensayos fueron usados para detectar los genes de resistencia en aguas residuales municipales y de hospitales o clínicas.	(Volkman <i>et al.</i> , 2004)
Virus patógenos transmitidos en el agua (SH)	Ensayos qPCR usados para determinar la abundancia relativa de 11 virus diferentes en los afluentes y efluentes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales.	(Kitajima <i>et al.</i> , 2014)

<sup>1</sup>SG: SYBR Green I; SH: Sonda de hidrolisis.

- **Termociclador en tiempo real**

Los termocicladores en tiempo real pueden obtenerse de un gran número de proveedores, incluyendo Agilent

Technologies (USA), Applied Biosystems Inc. (USA), Bio-Rad (USA), Eppendorf International (Alemania), y Roche Applied Science (Suiza). Existen buenas



experiencias con el uso del sistema qPCR Agilent Mx3005P de Agilent Technologies.

- **Reactivos para qPCR**

Existe una gran abundancia de kits comerciales de qPCR disponibles. Las experiencias con Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix han sido positivas (Agilent Technologies) para ensayos basados en SYBR Green I y con el kit EXPRESS qPCR Supermix (Life Technologies, USA) para ensayos basados en sondas de hidrólisis.

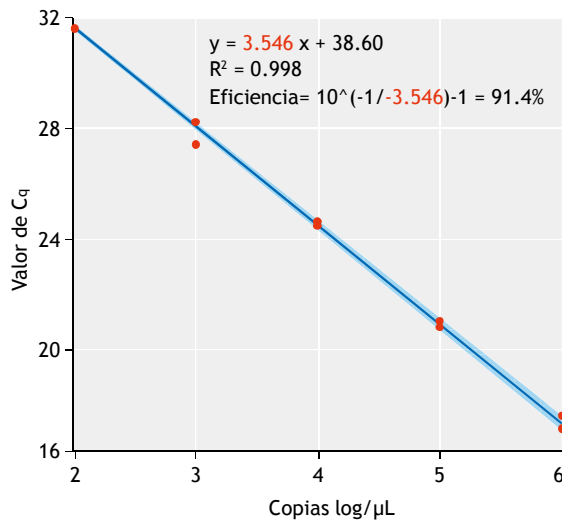
- **Equipo para medir la concentración del ADN**

Se recomienda el uso de un fluorómetro Qubit (Life Technologies, USA) o de una técnica similar basada en sondas para la determinación de las concentraciones de ADN. También se puede utilizar un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, USA), pero esta técnica es más sensible a las impurezas de la muestra (ver Sección 8.2.4).

### 8.3.3 Métodos

#### Preparación de los estándares qPCR

La concentración absoluta de la secuencia de ADN objetivo se determina comparando el valor de  $C_q$  de la muestra con una serie de diluciones estándar de concentración conocida de la secuencia objetivo (amplicon) (Figura 8.4).



**Figura 8.4** Evaluación de la eficiencia de amplificación a partir de la pendiente de la regresión lineal de una serie de diluciones estándar.

Las soluciones estándar se pueden hacer de ADN genómico, de plásmidos o de productos de PCR. Aunque los productos de PCR de la secuencia objetivo se pueden

obtener fácilmente por PCR con los *primers* de qPCR, estos productos frecuentemente conllevan a una serie de diluciones estándares subóptimas. Esto se debe a que los volúmenes pequeños utilizados dificultan la preparación de diluciones reproducibles. Para ensayos de qPCR de rutina, se recomienda el uso de plásmidos linearizados que contengan el amplicon. La linearización es importante ya que la estructura altamente enroscada del ADN del plásmido puede suprimir la amplificación del PCR (Hou *et al.*, 2010). Soluciones estándar linearizadas o lineales de qPCR pueden prepararse fácilmente como se describe más adelante. Los kits y las enzimas deben usarse de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario.

1. Amplifique la secuencia objetivo usando los *primers* del qPCR y una Taq-polimerasa estándar.
2. Clone el producto PCR en el plásmido pCR4-TOPO usando el kit de clonación TOPO TA para secuenciación y células One shot TOP10 de *E. coli* (Life Technologies, USA).
3. Inocule 10 mL de medio LB que contenga  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de kanamicina con un clon positivo y deje crecer el cultivo durante toda la noche (a  $37^\circ\text{C}$ , 200 rpm).
4. Purifique los plásmidos del cultivo usando el Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, USA).
5. Linearice los plásmidos usando el FastDigest ScaI o FastDigest SspI (Thermo Scientific, USA).
6. Purifique los plásmidos linearizados usando el kit Suspension QIAEX II (Qiagen, USA).
7. Determine la concentración de ADN usando un fluorómetro Qubit o un espectrofotómetro NanoDrop.
8. Calcule el peso molecular del plásmido linearizado usando la siguiente ecuación:

MM (masa molecular) =

$$\text{tamaño final del plásmido en pb} \times 607.4 \text{ g mol}^{-1}$$

9. Calcule la abundancia de la secuencia objetivo en la muestra usando la siguiente expresión:

$$\text{Copias de la secuencia objetivo por } \mu\text{L} = \frac{\text{concentración en ng } \mu\text{L}^{-1} \times 10^{-9}}{\times 6.022 \times 10^{23} / \text{MM}}$$

10. Diluya la solución concentrada de amplicon a  $10^9$  copias por  $\mu\text{L}$  con una solución buffer tris 10 mM, con un pH 8.5.
11. Haga una serie de diluciones desde  $10^8$  a  $10^1$  copias por  $\mu\text{L}$  con una solución buffer tris 10 mM, a pH 8.5. Utilice una nueva punta de pipeta y esponja la muestra a un vortex después de cada dilución.

12. Transfiera 100  $\mu\text{L}$  de los estándares a tiras de 8 tubos de PCR de 200  $\mu\text{L}$  y almacene a  $-18^\circ\text{C}$  hasta que sean utilizadas.

- **Preparación de la muestra**

1. Purifique el ADN de las muestras como se describió en “Extracción del ADN” en la Sección 8.2.5.
2. Determine la concentración del ADN usando un fluorómetro Qubit o un espectrofotómetro NanoDrop.

- **Montaje de la reacción de qPCR**

1. Prepare la mezcla maestro de las soluciones patrón del qPCR de acuerdo al protocolo suministrado con el kit de qPCR. La mezcla maestro generalmente se prepara de manera que sea apropiada para muestras de 5  $\mu\text{L}$ .
2. Monte la mezcla maestro en una placa de ensayo de qPCR.
3. Centrifugue la placa de ensayo a 2,200 x g por 5 min.
4. Agregue duplicados de las series de diluciones estándar en las primeras dos columnas de la placa de qPCR.
5. Agregue duplicados de las muestras en la placa de qPCR.
6. Agregue los controles apropiados en la placa de qPCR con base en lo siguiente:
  - a. **NTC (Control sin modelo):** El NTC se prepara con agua libre de ADN en lugar de un ADN modelo. Este sirve como un control general para contaminación con ácidos nucleicos extraños. Cuando se usa SYBR Green, este también sirve como un control importante para la formación de dímeros del *primer*.
  - b. **NAC (Control sin amplificación):** El NAC se prepara sin la polimerasa de ADN. Este funciona como un control para interferencias no deseadas o ruido que no dependen del PCR. Dicha fluorescencia es típicamente causada por el uso de sondas de hidrólisis parcialmente degradadas. Consecuentemente, el NAC no es necesario cuando se llevan a cabo ensayos con SYBR Green.
  - c. **Controles de la muestra diluida:** Estos se usan para determinar si la muestra contiene inhibidores para la PCR. Esto ocurre cuando la muestra diluida produce un número de copias significativamente mayor que los que genera la muestra después de la corrección por el factor de dilución.
  - d. **Muestras dosificadas con amplicon:** Algunas muestras seleccionadas son enriquecidas con una

alta concentración conocida del amplicon y sirven como controles para la presencia de inhibidores para la PCR.

7. Centrifugue la placa de ensayo a 2,200 x g por 5 min.
8. Lleve a cabo el qPCR de acuerdo al protocolo suministrado con el kit del qPCR. Ajuste la temperatura de alineamiento y el tiempo de elongación de acuerdo a la descripción del ensayo.
9. Si esta usando un ensayo con SYBR Green, termine la corrida del qPCR con un análisis de curva de fusión. Este puede identificar la formación del dímero del *primer* y la formación de productos no específicos. Ambos se pueden ver como picos adicionales en gráficos de la primera derivada de las curvas de fusión. Los dímeros del *primer* tienen temperaturas de fusión considerablemente más bajas que la del amplicon objetivo.
10. Cuando se aplica por primera vez un ensayo de qPCR nuevo, se debe validar el ensayo. Para ello, purifique el producto de PCR producido y envíe una pequeña alícuota a una compañía que realice la secuenciación Sanger. De los datos de la secuenciación, confirme que el producto amplificado es realmente la secuencia objetivo. El producto purificado también se puede analizar sobre un gel de agarosa. Se debe observar una banda sencilla a la longitud predicha.

### 8.3.4 Procesamiento de datos

- **Determinación del número de copias de la muestra**

La mayoría de los termocicladores en tiempo real son capaces de llevar a cabo automáticamente el procesamiento de datos y proporcionar el número de copias para cada muestra. Sin embargo, el número de copias también puede ser calculado comparando manualmente los valores de  $C_q$  de la muestra con aquellos de las series estándar de dilución. Para ello, grafique los valores de  $C_q$  de las series de dilución estándar contra el logaritmo ( $\log_{10}$ ) de la abundancia de la secuencia objetivo y posteriormente haga una regresión lineal. La ecuación obtenida puede subsecuentemente utilizarse para determinar la abundancia de la secuencia objetivo a partir de los valores de  $C_q$  (Figura 8.4).

- **Evaluación de la eficiencia de la PCR**

La eficiencia de la PCR describe como la amplificación se desvía de la situación ideal, donde la concentración del amplicon se duplica después de cada ciclo de la PCR. Eficiencias de PCR por debajo del 90% pueden significar un diseño sub-óptimo del *primer*/sonda de la PCR, la presencia de inhibidores de PCR o un pipeteo impreciso

de la muestra o los reactivos. Por otra parte, eficiencias por encima del 100% siempre se originan debido a un pipeteo impreciso. Se ha propuesto como pauta que la eficiencia de la PCR debe estar entre 80 y 115 % para muestras ambientales (Zhang y Fang, 2006).

La eficiencia del PCR puede determinarse con base en la pendiente de la regresión lineal de las series de dilución standard descritas anteriormente (Ec. 8.1, Rasmussen, 2001). La eficiencia calculada asume que todos los estándares y muestras tienen la misma eficiencia de amplificación (Souazé *et al.*, 1996). Esto se puede confirmar usando las muestras diluidas o los controles de las muestras diluidas con amplicon descritas anteriormente.

$$\text{Eficiencia} = 10^{\frac{-1}{\text{pendiente}}} - 1 \quad \text{Ec. 8.1}$$

### 8.3.5. Resultados e interpretación de datos

Los resultados que proporciona un análisis de qPCR es una lista de la abundancia de diferentes secuencias objetivo de cada muestra. Sin embargo, hay algunas consideraciones importantes a tener en mente cuando se analizan los datos, que afectarán significativamente las conclusiones finales (Kim *et al.*, 2013).

- **La extracción de ácidos nucleicos está sesgada**

Las muestras de sistemas de tratamiento de aguas residuales contienen una gran diversidad de microorganismos, los cuales presentan una variación considerable en la arquitectura de su pared celular (Saunders *et al.*, 2015). Algunas de éstas son fáciles de exponer a la lisis, mientras que otras son más difíciles. Consecuentemente se introduce un sesgo significativo al elegir el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos (Albertsen *et al.*, 2015). De manera que puede ser muy difícil comparar la cuantificación absoluta de varios estudios. El protocolo de extracción de ADN descrito en la Sección 8.2.5.2 proporciona resultados que son comparables a aquellos análisis FISH cuantitativos para muestras de tratamientos de aguas residuales.

- **Calidad del ADN modelo**

Las muestras ambientales, tales como aquellas de sistemas de tratamientos de aguas residuales, frecuentemente contienen compuestos que tienen efectos adversos sobre la amplificación por PCR (Bessetti, 2007). Estos pueden ser ácidos húmicos, metales pesados, polisacáridos, compuestos fenólicos o urea. Tales inhibidores pueden ser removidos purificando la muestra usando compuestos adsorbentes, lavados

químicos o purificación con gel (Schriewer *et al.*, 2011). Sin embargo, siempre es importante evaluar empíricamente la remoción de los compuestos inhibitorios, siguiendo los pasos descritos en la Sección 8.3.3 (Stults *et al.*, 2001).

- **Especificidad de ensayos de qPCR de amplio rango**

Los ensayos de qPCR usados en el tratamiento de aguas residuales frecuentemente tienen como objetivo grupos microbianos más que especies o cepas individuales. Los ensayos consecuentemente emplean *primers* y sondas genéricas que se diseñan basándose en la degeneración conocida de la secuencia objetivo. Sin embargo, la degeneración conocida podría no siempre reflejar lo que ocurre en la naturaleza, resultando en una sobreestimación o subestimación de la secuencia objetivo. El uso de *primers* y sondas altamente degenerados crea otro problema adicional. Si la comunidad microbiana está fuertemente enriquecida con organismos específicos, los *primers* perfectos para estos organismos se consumirán rápidamente, mientras que los *primers* de los organismos menos abundantes estarán presentes por más tiempo. Consecuentemente la amplificación tendrá un sesgo hacia los organismos menos abundantes, resultando en una sub-estimación de la abundancia de la secuencia objetivo. Finalmente, pueden existir diferencias en la eficiencia de la amplificación para cada organismo debido a la variación en su contenido de GC (Kim *et al.*, 2013).

- **Amplificación del ADN extracelular (eADN)**

Los procesos biológicos, como el tratamiento de aguas residuales, dependen de poblaciones activas de microorganismos. Sin embargo, el qPCR es incapaz de distinguir entre el ADN que se origina de las bacterias activas y del ADN extracelular (eADN) que se origina de células muertas y lisadas. Como las muestras de tratamiento de aguas residuales contienen cantidades considerables de eADN, éste puede sesgar los datos (Dominiak *et al.*, 2011). Por lo tanto, se debe tener cuidado cuando se obtengan conclusiones acerca de la actividad basadas en los resultados de qPCR.

- **Variación en el número de copias del gen**

Los genomas microbianos muestran una gran variación en el número de copias de genes metabólicamente importantes tales como el gen 16S rARN (Větrovský y Baldrian, 2013). Esto puede sesgar la cuantificación del número específico de bacterias a menos que el número de copias sea conocido. Además, el número de genomas completos por célula puede variar dependiendo del estado de crecimiento de la bacteria (Ludwig y Schleifer,

2000). Si se necesita investigar la abundancia relativa de una especie de bacterias específicas, se recomienda aplicar datos de amplicon de 16S rARN (ver Sección 8.4).

### 8.3.6 Solución de problemas

- **La muestra contiene inhibidores de la PCR**

Hay tres vías para contrarrestar los efectos de sustancias inhibitorias de la PCR. La opción más simple es la dilución de la muestra. Los inhibidores de la PCR son efectivos solamente por encima de una cierta concentración. Sin embargo, la dilución de la muestra también reducirá la señal, causando que el ensayo sea menos sensible. La segunda opción es limpiar el ADN aplicando una purificación adicional. Para esto se requiere de una muestra concentrada, ya que parte del material siempre se pierde durante la purificación. La purificación de un gran número de muestras puede llevarse a cabo en placas de PCR con 96 posiciones utilizando kits de purificación basados en perlas magnéticas. La tercera y solución final es purificar el ADN de la muestra original usando otro kit de purificación optimizado para el inhibidor en cuestión.

- **El diseño del primer o de la sonda no es óptimo**

Nunca debe realizarse un ensayo de qPCR basado en *primers* y sondas deficientes. Por el contrario, diseñe y evalúe nuevas series de *primers* y sondas. Numerosos autores dan pautas para hacer esto adecuadamente (Basu, 2015; Brzoska y Hassan, 2014).

- **Pipeteo impreciso de la muestra y los reactivos**

La calibración imprecisa de las pipetas es perjudicial para el qPCR. Se recomienda mantener una serie de pipetas exclusivamente dedicadas al qPCR y verificar su calibración regularmente. También se recomienda el uso de pipetas de distribución múltiple ya que éstas simplifican el manejo y preparación de las muestras. Finalmente, es una buena idea revisar la técnica de uso de la pipeta antes de llevar a cabo el qPCR.

### 8.3.7 Ejemplo

Se puede lograr una mayor degradación de contaminantes específicos mediante la dosificación de cepas bacterianas catabólicamente relevantes al lodo activado en las PTARs (El Fantroussi y Agathos, 2005). Esto se conoce como bioaugmentación. Una bioaugmentación exitosa requiere que las cepas introducidas sean capaces de desarrollarse y reproducirse en el nuevo ambiente (Thompson *et al.*, 2005). Para ello,

el qPCR puede aplicarse para evaluar la persistencia de las cepas de bioaugmentación *in situ*. Se puede desarrollar un ensayo qPCR específico para la cepa de interés basado en secuencias genómicas únicas para las cepas de bioaugmentación. La abundancia de las cepas puede subsecuentemente ser determinada usando el ADN extraído de los lodos activados a diversos tiempos después de la adición de la cepa de bioaugmentación (Dueholm *et al.*, 2015). Aquí mostramos un ejemplo de como el qPCR se ha utilizado para evaluar la persistencia de la bioaugmentación en cepas de *Pseudomonas monteilii* SB3078 y SB3101, las cuales son usadas para la degradación de hidrocarburos aromáticos (Dueholm *et al.*, 2014; 2015).

#### 8.3.7.1 Muestras

La cepa de bioaugmentación *P. monteilii* SB3078 o SB3101 se introdujo en 100 mL de lodo activado fresco obtenido de la PTAR Aalborg East con una abundancia de 1 % sobre la base del número de células. Se estimó aproximadamente que una concentración de sólidos suspendidos (SS) de 1 g L<sup>-1</sup> (de la muestra de lodos activados) o una densidad óptica DO<sub>660</sub> nm (para un cultivo puro de *Pseudomonas*) corresponden a aproximadamente 10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup> (Frølund *et al.*, 1996). Se agregó benceno a una concentración de 10 µg mL<sup>-1</sup>. Los frascos de cultivo fueron sellados e incubados a 25°C y 150 rpm, por 4 días. Los frascos se abrieron cada 12 h por 30 min para permitir la evaporación de los niveles traza de benceno remanentes y la sedimentación de las partículas de lodo. 50 mL del agua efluente fueron entonces removidas y reemplazadas por 50 mL del agua residual primariamente establecida, simulando un tiempo de retención hidráulico de 24 h. Se recolectaron muestras para la extracción de ADN y se reintrodujo benceno a 10 µg mL<sup>-1</sup>. Los frascos se volvieron a sellar y se continuó la incubación (Dueholm *et al.*, 2015). El ADN fue extraído esencialmente como se describió en la Sección 8.2.

#### 8.3.7.2 Preparación de la reacción de qPCR

1. Prepare la mezcla de la reacción de qPCR como se describe a continuación. Los *primers* y la sonda ambos tienen como objetivo las secuencias de las cepas SB3078 y SB3101.

Solución	Concentración final	Por reacción (20µL)	100 x reacciones
Supermezcla EXPRESS qPCR	1 ×	10 µL	1,000 µL
ROX (25 µM)	50 nM	0.04 µL	4 µL
Primer directo (100 µM)	500 nM	0.10 µL	10 µL
Primer inverso (100 µM)	500 nM	0.10 µL	10 µL
Sonda de hidrólisis (100 µM)	200 nM	0.04 µL	4 µL
Agua DEPC	-	4.72 µL	472 µL
Alícuota	-	15 µL	-

- Monte las mezclas maestras en una placa de ensayo qPCR y agregue 5 µL de las muestras y controles (ver descripción previa).
- Centrifugue la placa de ensayo a 2,200 × g por 5 min.
- Corra el qPCR según el siguiente programa:
  - 50 °C por 2 min (incubación UDG).
  - 95 °C por 2 min.
  - 45 ciclos de:
    - 95 °C por 15 s.
    - 60 °C por 1 min.

### 8.3.7.3 Resultados

Se comienza evaluando la eficiencia de la amplificación. Los valores de C<sub>q</sub> de las series de dilución estándar se graficaron en función del logaritmo del número de copias y entonces se llevó a cabo la regresión lineal. Así, se obtuvo la ecuación de ajuste siguiente:

$$y = -3.349 x + 39.80; R^2 = 1$$

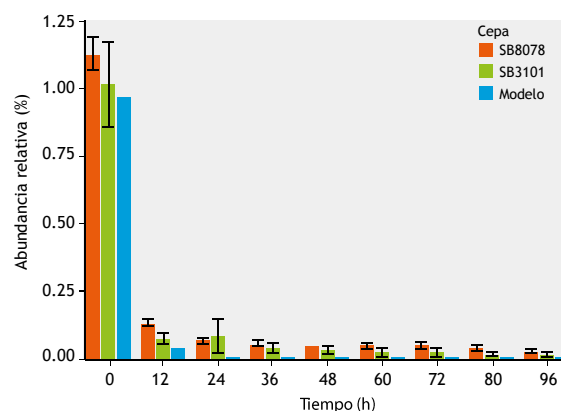
Se calculó la eficiencia de la pendiente como:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1 = 10^{(-1/-3.349)} - 1 = 98.9 \%$$

Ésta estuvo dentro del régimen aceptable para muestras ambientales de 80-115 % (Zhang y Fang, 2006).

Después se evaluaron los controles. Los controles NTC y NAC no se amplificaron en los 45 ciclos. Esto confirma que no había contaminantes amplificables en los reactivos y que las sondas eran estables, respectivamente. También se analizó una muestra que contenía ADN extraído de aguas residuales sin tratar. Este control no se amplificó tampoco, confirmando la especificidad del ensayo de qPCR. Finalmente, se investigó la amplificación de algunas muestras diluídas.

Estas produjeron resultados similares a las muestras sin diluir, confirmando el efecto no significativo de los inhibidores. La Figura 8.5 muestra los resultados obtenidos.



**Figura 8.5** Persistencia de *P. monteilii* SB3078 y SB3101 en lodos activados operados como un reactor batch secuencial. La abundancia relativa de las cepas de bioaumentación se determinó usando el ensayo de qPCR específico para la cepa. Los datos modelados representan la disminución teórica en células que sería observada si no hubiera crecimiento neto y si todas las células de bioaumentación fueran planctónicas. El volumen ocupado por el material sólido fue calculado considerando el índice volumétrico de lodos diluido y esta información se usó junto con el tiempo de retención hidráulico para calcular la velocidad a la cual las células planctónicas fueron eliminadas hidráulicamente.

El ensayo de qPCR mostró que aproximadamente 90% de las cepas de bioaumentación dosificadas se perdieron en las primeras 24 h. Probablemente esto se debió a la eliminación de las células planctónicas con el agua del efluente, ya que esta es desplazada por agua fresca cada 12 h. Las células de bioaumentación remanentes se estabilizaron dentro del sedimento y fueron capaces de sobrevivir durante el experimento (4 d). Además los datos mostraron que la cepa SB3078 fue más persistente que la SB3101 en el lodo activado.

## 8.4 SECUENCIACIÓN DEL AMPLICON

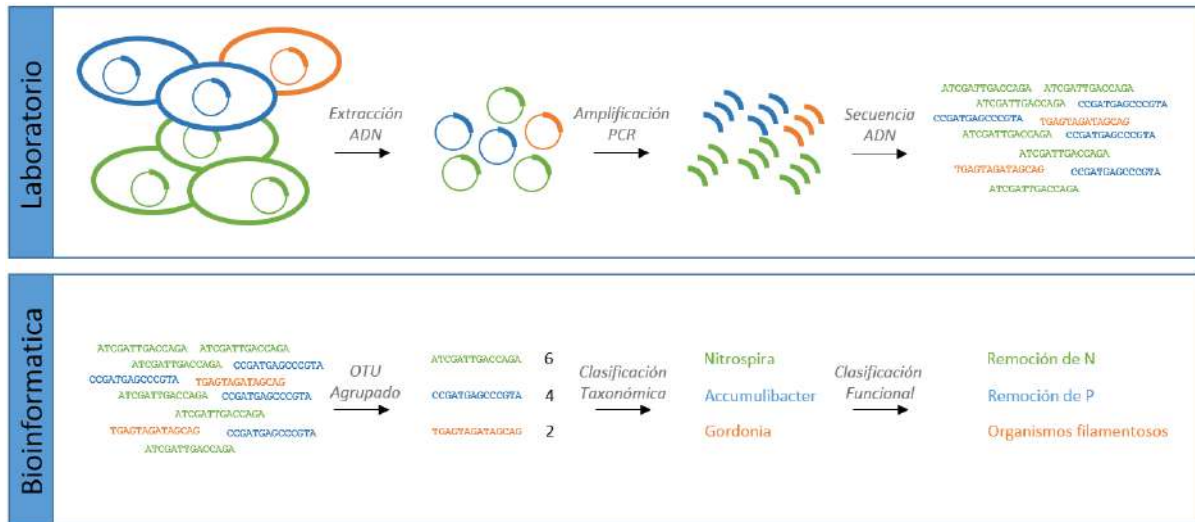
### 8.4.1 Consideraciones generales

La primera etapa para tratar de entender como las bacterias en los lodos activados impactan el desempeño de una planta de tratamiento de aguas residuales, es tener una panorámica de la comunidad bacteriana. Esto implica identificar las bacterias, su abundancia y conocimiento acerca de lo que ellas están haciendo. Los avances en la



secuenciación del ADN han hecho posible identificar a las bacterias con una alta resolución y rendimiento leyendo los genes ARN 16S ribosomal (rARN) de la bacteria y usándolos como “huellas” (*fingerprints*) para su identificación molecular.

Esta vía es llamada secuenciación de amplicon del 16S rARN y consta de un número de etapas que se muestran en la Figura 8.6



**Figura 8.6** Etapas básicas en el análisis de comunidades microbianas usando la secuenciación de amplicon 16S rARN.

La primera etapa es la “extracción del ADN”, por medio de la cual el ADN genómico de todas las bacterias presentes en una muestra se extrae y se purifica (ver Sección 8.2). Después, los genes 16S rARN se amplifican por “la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)” y se preparan para la secuenciación. Entonces los amplicones de los genes 16S rARN son leídos, o el “ADN es secuenciado” usando un instrumento de secuenciación de última generación. Los resultados son las secuencias de todos los genes 16S rARN presentes en la muestra. Estas secuencias se organizan en grupos o unidades taxonómicas operacionales que representan cada una una especie, y se cuenta entonces el número relativo de genes 16S rARN que pertenecen a cada grupo. Cada grupo de especies se identifica mediante “Clasificación Taxonómica” comparando la secuencia del gen 16S rARN representativa de cada grupo, con las secuencias de bases de datos de bacterias conocidas. El resultado es una tabla que contiene el nombre de cada especie en la muestra y su abundancia relativa. Esta tabla es la base para visualizar y analizar la comunidad bacteriana. El nombre de las especies puede usarse también para relacionarlo con información funcional disponible en la literatura o en bases de datos públicas, tales como la base de datos MiDAS, midasfieldguide.org

(McIlroy *et al.*, 2015) (ej. organismos nitrificadores, filamentosos, desnitrificantes, acumuladores de fósforo, entre otros).

En las Secciones 8.4.2 a 8.4.7, se describirá en detalle cada etapa de la secuenciación del amplicon 16S rARN. Las descripciones se basan en la secuenciación del amplicon 16S rARN usando la plataforma Illumina. Sin embargo, la idea básica es la misma para todas las plataformas de secuenciación.

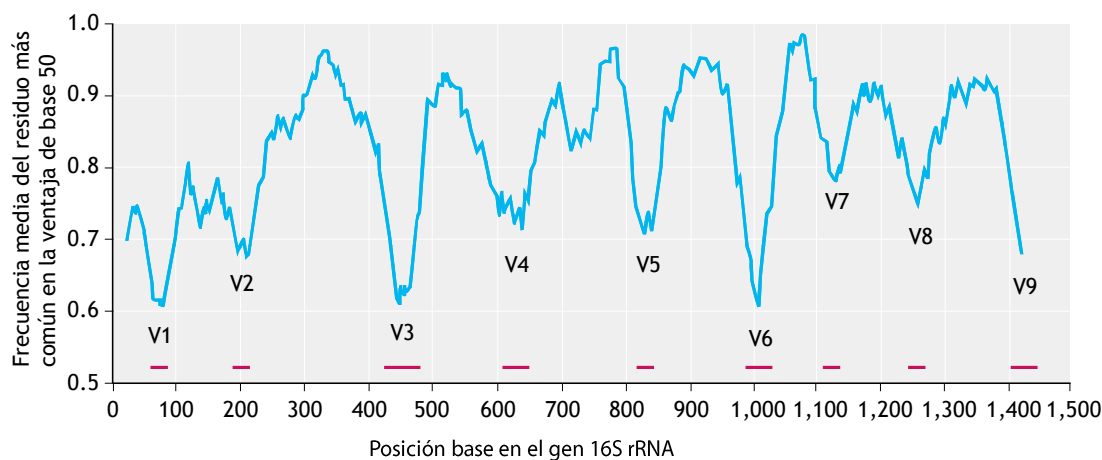
## 8.4.2 El gen 16S rARN como un gen marcador filogenético

Un gen marcador filogenético codifica una función esencial, la cual comparten todos los organismos a identificar que no han sufrido una transferencia lateral de genes. Además, el gen marcador también tiene que tener tanto posiciones altamente conservadas de su proceso evolutivo como posiciones altamente variables en su secuencia de nucleótidos. Las partes conservadas hacen posible localizar el gen objetivo con un PCR y se necesitan para un análisis filogenético correcto, mientras que las partes variables posibilitan distinguir entre

organismos diferentes e investigar sus relaciones (filogenia).

Los genes ribosomales han sido seleccionados para llevar a cabo el análisis filogenético desde que Woese y Fox los usaron para mostrar la división de la vida en tres reinos separados en 1977 (Woese y Fox, 1977; Pace *et al.*, 2012). Al día de hoy, el gen 16S rARN es el gen marcador filogenético más utilizado en estudios ambientales de diversidad bacteriana. El gen 16S rARN codifica un fragmento del ARN que conforma una parte funcional del ribosoma bacteriano. Los ribosomas son

fábricas de proteínas presentes en todos los organismos celulares y se desarrollaron temprano en la evolución. Las regiones conservadas son cruciales para una correcta estructura y función del ribosoma, lo que significa que la mayoría de las mutaciones en estas regiones son seleccionadas fuertemente contra ellas. Las regiones variables tienen más libertad para el cambio, y las mutaciones ocurren mucho más frecuentemente (Madigan y Martinko, 2006). Por lo tanto, el gen 16S rARN contiene varias islas conservadas con regiones variables entre ellas, llamadas regiones variables 1 a 9 (V1 a V9) (Ashelford *et al.*, 2005); ver Figura 8.7.



**Figura 8.7** Variabilidad en la composición de la secuencia a lo largo del gen 16S rARN (adaptado de Ashelford *et al.*, 2005).

Esto hace al gen 16S rARN un excelente gen marcador ya que puede ser identificado íntegramente o en fragmentos, lo que proporciona alguna flexibilidad técnica. El gen 16S rARN ha sido usado como un gen marcador por varios años, y el conocimiento acumulado se compila en bases de datos extensas empleadas para los datos de genes 16S rARN y para determinar la afiliación filogenética de nuevos genes 16S rARN y asignarlos a un grupo dentro de la taxonomía bacteriana. Usualmente es posible determinar la taxonomía de las bacterias al nivel de especies mediante su secuencia del gen 16S rARN. La ubicuidad y resolución del gen 16S rARN, junto con los recursos de las bases de datos, hacen de éste el gen marcador preferido para el análisis de las comunidades bacterianas.

Aunque en una menor frecuencia, también se usan otros genes marcadores para el análisis de las comunidades bacterianas, y usualmente para obtener una mayor resolución filogenética, por ejemplo al nivel de las cepas. Es común que estos genes marcadores tengan una composición más variable, lo que proporciona una

mayor resolución filogenética. Sin embargo esto significa que ellos solamente pueden utilizarse para identificar subgrupos específicos de bacterias. Ejemplos de tales genes marcadores son el *amoA* para identificar organismos oxidantes de amonio (AOO) y el *mcrA* en el proceso de metanogénesis; ver también la Sección 8.3 acerca del qPCR. Los principios para analizar estos otros genes marcadores son similares al gen 16S rARN, aunque los genes que codifican las proteínas, como el *amoA*, también pueden analizarse al nivel de secuencia de aminoácidos. Para la identificación al nivel de las cepas, se necesitan secuencias de nucleótidos, pero ellas deben estar alineadas con respecto al codón según el alineamiento de los aminoácidos (Juretschko *et al.*, 2000).

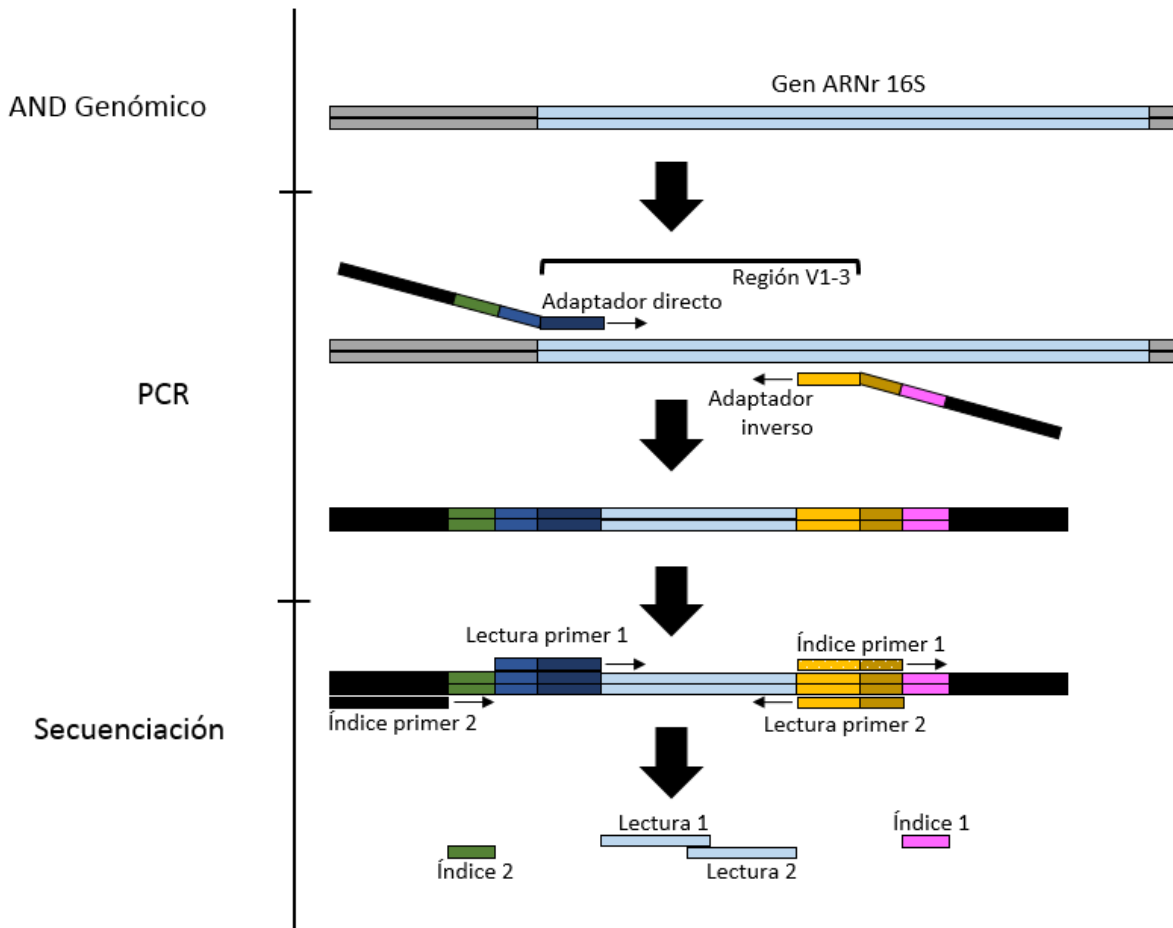
### 8.4.3 Amplificación por PCR

La primera etapa de la secuenciación del amplicon 16S rARN es la amplificación de los genes 16S rARN mediante PCR.

### 8.4.3.1 Reacción PCR

La PCR se usa para amplificar selectivamente el gen 16S rARN a partir del ADN genómico, de manera que hay

suficiente material que posibilita hacer el análisis con el secuenciador del ADN (Figura 8.8).



**Figura 8.8** Las etapas básicas en la amplificación y secuenciación mediante PCR del gen 16S rARN. En gris se representa el ADN genómico y en azul se representa el gen 16S rARN. Las partes coloreadas de los adaptadores y primers (iniciadores) representan diferentes secuencias funcionales, y éstas se describen en la Sección 8.4.11. Las flechas significan la dirección de la elongación/secuenciación.

La PCR usa una enzima polimerasa termoestable para copiar el ADN. La polimerasa copia el ADN usando pequeños pedazos de ADN sintéticos (15 – 25 pares de bases: pb), llamados *primers*, como punto de inicio de la amplificación. Al analizar los genes 16S rARN, los *primers* o cebadores se diseñan para acoplar selectivamente las partes conservadas del gen 16S rARN, el cual posibilita una amplificación selectiva de la región seleccionada. Durante la PCR, se usan ciclos de calentamiento y enfriamiento para posibilitar la amplificación. Primero, el dsADN es desnaturizado por calentamiento, separando las dos bandas una de otra. Segundo, la reacción se enfría para permitir que los

*primers* se alineen a los sitios objetivo del ADN. Tercero, se incrementa la temperatura de nuevo para proporcionar una temperatura óptima para la actividad de la enzima polimerasa, la cual comienza a copiar el gen 16S rARN al extender el *primer*. Un ciclo crea dos copias del gen 16S rARN de una copia original, y las copias pueden a su vez funcionar como plantillas o moldes. El ciclo se repite 25 – 35 veces durante la PCR, lo que resulta en una amplificación exponencial del gen 16S rARN. El gen copiado producto de la amplificación del PCR se llama amplicon y de aquí el nombre de secuenciación del amplicon 16S rARN. Además del ADN, los *primers* y la polimerasa, la reacción contiene los nucleótidos que son

incorporados en el nuevo ADN junto con buffers y otros aditivos (sales de  $Mg^{2+}$ , etc.) que proporcionan las condiciones óptimas para el alineamiento de los *primers* y la actividad polimerasa. Para una discusión detallada de los principios del PCR, ver la publicación de Green y Sambrook (2012).

Otro papel importante del PCR es posibilitar la secuenciación de los amplicones del 16S rARN. Esto se logra uniendo un adaptador de secuenciación al final de los *primers* usados en el PCR. Por tanto el adaptador se une a todos los amplicones de 16S rARN que se producen. El adaptador consiste de un pedazo sintético de ADN (de aproximadamente 50 pb), el cual tiene diferentes componentes “activos” (ver Sección 8.4.11). Estos componentes posibilitan que la máquina secuenciadora capture los amplicones 16S rARN, para comenzar a leerlos y reconocer de cual muestra se origina cada amplicon 16S rARN, lo que se conoce como definición de códigos de barras o indexación. La idea es etiquetar todos los amplicones 16S rARN de una muestra con el mismo código de barras. Esto hace posible que un gran número de muestras diferentes se mezclen (multiplexación) y sean leídas al mismo tiempo en el secuenciador del ADN y que aún así, posteriormente, sea capaz de separar los datos de las muestras individuales (de-multiplexación) (Illumina Inc., 2015; Caporaso *et al.*, 2010).

El producto final después de la PCR se llama biblioteca (librería) de secuenciación de amplicones de ARNr 16S. Hay diferentes estrategias que se pueden usar cuando se preparan bibliotecas de secuenciación del amplicon 16S rARN, pero la idea general es la misma. La idea descrita previamente usa una sola etapa para amplificar y unir los adaptadores; otras estrategias usan dos PCRs separados. Estas estrategias tienen pros y contras con respecto al costo, tiempo y requerimientos de la secuenciación. Actualmente, solo es posible secuenciar fragmentos largos del gen 16S rARN con la estrategia descrita de PCR de una etapa. Esto incluye el fragmento V1-3 comúnmente usado en todos activados (Albertsen *et al.*, 2015).

### 8.4.3.2 Sesgos de la PCR

En la realización de la PCR se pueden introducir diferentes tipos de sesgos, los cuales afectarán la estructura final observada de la comunidad. El sesgo del *primer* es uno de los más significativos, y esto se discutirá a continuación (Albertsen *et al.*, 2015). La desviación de la PCR es un sesgo introducido por eventos estocásticos en los primeros ciclos del PCR donde

relativamente pocas moléculas están involucradas en la replicación o simplemente por variaciones en la manipulación reactivo/muestra (pipeteo, posición en el termociclador, etc.). El sesgo en la selección del PCR se debe a variaciones en las eficiencias de la amplificación causadas por propiedades de la secuencia de nucleótidos del gen 16S rARN (Polz *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2014). Para reducir el impacto de la selección y el desvío de la PCR se realizan réplicas de las reacciones del PCR, el número de ciclos de PCR se mantiene en un mínimo y la cantidad del ADN de referencia debe ser de alrededor de 10 ng. La mayoría de los protocolos estándar de secuenciación de amplicones han optimizado estos parámetros.

### 8.4.3.3 Selección del primer

Como se mencionó previamente, el *primer* busca identificar partes conservadas del gen 16S rARN. Sin embargo, es inevitable tener alguna variabilidad en las partes “conservadas” del gen 16S rARN. Por lo tanto los *primers* serán más afines con algunas bacterias que con otras y para algunas de ellas no reaccionarán en lo absoluto (Klindworth *et al.*, 2013). Esto introduce un sesgo significativo del *primer* para todo el análisis, lo cual debe tenerse en cuenta.

Cuando se analiza el gen 16S rARN sería ideal secuenciar el gen completo (aproximadamente 1600 pb) ya que este proporciona la máxima resolución filogenética. Sin embargo, debido a limitaciones en la tecnología de secuenciación Illumina, actualmente sólo es posible secuenciar fragmentos de hasta 550 pb del gen 16S rARN.

Como una consecuencia del sesgo del *primer* y la limitación de la longitud de lectura, muchos sets o series de *primers* han sido diseñados para tener como objetivos diferentes regiones variables del gen bacteriano 16S rARN. La mayoría de los *primers* comúnmente utilizados tienen como objetivo las regiones V1-3, V4 y V3-4 (Albertsen *et al.*, 2015). Las series de *primers* tienen diferentes sesgos, y cuando se selecciona una serie de ellos deben considerarse diferentes aspectos.

- a. Las series de *primers* deben tener el menor sesgo posible con respecto a las bacterias presentes en las muestras de interés. Aunque es posible tener una idea del posible sesgo del *primer* si se lleva a cabo un análisis *in silico* (Klindworth *et al.*, 2013), siempre se recomienda evaluar la serie de *primers* llevando a cabo una secuenciación.
- b. Tanto como sea posible, la serie de *primers* debe ser la misma que la utilizada en estudios similares con

los que se desea comparar los análisis. La base de datos MiDAS, la cual intenta resumir todo el conocimiento actual relacionado con las bacterias más relevantes presentes en los sistemas de lodos activados, está basada en *primers* que tienen como objetivo la región V1-3. Esto se debe a que proporciona una buena resolución y una amplia cobertura de las bacterias que son responsables de los procesos de interés en los sistemas de lodos activados (Albertsen *et al.*, 2015).

Para muestras de sistemas de lodos activados especializados es una buena idea evaluar o probar otras series de *primers*. Por ejemplo, la mayoría de las bacterias anammox no reaccionan de manera óptima con las series de *primers* V1-3 y por ello es mejor usar las series de *primers* V4 (Laureni *et al.*, 2015; Gilbert *et al.*, 2014). También, si se desea, es posible diseñar nuevos *primers*, pero que esto requiere de un amplio y vasto conocimiento y experiencia de los ecosistemas y la filogenética de las comunidades microbianas, así como también un arduo trabajo de laboratorio para su optimización y validación.

## 8.4.4 Secuenciación del ADN

### 8.4.4.1 Plataforma de secuenciación

Una vez que las bibliotecas de amplicon del 16S rARN hayan sido preparadas, existen diferentes opciones para la secuenciación del ADN. Sin embargo, cada método emplea estrategias marcadamente diferentes para la secuenciación, lo que significa que los datos obtenidos pueden ser apropiados para diferentes propósitos y necesidades. Con respecto a la secuenciación del amplicon de 16S rARN, los criterios más importantes son la longitud de la secuenciación (> 200 pb), la calidad de la secuenciación (< 1 % errores), el rendimiento (> 10,000 lecturas por muestra), tiempo de ejecución requerido, el costo y cuán fácil es la preparación de la biblioteca. Actualmente, la plataforma Illumina MiSeq es el método preferido, ya que cubre todos estos criterios. La Illumina MiSeq posibilita el análisis de hasta 400 bibliotecas de amplicones de 16S rARN (50,000 lecturas por muestra) en una sola secuenciación (56 h). El MiSeq actualmente puede secuenciar 301 pb de cada extremo de los amplicones de 16S rARN. Esto también se denomina secuenciación de pares finales o emparejamientos finales (PE, por sus siglas en inglés) y cada una de las dos secuencias de 301 pb se denomina 'lecturas'. Durante el procesamiento de datos, las dos lecturas se combinan en sus extremos superpuestos para obtener una longitud máxima de aproximadamente 550 pb. Para usos más

especializados, los cuales requieran longitudes de lecturas más largas o menores tiempos de ejecución, otras plataformas son más apropiadas, como por ejemplo, Pacbio RS II (Pacific Biosciences), el Ion Proton System (Thermo Fisher Scientific Inc), o el MinION (Oxford Nanopore Technologies). Tenga en cuenta que cada plataforma de secuenciación requiere un protocolo de preparación de librerías diferente.

### 8.4.4.2 Alcance de la secuenciación

Cuando se realiza una secuenciación de amplicon, es importante tener un estimado aproximado del alcance, extensión o profundidad que se requiere de la secuenciación (número de lecturas por muestra) para alcanzar los objetivos y dar respuesta a los problemas planteados en el diseño experimental. Para análisis generales de comunidades bacterianas que tienen como objetivo el V1-3 del gen 16S rARN en lodos activados, rutinariamente se usan 50,000 lecturas de PE por muestra. Esto se hace sobre la base de que frecuentemente se comparan comunidades muy similares por lo que es importante hacer estimaciones robustas de la abundancia de los miembros individuales de la comunidad. Una regla a seguir, es tener al menos 100 lecturas de la bacteria de interés. Por debajo de 100 lecturas el resultado final es incierto debido a variaciones técnicas y biológicas (Albertsen *et al.*, 2015). Si se necesita una mayor resolución, la mejor opción es incluir más réplicas biológicas. Sin embargo, si ésta no fuera una opción, también se puede hacer una secuenciación más profunda. Los lodos activados contienen miles de bacterias diferentes, y lo más importante, 100 de éstas son responsables de más del 70 % de la abundancia total de la comunidad (Saunders *et al.*, 2015). Como promedio cada una de estas 100 especies componen más del 0.5 % de la comunidad total. Para obtener más de 100 lecturas de cada una de estas especies, por cada muestra se necesitan al menos 20,000 lecturas procesadas mediante bioinformática o más de 30,000 lecturas de PE en muestras en bruto, dependiendo de la calidad de la secuenciación. Debe tomarse en cuenta que el costo de la secuenciación no es usualmente la parte más cara del análisis, por lo tanto frecuentemente se prefiere tener la seguridad de que se han secuenciado suficientes lecturas.

## 8.4.5 Procesamiento bioinformático

### 8.4.5.1 Software disponibles

Hasta el momento no se ha definido un procedimiento estándar riguroso para la manipulación de los datos de la secuenciación del 16S rARN, y probablemente esto no

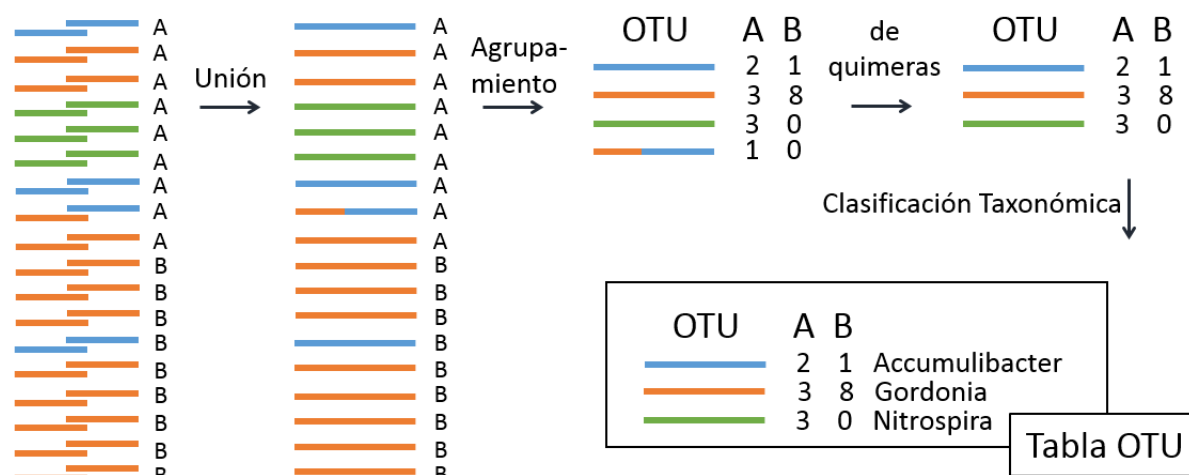


ocurra tan rápido debido a que éste es un campo de rápido desarrollo. Sin embargo, la idea general es la misma y se describe en la Figura 8.9.

Muchos grupos de investigación acostumbran a realizar códigos y flujos de trabajo para el procesamiento de los datos, y algunos han hecho paquetes de software que pueden realizar casi todo automáticamente. Los más populares son QIIME (Caporaso *et al.*, 2010), Mothur (Schloss *et al.*, 2009) y UPARSE (Edgar, 2013). Sus configuraciones y supuestos difieren inclusive entre las distintas versiones de los mismos software, produciendo siempre resultados un tanto diferentes, aún de la misma secuencia de datos. Por lo tanto, los resultados de diferentes paquetes y versiones de software no deben ser comparados. Generalmente se aconseja analizar todos los datos de un experimento con un paquete de software en una sesión y repetir el proceso si se agregan nuevos datos o si cambia la configuración. En los párrafos siguientes se hacen algunas consideraciones generales acerca del procesamiento bioinformático.

### 8.4.5.2 Datos generados

El producto principal del secuenciador Illumina MiSeq es un par de archivos (ficheros) de cada muestra. Cada par de ficheros contiene todas las lecturas 1 (Read1) de las lecturas apareadas en el *primer* fichero y todas las lecturas 2 en el segundo fichero (Read2). Los ficheros son archivos tipo o con la extensión *fastq* (.fastq or .fq), las cuales son archivos o documentos de texto simples con reglas específicas para enlistar la información de la secuencia (Figura 8.10). Cada lectura en un archivo *fastq* tiene cuatro líneas: *i*) el identificador (ID) de la lectura específica comenzando con '@', *ii*) las letras de la secuencia cruda de la lectura específica, *iii*) el signo '+' que funciona como un campo de descripción, pero que a menudo se deja en blanco o vacío, y *iv*) puntuaciones *Phred* de calidad denotadas por letras ASCII para cada base en la lectura (Cock *et al.*, 2010).



**Figura 8.9** Etapas básicas del procesamiento bioinformático de los datos de 16S rARN mediante la plataforma Illumina MiSeq. Los colores significan secuencias que tienen > 97 % de semejanza. Las letras A y B indican de que muestra es la secuencia.

```
1 @M00878:94:000000000-AGD1E:1:1101:18594:12300 1:N:0:19
2 ATAGTACGTACGGTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCGGGTACGTACGTTCGATCCGTA
3 +
4 CCCCCGGGGGGGGFEFGGGGGGGFGCCFGEFGGGGGFGGFDGGGGGGGGDFCFCCDF
5 @M00878:94:000000000-AGD1E:1:1101:5140:12419 1:N:0:19
6 GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACGGATAAAGAGCT
7 +
8 CCCCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
9 @M00878:94:000000000-AGD1E:1:1101:4381:16236 1:N:0:19
10 GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGCGGAACAAACAGA
11 +
12 CCCCCGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
```

Figura 8.10 Ejemplo de una fila de un archivo fastq con tres lecturas. Las lecturas están truncadas para mejor legibilidad.

#### 8.4.5.3 Puntuaciones de calidad y filtrado

La puntuación de calidad Phred es una medida de la probabilidad de que una base específica contenga un error ( $Q_{10} = 10\%$ ,  $Q_{20} = 1\%$  y  $Q_{30} = 0.1\%$ ) (Cock *et al.*, 2010). Para la secuenciación del amplicon 16S rARN, se prefieren los niveles  $Q_{20}$  o  $Q$  más altos (por ej.,  $Q_{30}$ ). La calidad se puede evaluar graficando los puntajes de calidad Phred, y la tasa de error de un estándar interno. Para la secuenciación de  $2 \times 301$  pb PE en MiSeq de una librería de alta calidad de amplicones, la calidad promedio está usualmente por encima de  $Q_{30}$  para las primeras 250 pb de lecturas 1 (Read1) y de 200 pb de lecturas 2 (Read2), y después de esto, la calidad de las lecturas usualmente se deteriora (Figura 8.11). Si la mayoría de la calidad de las lecturas está por debajo de  $Q_{20}$ , puede haber un error en la secuenciación. La mala calidad de los datos puede eliminarse mediante recortes y filtración de datos. Frecuentemente si los tramos más largos de una lectura están por debajo de  $Q_{20}$ , los tramos se recortan desde el extremo 3'. Al secuenciar amplicones de la región V1-3 de 16S rRNA, las lecturas que tienen menos de 275 pb después del recorte se descartan, ya que no son adecuados para llevar a cabo la fusión.

#### 8.4.5.4 Fusionando lecturas pareadas

Después de llevar a cabo una filtración de calidad de los datos, las lecturas emparejadas en los datos de alta calidad remanentes se fusionan para crear una secuencia continua de genes 16S rARN con una longitud de 250 – 550 pb dependiendo de las regiones variables objetivo. Después de la filtración y la fusión, generalmente existen alrededor de 70% de lecturas restantes dependiendo de la

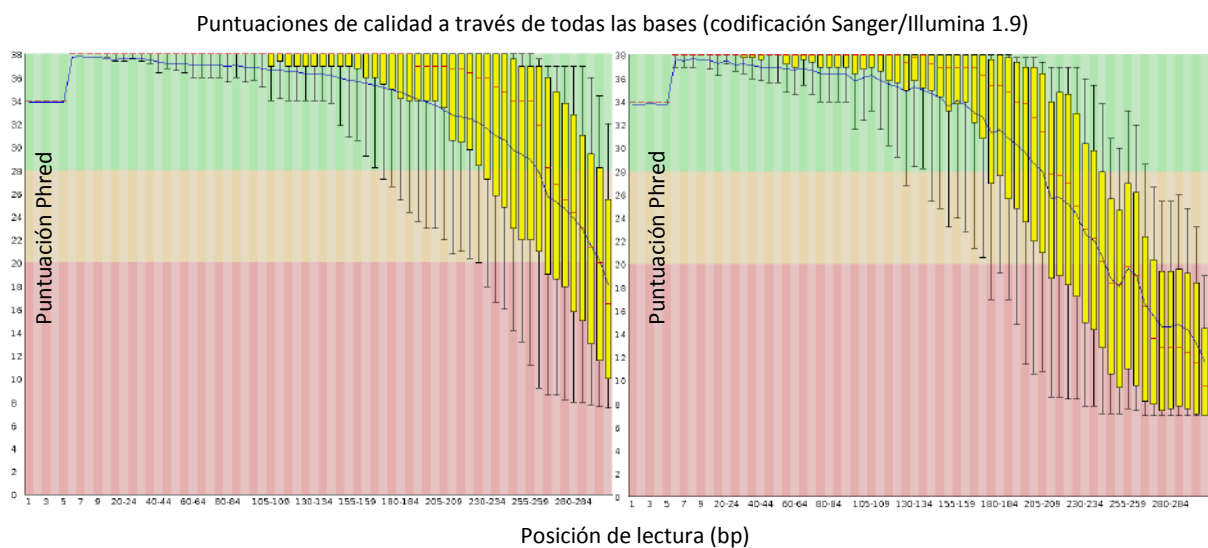
calidad de la corrida específica de la secuenciación. Sin embargo, es importante ser cuidadoso en la etapa de fusión ya que en la misma pueden introducirse grandes sesgos. La longitud de las regiones variables difieren entre especies, por ej. la región VI-3 del gen 16S rARN puede tener entre 425 y 525 pb. Si la calidad de la lectura es pobre, las lecturas emparejadas de  $2 \times 300$  pb podrían ser recortadas a  $2 \times 245$  pb (490 pb), lo cual es demasiado corto para fusionar los pares de lecturas originadas de especies con fragmentos de VI-3 grandes. Los pares de lectura que no se fusionan siempre se descartan y, por lo tanto, se introduce un sesgo. Esto se puede evitar si antes de hacer la fusión, se descartan todas las lecturas con longitudes inferiores a 275 pb como se mencionó anteriormente.

#### 8.4.5.5 Ensamblaje de las OTU

Las lecturas pre-procesadas se agrupan por la identidad de las secuencias. Estos grupos se denominan unidades taxonómicas operacionales (OTU) y el proceso de agrupamiento se denomina ensamblaje de las OTU. La variabilidad de la secuencia en cada grupo puede surgir por la presencia de cepas muy estrechamente relacionadas o debido a que se hayan introducido algunos errores en la secuenciación (Huse *et al.*, 2010). Aún con una muy baja tasa de error de 0.1 % por base, la posibilidad de obtener una lectura perfecta de 500 pb es de solamente de 61 % ( $0.999^{500}$ ). Como los errores de secuenciación están aleatoriamente distribuidos, la secuenciación de 1000 lecturas de un sólo gen de 16S rARN resultaría en  $(1 - 0.61) \times 1000 = 390$  lecturas diferentes. Para sortear esta exagerada diversidad las lecturas son agrupadas por similitud en las OTUs. Cuando se analizan fragmentos del gen 16S rARN de las

bacterias, el criterio de agrupamiento es una identidad de la secuencia del 97 %, la cual muy aproximadamente se pudiera traducir en un nivel de especies dependiendo de cual región variable se utilice. Es importante entender el umbral de identidad de la secuencia de 97 % que se cita frecuentemente. El criterio del 97 % se emplea para secuencias completas de 16S rARN que establecen que secuencias con menos del 97% de similitud pertenecen a diferentes especies. Por el contrario, el criterio no puede ser usado en sentido inverso, por ej. secuencias que son 97 % similares o más no necesariamente pertenecen a la misma especie (Janda *et al.*, 2007). La selección del

algoritmo para el agrupamiento alterará las OTUs resultantes (Edgar, 2013; Flynn *et al.*, 2015). Aunque aún es muy popular usar un sólo umbral para definir las OTUs, están surgiendo varios algoritmos que toman ventaja del perfil de error para usar umbrales de agrupamiento variable de manera que se obtenga el máximo de resolución (Mahé *et al.*, 2014). Después del agrupamiento se cuenta el número de lecturas pertenecientes a cada OTU y se selecciona una secuencia representativa del grupo de OTU. Esta es usualmente la lectura observada más frecuentemente en cada unidad OTU.



**Figure 8.11** Ejemplo de puntuaciones de calidad de Phred para una secuenciación final emparejada de  $2 \times 301$  pb de bibliotecas de amplicones V1-3 16S en un Illumina MiSeq. A la izquierda un gráfico típico del set lectura 1 (Read1) y a la derecha un gráfico típico para el set lectura 2 (Read2). El puntaje de calidad Phred se grafica en función de la posición de la lectura. La línea azul representa el puntaje promedio y las áreas delimitadas en diferentes colores definen la diferencia de puntaje. El área verde indica zonas de lectura de buena calidad, el amarillo de calidad razonable y el rojo de baja calidad. La calidad decrece hacia el final de la lectura. Esta representación gráfica de la calidad se generó con el software FastQC vo.11.3.

#### 8.4.5.6 Detección y supresión de quimeras

Durante las etapas de PCR, se generan secuencias quiméricas que son secuencias artificiales que consisten en múltiples genes 16S rARN diferentes. Las quimeras surgen cuando dos fragmentos incompletos del gen 16S rARN se hibridizan y se elongan por la acción de la polimerasa. Las quimeras pueden incrementar artificialmente la diversidad de las muestras y se necesita identificarlas y removerlas durante el procesamiento bioinformático (Quince *et al.*, 2011; Edgar, 2013).

#### 8.4.5.7 Clasificación taxonómica

Las secuencias que representan las OTUs del 16S rARN se clasifican taxonómicamente comparándolas con una

base de datos de secuencias existente. La clasificación es altamente dependiente del algoritmo y de la base de datos utilizados. Hay tres bases de datos universales destacadas comúnmente empleadas: SILVA (Quast *et al.*, 2013), RDP (Cole *et al.*, 2014) y Greengenes (McDonald *et al.*, 2012), y todas intentan abarcar todos los microorganismos conocidos hasta el momento. Sin embargo, dado su amplio alcance, no cuentan con información precisa de ecosistemas específicos. La base de datos MiDAS es una versión refinada de la base de datos SILVA con la finalidad de que proporcione el nombre a nivel de género de las especies más abundantes presentes en los ecosistemas de lodos activados (McIlroy *et al.*, 2015). Los nombres son importantes ya que proporcionan el vínculo con otros estudios y también con

reportes y estudios disponibles en la literatura donde se puede encontrar información funcional de los grupos de microorganismos.

El algoritmo usado para comparar las OTUs obtenidas con las bases de datos puede usar diferentes estrategias para la clasificación. Alguno de los algoritmos más conocidos usan diferentes versiones para abordar el ancestro común más bajo (LCA por sus siglas en inglés) (Pruesse *et al.*, 2012). Esta vía tiene en cuenta que una secuencia OTU puede ser similar a más de una secuencia disponible en la base de datos. De ser así, el algoritmo asigna la taxonomía compartida más baja entre estas secuencias en la base de datos de OTUs.

### 8.4.5.8 La tabla OTUs

El resultado final del procesamiento bioinformático es una tabla de OTUs. Las filas en la tabla representan las diferentes OTUs y las columnas representan cada muestra en el análisis. La celdas de la tabla muestran los valores contados para las respectivas OTUs en las respectivas muestras. Cada OTU tiene también una clasificación taxonómica. La clasificación es frecuentemente una cadena de caracteres de texto (separado por coma o similar) conteniendo la clasificación a cada rango taxonómico (reino, phylum, clase, orden, género y especie). Si falta una clasificación a un cierto rango, esto significa que fué imposible hacer una clasificación robusta a dicho nivel. Además se obtiene un archivo anexo que contiene las secuencias de ADN de las OTUs de referencia.

## 8.4.6 Análisis de datos

### 8.4.6.1 Definiendo el objetivo del análisis de datos

Las posibilidades teóricas dentro del análisis de datos del amplicon del 16S rARN son abundantes. Sin embargo, el alcance obtenible del análisis es definido por el diseño experimental y la variabilidad dentro de los datos generados. Por lo tanto, se recomienda fuertemente realizar un estudio preliminar, donde la meta sea determinar la variación dentro del tipo de muestras que van a ser estudiadas. Secuenciando un número de réplicas biológicas, es posible tomar decisiones acertadas considerando el diseño experimental y las réplicas que se necesitan para responder las preguntas planteadas.

En las secciones siguientes, se presentarán algunos ejemplos cortos de diferentes tipos de análisis de datos, vinculados a estudios ejemplares que pueden servir para una inspiración posterior. Para ejemplos más específicos y manejo preciso de los datos, se recomienda consultar la

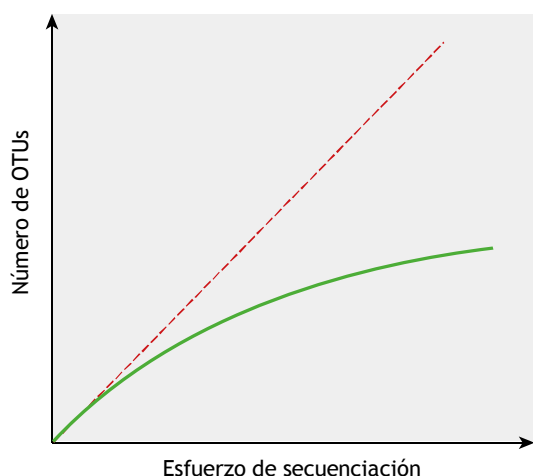
documentación disponible en línea de QIIME (Carporaso *et al.*, 2010), Mothur (Schloss *et al.*, 2009), PhyloSeq (McMurdie y Holmes, 2013), vegan (Oksanen *et al.*, 2015) y ampvis (Albertsen *et al.*, 2015).

### 8.4.6.2 Validación de los datos y chequeo de sensatez

Antes de comenzar el análisis principal de los datos, se recomienda hacer un pequeño análisis exploratorio para validar los datos y detectar posibles errores en el procesamiento. Esto es especialmente importante si la secuenciación y el procesamiento bioinformático han sido llevados a cabo en otros laboratorios o subcontratados. El flujo de trabajo del amplicon tiene numerosas etapas donde se pueden introducir errores. Estos típicamente son: la confusión de muestras, contaminación cruzada, procesamiento bioinformático erróneo o una pobre calidad de la secuenciación. Esto se puede detectar fácilmente con una revisión general estadística y gráfica.

Para todas las muestras el número de lecturas originales antes y después del procesamiento bioinformático deberían ser examinado. Si una muestra generalmente tiene pocas lecturas esto podría indicar que hubo algún error con la preparación de la biblioteca. Si durante el procesamiento bioinformático se pierden muchas lecturas, esto puede indicar que la calidad de los datos es pobre. La confusión de las muestras se puede detectar haciendo un gráfico de análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) basado en lo conteos de OTU de todas las muestras. En los gráficos PCA las muestras con comunidades microbianas similares se agruparán juntas. De aquí, se puede usar el sentido común y llevar a cabo una inspección visual de si las muestras se agruparon como se esperaba. Por ej. ¿Las réplicas se agrupan juntas?

Cuando la sensatez de los datos han sido chequeada con cordura es aconsejable verificar si el número de lecturas secuenciadas fueron suficientes para cubrir la diversidad observada en las muestras. Esto se hace con un análisis de rarefacción, donde se genera una curva que describe el número de OTUs identificadas a diferentes profundidades o extensiones de secuenciación a través de submuestras. La curva debe tender a un valor constante volviéndose asintótica a medida que se incrementa la profundidad o extensión de la secuenciación (Figura 8.12), lo cual indica que la mayoría de la diversidad ha sido capturada (Schloss y Handelsman, 2005).



**Figura 8.12** Evaluación del esfuerzo de secuenciación utilizando curvas de rarefacción. La línea roja indica que cada nueva lectura da como resultado la identificación de una nueva OTU. La línea verde indica que el descubrimiento de nuevas OTU disminuye con el esfuerzo de la secuenciación. Por lo tanto, la muestra verde está suficientemente muestreada.

### 8.4.6.3 Comunidades o especies individuales?

La unidad, o perspectiva, para el análisis puede dividirse aproximadamente en dos categorías: comunidades y especies individuales. En el análisis de comunidades, el parámetro para llevar a cabo la comparación es si hay una diferencia total en la estructura de la comunidad o diversidad entre las muestras, mientras que la perspectiva de las especies individuales trata de entender el papel y el efecto de las especies individuales en el sistema.

- **La perspectiva de la comunidad**

El análisis de la comunidad puede ser dividido en el análisis de diversidad alfa (dentro de las muestras) o diversidad beta (entre las muestras).

Los análisis de diversidad alfa se usan frecuentemente para investigar si un tratamiento particular tiene efecto sobre el número de diferentes especies observadas (también llamada riqueza) o sobre la homogeneidad en abundancia de las especies en la muestra. Para comparar las muestras, se calcula un solo valor para cada muestra, el cual puede entonces ser comparado a través de todas las muestras (Magurran, 2004; Lozupone y Knight, 2008).

Los análisis de diversidad beta se usan para comparar la diversidad compartida entre muestras, tales como el número de especies compartidas o como la cantidad de

diversidad filogenética compartida (Lozupone y Knight, 2008).

- **La perspectiva de la especie**

Mientras que se pueden realizar diversos análisis estadísticos altamente complicados con los datos de amplicon de 16S rARN, la gran mayoría de los análisis son simplemente para identificar las bacterias más abundantes y vincularlas con información funcional, por ej. para calcular la abundancia de organismos nitrificadores o bacterias filamentosas en la muestra (Figure 8.13). Si se usa la taxonomía MiDAS para la asignación taxonómica (McIlroy *et al.*, 2015), la Guía MiDAS ([midasfieldguide.org](http://midasfieldguide.org)) se puede usar para buscar manualmente información funcional de una especie en particular presente en el lodo activado. Alternativamente, el paquete ampvis R (Albertsen *et al.*, 2015) se puede emplear para vincular directamente los datos del amplicon 16S rARN con la información funcional en la Field Guide MiDAS.

### 8.4.6.4 Identificación de especies centrales y transitorias

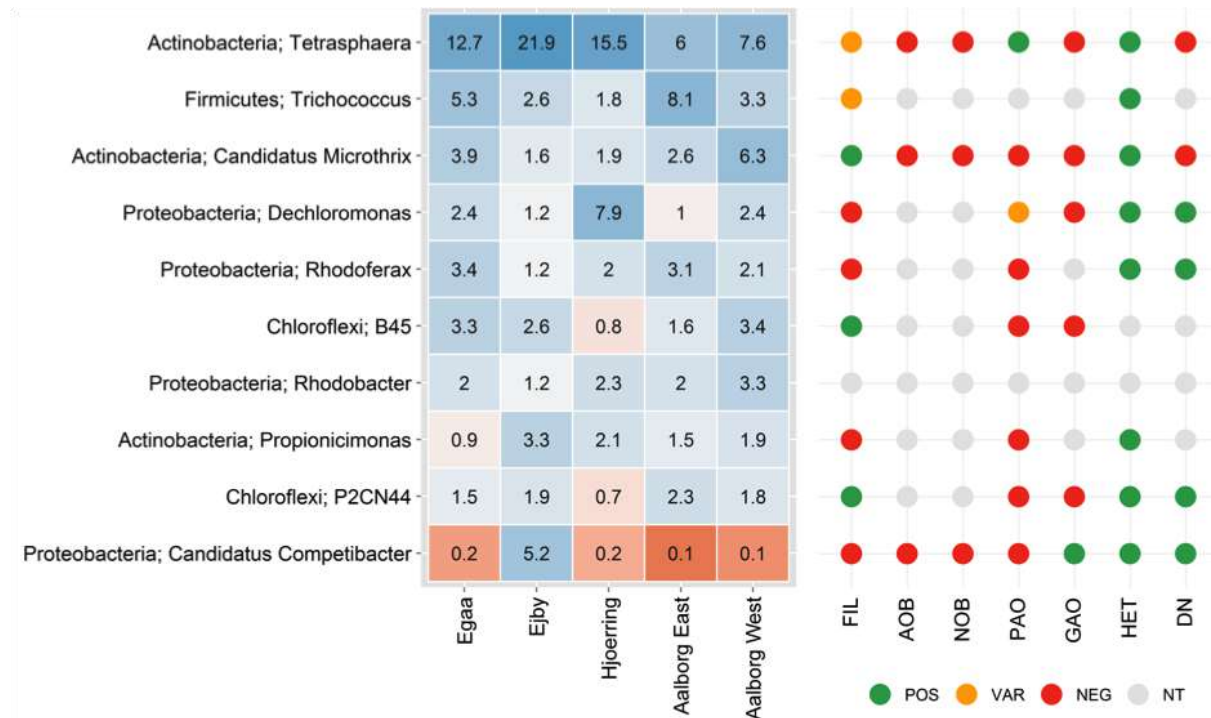
Cuando se investiga un sistema específico, es frecuentemente de interés identificar las especies que son importantes para los procesos en el sistema y aquellas que podrían causar problemas. El comienzo de este análisis es identificar las especies centrales y las transitorias (Grime, 1998; Gibson *et al.*, 1999). Este análisis necesita múltiples muestras y podría llevarse a cabo en una sola planta de tratamiento de aguas residuales (usando datos históricos) o en varias plantas de tratamiento de aguas residuales.

La definición tradicional de especies centrales es la de aquellas especies que están presentes en todas las muestras investigadas (Saunders *et al.*, 2015). Sin embargo, dada la alta sensibilidad del enfoque de secuenciación del amplicon 16S rARN, este también incluye un gran número de especies poco abundantes como especies centrales. Estas especies están presentes en todas las muestras, pero presumiblemente no contribuyen significativamente a los principales procesos del ecosistema. De aquí, frecuentemente se usa una definición más práctica de la abundancia de la comunidad central, la cual determina que una bacteria sea abundante si esta presente en 8 de las 10 muestras, por lo que puede incluirse dentro del grupo de las especies más abundantes que componen hasta el 80% de la comunidad (Saunders *et al.*, 2015). En sistemas con un alto grado de



inoculación natural de especies a través del afluente, podría ser necesario investigar si los organismos solo están ingresando con el afluente o si también están creciendo activamente. Un estimado razonable de esto se

puede obtener analizando la composición bacteriana del afluente y del lodo activado y combinarlo con un balance de masas del sistema (Saunders *et al.*, 2015).



**Figure 8.13** La combinación de las abundancias de las especies con información funcional es el punto de comienzo para la mayoría de los análisis. La figura fue hecha mediante el paquete ampvis R (Albertsen *et al.*, 2015), el cual directamente vincula nombres de géneros con información funcional en la MiDAS Field Guide ([www.midasfieldguide.org](http://www.midasfieldguide.org)). La combinación muestra organismos filamentosos (FIL), nitrificantes (AOB, NOB), involucrados en la remoción de fósforo (PAO, GAO), heterótrofos (HET) y desnitrificantes (DN).

#### 8.4.6.5 Análisis exploratorio usando estadística multivariada

El conjunto de datos generados por la secuenciación del amplicon del 16S rARN puede ser extremadamente largo y aún con diez muestras (cada una con miles de especies) puede ser difícil tener una visión general de los datos y de identificar patrones interesantes. Por ello, se aplican frecuentemente diferentes métodos de análisis de datos, por ej. el PCA. Estos métodos se pueden usar para visualizar grupos de muestras de acuerdo a que tan similares son sus comunidades microbianas y para identificar cuales especies son responsables de la agrupación observada en las muestras (Figura 8.14).

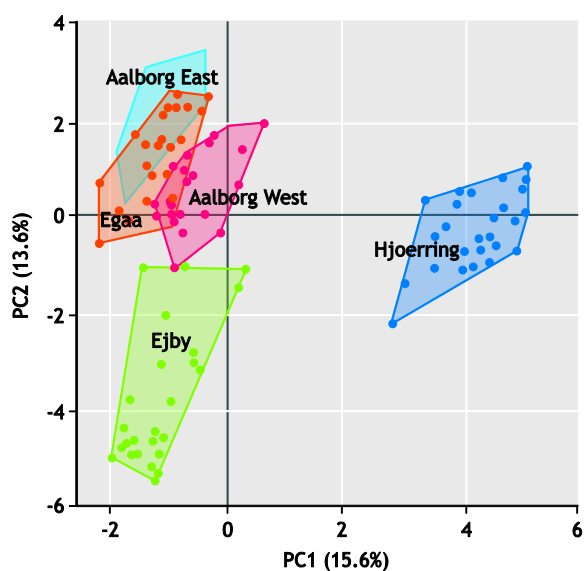
Gráficos exploratorios, en donde las muestras se colorean en función de diferentes variables ambientales, son frecuentemente un buen lugar para comenzar antes

de llevar a cabo un análisis formal estadístico. Sin embargo, la elección específica del método de análisis y transformación de los datos es altamente dependiente de la pregunta planteada, del número de muestras y de la distribución de la abundancia. Por lo que se recomienda consultar literatura específica para comprender las aplicaciones de los diferentes métodos que pueden emplearse (Legendre y Gallagher, 2001; Ramette, 2007; Zuur *et al.*, 2007).

#### 8.4.6.6 Análisis de correlación

Otra posibilidad con los datos de amplicon del 16S rARN es investigar las correlaciones entre diferentes especies o entre especies y factores ambientales. ¿Están co-existiendo algunas especies, son algunas especies claves necesarias para el funcionamiento del ecosistema o existe alguna correlación entre la abundancia de ciertas especies específicas y factores ambientales tales como la

temperatura?. Debido al número de posibles correlaciones, frecuentemente los resultados se visualizan en una red de gráficos que muestran correlaciones positivas o negativas entre las especies y las variables ambientales (Faust *et al.*, 2012; 2015). Sin embargo, hay muchas dificultades y alternativas que deben tenerse en cuenta en los análisis de correlación de datos del amplicon del 16S rARN. Por ejemplo, frecuentemente se hace el análisis de correlación sobre series de datos en el tiempo pero las correlaciones podrían retrasarse en el tiempo. Un incremento súbito en las concentraciones de amonio, podría resultar en un incremento en la presencia organismos nitrificadores durante un período de varias semanas.



**Figure 8.14** Análisis exploratorio mediante análisis de componentes principales (PCA). Se observa que las muestras se agrupan en cinco plantas de tratamiento de aguas residuales en Dinamarca. El gráfico se hizo usando el paquete ampvis R (Albertsen *et al.*, 2015).

#### 8.4.6.7 Efecto de los tratamientos sobre especies individuales

Para analizar estadísticamente el impacto de los tratamientos específicos sobre especies individuales, se han desarrollado diferentes métodos estadísticos que tienen en cuenta la naturaleza de los datos de amplicon basados en el cómputo. La mayoría de los métodos han sido modificados o importados directamente de esquemas desarrollados para el análisis de datos de expresión de genes (mRNAseq) (Robinson *et al.*, 2010; Love *et al.*, 2014).

### 8.4.7 Observaciones generales

#### 8.4.7.1 Análisis relativo

Es importante destacar que el análisis de la comunidad microbiana basada en la secuenciación del amplicon del 16S rARN es un análisis relativo. Esto significa que la abundancia de las lecturas que representan las especies individuales está dada como un porcentaje del total. No existe un vínculo entre el porcentaje y el conteo absoluto de células. De ser necesario, este vínculo debe determinarse mediante qPCR (ver Sección 8.3)

#### 8.4.7.2 Sesgo en el número de copias

Mientras que el gen 16S rARN es universal entre las bacterias, diferentes bacterias pueden tener desde una a quince copias del gen 16S rARN en su genoma (Farrelly *et al.*, 1995; Angly *et al.*, 2014). Por lo tanto, una especie bacteriana con diez copias del gen 16S rARN parecerá ser diez veces más abundante que una especie con un solo gen 16S rARN, lo anterior siempre y cuando ambas especies estuvieran presentes en números similares de conteos de células en una muestra. Además, algunas bacterias tienen más de una copia de su genoma, lo cual introducirá un error en la estimación de la abundancia (Mendell *et al.*, 2008; Pecoraro *et al.*, 2011). De aquí se desprende que en lugar de referirse al porcentaje de los datos del amplicon del 16S rARN como “abundancias” debe referirse como “abundancias de lecturas” para tener en cuenta cualquier posible sesgo inherente.

#### 8.4.7.3 Sesgos de los primers

Como se planteó anteriormente, la elección de las condiciones del PCR y del primer también tienen un gran efecto sobre la comunidad microbiana observada. Los primers “universales” se diseñan comparando la secuencia de regiones conservadas de los genes 16S rARN de miles de bacterias diferentes, y entonces se hace una secuencia consenso que incluya a la mayoría de las bacterias. Sin embargo, no es posible diseñar primers que reaccionen con la misma eficiencia con todas las bacterias. Además, frecuentemente hay sesgos que dependen de la taxonomía, lo que significa que el total de los grupos taxonómicos están sub-representados o inclusive que hay varios que no han sido detectados. Muchos de los nuevos candidatos Filas que están siendo descubiertos usando métodos de identificación independientes de primers, como los métodos metagenómicos, muestran grandes desviaciones en las regiones conservadas del primer o inclusive inserciones de secuencias largas en el gen 16S rARN. Esto último es

una de las razones principales por las cuales no se les había prestado atención en décadas (Brown *et al.*, 2015).

#### 8.4.7.4 Estandarización

Se han hecho muchos intentos para eliminar los sesgos descritos anteriormente, pero con un sistema tan complejo como los lodos activados, probablemente nunca se tendrá un éxito completo. Además, es muy difícil validar si los sesgos han sido eliminados, ya que frecuentemente es difícil hacer controles apropiados. A primera vista esto parece debilitar el método de análisis. Sin embargo, esto solo define algunas limitaciones sobre qué preguntas pueden ser respondidas, y cómo deben diseñarse los experimentos.

El mensaje central es que si los sesgos son los mismos para todas las muestras analizadas, la secuenciación del amplicon del 16S rARN es una herramienta muy poderosa para hacer comparaciones y observaciones relativas de la presencia o ausencia de bacterias específicas. Para asegurarnos que todos los sesgos sean iguales, las muestras en un experimento tienen que ser tratadas de manera exacta durante todo el proceso. Es preferible que el muestreo y almacenamiento, la extracción del ADN, la biblioteca de la secuenciación y el procesamiento de los datos sea realizado siempre exactamente de la misma forma.

#### 8.4.7.5 Impacto del método

A pesar de ciertas limitaciones, la secuenciación del amplicon del 16S rARN es al día de hoy una de las herramientas más esenciales en la ecología microbiana. Las principales razones son la resolución y rendimiento que éste posibilita, algo que las técnicas precedentes difícilmente pudieron alcanzar. En el año 2010, las bibliotecas de clones y DGGE eran las técnicas estándar suplementadas con FISH para la identificación y la cuantificación *in situ* de comunidades microbianas. Un estudio amplio en aquel entonces incluiría 100-1,000 secuencias de 16S rARN divididas en 10 muestras. Hoy, por el mismo costo, se pueden analizar cientos de muestras con miles de lecturas por muestra en una sola semana. Sin embargo, esto también requiere más experiencia, conocimiento y habilidad de los microbiólogos para manipular experimentos altamente complejos y enormes cantidades de datos.

### 8.4.8 Protocolo: bibliotecas Illumina de amplicon V1-3 16S rARN

Este protocolo describe cómo hacer bibliotecas de secuenciación de amplicon con Illumina, para las regiones variables 1-3 del gen 16S rARN bacteriano. Las bibliotecas son apropiadas para la secuenciación sobre el MiSeq Illumina usando kits de reactivos de 600 ciclos. Para llevar a cabo este protocolo se necesitan aproximadamente 10 h.

#### 8.4.8.1 Aparatos

- Un espectrofotómetro ND-1000 (Thermo Scientific) o un espectrofotómetro UV-visible similar para medir concentración de ADN y estimar su pureza.
- Un manual del usuario Nanodrop (NanoDrop Technologies Inc. 2007).
- Un Fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies), Infinite M1000 PRO (Tecan) o un fluorómetro similar para medir la concentración de ADN usando colorantes que se enlacen al ADN.
- Una guía para usuarios Qubit (Thermo Scientific 2015a; 2015b).
- Un termo ciclador PCR estándar con tapa de calentamiento.
- Un soporte magnético para placas de 96 posiciones usados para la purificación del ADN ej. MagneSphere Technology Magnetic Separation Stand (Promega) or Magnetic Stand-96 (AM10027, Ambion).
- Un sistema para electroforesis de gel 2200 (Agilent) para chequear la calidad de la biblioteca de secuenciación. Alternativamente se usa un sistema convencional de electroforesis en gel (Green y Sambrook, 2012).
- Una configuración de electroforesis en gel de la tapestation 2200 (Agilent) para controlar la calidad de la biblioteca de secuenciación (Green y Sambrook, 2012).
- Manuales de TapeStation 2200 (Agilent Technologies, 2012; 2013; 2015).
- Pipetas (en el rango de 1  $\mu$ L a 1,000  $\mu$ L).

#### 8.4.8.2 Materiales

##### PCR de placas rotatorio

- PCR rotatorio de placas.
- Puntas libres de ADNasa (de 10  $\mu$ L, 300  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L).
- Tubos de 1,5 mL libres de ADNasa.

- Tubos de PCR libres de ADNasa de pared fina (500  $\mu\text{L}$ ).
- Placas de PCR de 96 posiciones (#82006-664, VWR).
- Tiras de tapas para PCR.
- Una microplaca OptiPlate-96 Black (Perkin Elmer).
- $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasa (Qiagen).
- Colorantes fluorescentes para el enlazamiento de ADN ej. Un kit de ensayo dsADN HS Qubit (Life Technologies), un kit de ensayo Quant-iT dsSDN de amplio rango (Life Technologies), un kit de ensayo Quant-iT dsADN alta sensibilidad (Life Technologies).
- Un kit Platinum Taq ADN polimerasa de alta fidelidad (Life Technologies).
- Mezcla de dNTP.
- Mezcla del adaptador del gen V1-3 16S rARN con codificación de barras (5  $\mu\text{M}$  de cada uno de los adaptadores directo e inverso), ver Sección 8.4.11
- AMPure XP Agencourt (Beckam Coulter)
- Etanol, 99%.
- D1000 Screentape (Agilent) y Screentape de ADN Genómico (Agilent). Alternativamente se pueden usar reactivos convencionales para la electrophoresis en gel (Green y Sambrook, 2012).

### 8.4.8.3. Protocolo

#### • Control de calidad y dilución de la muestra de ADN (2.5 h)

En esta sección se chequea la calidad del ADN genómico extraído y el mismo es diluido a una concentración apropiada para la ejecución de la PCR. Para obtener más información, ver la sección 8.4.9 (para la interpretación y solución de problemas).

1. Medición de la concentración de ADN por fluorescencia.
  - a. Utilice un kit de ensayo Qubit dsADN BR o un kit de ensayo de amplio rango Quant-iT dsADN siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.
  - b. Utilice 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra por reacción.
  - c. Realice una medición por muestra.
2. Chequeo de calidad UV-visible (opcional).
  - a. Use un Nanodrop1000 siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor (Nanodrop Technologies Inc., 2007).
  - b. Para cantidades considerables de muestras considere medir una subserie de muestras (ej. 8 de 96).

- c. Inicialice y fije los valores iniciales del instrumento (blanco) con el mismo buffer en el que se eluyeron las muestras.
  - d. Emplee 2  $\mu\text{L}$  de muestra por cada medición.
  - e. Realice una medición por muestra.
3. Electroforesis en gel (opcional).
    - a. Use un TapeStation 2200 siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.
    - b. Use los Screentapes genómicos con la escala de referencia de ADN (*ladder*).
    - c. Realice una medición por muestra.
    - d. Para cantidades considerables de muestras considere medir una subserie de muestras (ej. 7 muestras de 96 + 1 ladder).
  4. Dilución de la muestra.
    - a. Basados en la medición de la concentración de ADN por fluorescencia, calcule cuanta agua libre de nucleasa se requiere para diluir cada muestra a 5  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ . La formula empleada es:

$$\frac{V_{\text{muestra}} \cdot C_{\text{muestra}}}{C_{\text{final}}} - V_{\text{muestra}} = \quad \text{Ec. 8.2}$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} \rightarrow \frac{5 \mu\text{L} \cdot C_{\text{muestra}}}{5 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}} - 5 \mu\text{L} = V_{\text{H}_2\text{O}}$$

- b. Transfiera una muestra de 5  $\mu\text{L}$  a una celda vacía de la placa de PCR de 96 posiciones.
- c. Diluya la muestra con la cantidad de agua libre de nucleasa previamente calculada.
  - ▲ **Etapa crítica** Si la concentración de la muestra es 5  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  o menor, use la muestra sin diluir o deseche la muestra. Si la dilución requiere más de 150  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasa, una predilución pudiera ser requerida.
- d. Repita para todas las muestras.
- e. Selle las placas con las tiras de tapas de PCR.
  - **Pausa** Las muestras diluidas se pueden almacenar a  $-20^\circ\text{C}$  por al menos por un mes.

#### • Biblioteca del PCR (2.0 h)

Esta sección abarca la preparación de las bibliotecas de secuenciación mediante amplificación por PCR. La entrada de la plantilla es ADN genómico (5  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) y la salida son los amplicones 16S rARN VI-3 con un tamaño de aproximadamente 614 bp.

1. Preparación.
  - a. La biblioteca de la reacción PCR se corre por duplicado para cada muestra.
  - b. Recuerde incluir un control negativo ( $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasa) y un control positivo (comunidad

microbiana de ADN conocido para amplificar con PCR el 16S rRNA).

- c. Tenga en cuenta a que muestras se asignan cada tipo de adaptadores VI-3 con códigos de barras únicos.
2. Mezcla de la reacción PCR.
    - a. Prepare la mezcla maestra para (muestras + controles)  $\times 2 + 3$ . Cualquier mezcla maestra de repuesto compensará la pérdida durante el pipeteo.
    - b. Agregue los reactivos en el sugerido para producir la mezcla maestra.
    - c. Transfiera 13  $\mu\text{L}$  de la mezcla matriz a los pozos de una nueva placa de 96 pozos para PCR.
    - d. Dosifique 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla del adaptador para VI-3 16S rARN (1  $\mu\text{M}$ ), que tiene el código de barras asignado en cada posición de la placa y pipetee 10 veces la mezcla hacia arriba y abajo para mezclar la solución con la punta de la pipeta. La concentración final será de 400 nM.
      - ▲ **Etapa crítica** Existe un riesgo alto de que se confundan las muestras y los adaptadores. Manténgase alerta.
    - e. Adicione 2  $\mu\text{L}$  de ADN modelo o de referencia (10 ng de ADN) y mézclelo pipeteando hacia arriba y hacia abajo con la punta de la pipeta. El volumen final será de 25  $\mu\text{L}$ .
      - ▲ **Etapa crítica** Existe un riesgo alto de que se confundan las muestras.
    - f. Selle la placa de PCR de 96 posiciones con las tiras de tapas de PCR.
    - g. Centrifugue la placa de PCR de 96 posiciones para sedimentar la mezcla de la reacción de PCR en el fondo de la placa.

Reactivos	Conc. final en 25 $\mu\text{L}$ de reacción	Volumen ( $\mu\text{L}$ ) para 1 r $\times$ n
Agua libre de nucleasa	-	7.65
$\times 10$ buffer Platinum de Alta Fidelidad	$\times 1$	2.5
dNTP (5 mM)	400 $\mu\text{M}$	2
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1.5 mM	0.75
Polimerasa Taq de ADN tipo platino de Alta Fidelidad (5 U $\mu\text{L}^{-1}$ )	0.02 $\mu\text{L}^{-1}$	0.1
<b>Volumen total</b>		<b>13</b>

3. Corrida de incubación de la PCR.
  - a. Programe del termociclador con el siguiente programa:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95 °C	2 min
30 ciclos		
Desnaturalización	95 °C	20 s
Alineamiento	56 °C	30 s
Amplificación	72 °C	60 s
Amplificación	72 °C	5 min
Almacenamiento	4 °C	Para siempre

- b. Después de terminada la reacción de la PCR centrifugue de nuevo la mezcla de reacción.
- c. Remueva las tapas y agrupe las muestras duplicadas de cada muestra individual. El volumen final debe ser 50  $\mu\text{L}$ .
- d. Después del PCR las muestras se refieren como “bibliotecas de secuenciación” o “bibliotecas cortas”.
  - **Pausa** Las bibliotecas purificadas pueden ser almacenadas a -20 °C al menos por un mes.

#### ● Limpieza de la biblioteca (2.0 h)

Esta sección involucra la limpieza de las reacciones PCR. El objetivo es remover los reactivos sobrantes y posibles productos pequeños (< 200 pb) no específicos. Al final se tendrán bibliotecas de secuencias limpias que sólo consistirán de amplicones de 16S rARN (ca. 614 pb).

1. Preparación
  - a. Agite cuidadosamente los frascos Agencourt AMPure XP para resuspender las cuentas o perlas esféricas, remueva el volumen requerido 40  $\mu\text{L}$  de perlas  $\times$  [n(muestras) + 3] y permita equilibrar a temperatura ambiente.
  - b. Prepare una solución fresca de etanol al 80 % transfiriendo 20 mL de etanol al 99 % a un tubo falcon de 50 mL y adicione 5 mL de agua libre de nucleasa. Mezcle invirtiendo el tubo.
2. Una las bibliotecas a las cuentas (perlas)
  - a. Transfiera 40  $\mu\text{L}$  de la solución de esferas de cada posición de una placa nueva de PCR de 96 posiciones, que corresponda al número de muestras.
  - b. Agregue 50  $\mu\text{L}$  de la biblioteca a cada posición de la placa con perlas y mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces.
    - ▲ **Etapa crítica** Es importante que la relación de las perlas con respecto a la muestra sea: 4:5. Si por



alguna razón hay más ó menos de 50  $\mu\text{L}$  de muestra, ajuste el volumen de las perlas a usar.

- c. Incube por 5 min a temperatura ambiente.
3. Lave las bibliotecas en lazadas que ya hayan sido integradas.
  - a. Coloque la placa de PCR de 96 posiciones en el soporte magnético y espere hasta que el líquido se clarifique o se torne claro (2-4 min). Todas las etapas siguientes se realizarán con la placa puesta en el mismo soporte magnético.
  - b. Elimine y descarte tanto líquido como sea posible con una pipeta.
    - ▲ **Etapa crítica** Tenga cuidado de no transferir las perlas (pellets de color marrón).
  - c. Lave el pellet con 200  $\mu\text{L}$  de etanol (80 %) dispensándolo cuidadosamente sobre las perlas con una pipeta. Deje en reposo por 30s y entonces elimine el líquido.
  - d. Repita la etapa de arriba (3c).
  - e. Asegurese que no quede líquido en exceso después de los lavados. Si así fuera, elimínelo con una pipeta de 10  $\mu\text{L}$ .
  - f. Deje que los pellets se sequen durante 7 min.
    - ▲ **Etapa crítica** Evite el secado excesivo por calentamiento o largos tiempos de secado, ya que esto hará más difícil la elución del ADN.
4. Eluya la biblioteca
  - a. Retire la placa PCR de 96 posiciones con los gránulos de perlas secas del soporte magnético.
  - b. Agregue 33  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasa y mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo 10 veces para volver a suspender las perlas.
  - c. Incube por 2 min a temperatura ambiente.
  - d. Ponga otra vez la placa de PCR de 96 posiciones en el soporte magnético y espere hasta que el líquido clarifique (1-2 min).
  - e. Transfiera 30  $\mu\text{L}$  del líquido a una posición vacía en una nueva placa de 96 posiciones.
    - ▲ **Etapa crítica** Tenga cuidado de no transferir ninguna de las perlas.
    - **Pausa** Las bibliotecas purificadas pueden ser mantenidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  al menos por 6 meses (ver más adelante el párrafo sobre almacenamiento y transporte).

#### • Control de la calidad de la biblioteca (1.5 h)

Esta sección trata de la medición de la concentración de ADN de las bibliotecas limpias y el chequeo subsecuente de la calidad usando electroforesis en gel. Es necesario confirmar que solamente el amplicon 16S rARN objetivo está presente en las bibliotecas.

1. Medición de la concentración de ADN por fluorescencia.
  - a. Use un kit de ensayo de alta sensibilidad Qubit dsADN o un ensayo de alta sensibilidad Quant-iT dsADN siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.
  - b. Use 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra por reacción.
  - c. Realice una medición por muestra.
2. Electroforesis en gel.
  - a. Use el TapeStation 2200 siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.
  - b. Use la cinta D1000 Screentapes con escala de referencia de peso molecular de ADN.
  - c. Realice una medición por muestra.
  - d. Para lotes grandes de muestras considere medir una subserie de muestras (ej. 15 de 96). Siempre incluya el control negativo y el positivo en el análisis.

#### • Agrupamiento de bibliotecas (2.0 h)

Esta sección cubre el agrupamiento de la colección de todas las bibliotecas. El objetivo es obtener una muestra final única que contenga concentraciones equimolares (el mismo número de moléculas) de cada biblioteca. Los volúmenes se calculan a partir de las concentraciones de ADN de las bibliotecas obtenidas arriba.

1. Calcule el volumen requerido de cada muestra.
  - a. Las bibliotecas con una concentración menor de  $1\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  deben ser excluidas (o excluirlas o analizar una vez más en el PCR).
  - b. Detecte la muestra con la menor concentración y multiplique esta concentración por 1.5  $\mu\text{L}$  (ej.  $1\text{ ng } \mu\text{L}^{-1} \times 15\text{ } \mu\text{L} = 15\text{ ng}$ ). Esta es la cantidad de biblioteca deseada de cada biblioteca.
  - c. Calcule los volúmenes requeridos para obtener la misma cantidad de bibliotecas para cada una de las otras bibliotecas.
  - d. Si para algunas bibliotecas se requieren volúmenes menores a 1  $\mu\text{L}$ , considere diluir las bibliotecas y recalcular los volúmenes requeridos.
2. Agrupar las bibliotecas.
  - a. Use un tubo nuevo (1.5 mL).
  - b. Transfiera el volumen calculado de cada muestra al tubo.

- c. Mezcle bien después que todas las muestras se hayan adicionado.
3. Medición de la concentración de ADN por fluorescencia.
  - a. Use un kit de ensayo de alta sensibilidad Qubit dsADN siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.
  - b. Use 2  $\mu\text{L}$  de la biblioteca conjuntada por reacción.
  - c. Realice la medición por triplicado.
  - d. Calcule la concentración promedio.
  - e. Basado en la concentración, calcule la concentración nanomolar ( $C_{\text{nM}}$ ) con la siguiente fórmula.

$$c_{\text{nM}} = \frac{c_{\text{ng}/\mu\text{L}} \cdot 1\,000\,000 \frac{\mu\text{L}}{\text{L}}}{650 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 614 \text{ pb}} \quad \text{Ec. 8.3}$$

- f. Si la concentración es menor a 4 nM, concentre la muestra con perlas de purificación Ampure (ver la sección de limpieza de la biblioteca, presentada anteriormente en este capítulo). Asegúrese de usar una relación de perla a muestra de 4:5 (ej. si existe 100  $\mu\text{L}$  de muestra se debe usar 80  $\mu\text{L}$  de solución de perlas ampure). Asegúrese de calcular cuanta agua libre de nucleasa se necesita para la elución para obtener una concentración de 4 nM o más. También prevea la pérdida de hasta 50 % del producto. De manera que, si es necesario concentrar dos veces la muestra, entonces es necesario un aporte de 100  $\mu\text{L}$  del agrupamiento de la librería para ser eluido en 25  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasa. Repita la medición de la concentración de ADN de la muestra concentrada.

#### • Almacenamiento y transporte

Esta sección se refiere al almacenamiento de bibliotecas y al conjunto de bibliotecas.

1. Si el almacenamiento del conjunto de bibliotecas está planificado, no lo diluya. El ADN tolera mejor el almacenamiento si está concentrado ( $> 5 \text{ ng L}^{-1}$ ).
2. Para el almacenamiento o transporte a corto plazo ( $< 14 \text{ d}$ ), la biblioteca de ADN purificada puede mantenerse a temperatura ambiente.
3. Para un periodo de almacenamiento a mediano plazo ( $< 12 \text{ meses}$ ), debe mantenerse a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .
4. Para un periodo de almacenamiento a largo plazo (por más de 12 meses), se deben conservar o mantener a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 8.4.9 Interpretación y resolución de problemas

### 8.4.9.1 Control de la calidad de la muestra de ADN y dilución

Hay tres aspectos a considerar respecto al ADN a analizar: (i) la cantidad, (ii) la calidad y (iii) los potenciales contaminantes. Estas características son investigadas usando un ensayo de medición de la concentración por fluorescencia, espectrofotometría UV-visible y electroforesis en gel.

La cantidad recomendada de ADN de la comunidad microbiana para un PCR es de 1-100 ng de ADN total; frecuentemente se usan 10 ng (aproximadamente  $2 \times 10^6$  células). Si se usa más ADN se incrementa el riesgo de amplificar fragmentos de ADN al azar y puede ocurrir la inhibición de la reacción PCR. Los amplicones aleatorios son problemáticos, ya que ellos resultan en una disminución del rendimiento de los datos de la secuenciación y una calidad deficiente. Una baja concentración de ADN incrementa el riesgo de fallos en la PCR e introduce variaciones en los miembros que tienen una abundancia baja en la comunidad (Kennedy *et al.*, 2014). La espectrofotometría de UV-visible se puede usar para medir la concentración de ADN, pero la estimación puede ser incierta ya que es influenciada por la contaminación de los reactivos, la presencia de nucleótidos y ARN. Los métodos basados en la fluorescencia son siempre mejores, y la espectrofotometría de UV-visible debe usarse solamente como una alternativa complementaria (Li *et al.*, 2014).

La calidad del ADN es importante ya que influye en la cantidad de ADN disponible para la reacción PCR. Si el ADN está fuertemente degradado (la mayoría del ADN contiene fragmentos inferiores a 5,000 pb), se incrementa el riesgo de que los genes marcadores estén rotos, lo que disminuye su disponibilidad para el ensayo de PCR (Beers *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 1997).

Los contaminantes no relacionados con el ADN son generalmente productos químicos o moléculas orgánicas presentes en la muestra original (como ácidos húmicos y azúcares complejos) o generados durante la extracción del ADN (SDS, alcoholes, sales caotrópicas) y ellos pueden inhibir la reacción PCR, reduciendo la eficiencia (Wilson *et al.*, 1997). Un espectro UV-vis de ADN limpio tiene una curva bien distinta. Las anomalías en esta curva indican que existe contaminación y ellas son frecuentemente detectadas mediante la determinación de la relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm

(A260/A280) y de la relación a 260 nm y 230 nm (A260/A230). La relación (A260/A280) de un ADN limpio está usualmente alrededor de 1.8, pero si ésta es muy diferente (ej.  $\pm 0.4$ ) esto pudiera indicar que existe contaminación con proteínas o residuos de reactivos tales como alcoholes provenientes del kit de extracción. La relación A260/230 de un ADN limpio está usualmente entre 2.0-2.2, y si este es muy diferente pudiera indicar la presencia de residuos de carbohidratos o de reactivos de la extracción del ADN. La espectrofotometría UV-vis es un método muy sensible, y el tipo de buffer y pH pueden enturbiar los resultados (Thermo Scientific, 2015).

Los contaminantes del ADN pueden ser ADN de otros organismos o formas de vida que no son de interés para las bacterias sujetas de estudio, por ejemplo el ADN de células eucariotas como hongos o plantas. La presencia de contaminantes del ADN reduce la cantidad efectiva del ADN de estudio en la muestra y reduce la eficiencia de la PCR (Tebbe *et al.*, 1993). Esto no se puede medir de antemano, pero se pueden obtener índices, inspeccionando visualmente la biomasa antes de la extracción del ADN (por ej. tratando de visualizar si hay material vegetal visible).

Si existe la sospecha de que existe contaminación, es buena idea realizar un ensayo de PCR con unas pocas muestras para evaluar si existen problemas. Frecuentemente el PCR puede ser confiable a pesar de que exista contaminación, sin embargo si el PCR falla, la solución puede ser llevar a cabo etapas de purificación extra. Recuerde usar un método de limpieza o purificación que pueda manipular ADN genómico de alto peso molecular (con tamaños superiores a 10,000 pb) por ej. perlas Agencourt AMPure XP. Varios kits de purificación basados en columnas se diseñan con la capacidad suficiente para manipular cadenas mayores a 10,000 pb y por tanto serán útiles para la remoción de ADN genómico.

#### 8.4.9.2 Biblioteca de PCR

Cuando se hace un PCR, la composición de la mezcla maestra y las condiciones de incubación influenciarán la composición de la comunidad observada en los datos finales. En una condición de investigación dada, es común optimizar las condiciones del PCR para incrementar la cantidad generada del amplicon de interés y para reducir las cantidades de productos de PCR aleatorios. Sin embargo, para la secuenciación del amplicon del 16S rARN, la configuración de PCR debe mantenerse igual para todas las muestras que van a ser comparadas. Para asegurar la consistencia se recomienda

utilizar la configuración estándar de los protocolos probados. Para completar la información requerida, a continuación se proporciona una breve descripción de lo que generalmente tiende a ajustarse para optimizar la PCR.

La concentración de  $Mg^{2+}$  y la temperatura de alineamiento influirán en cuán específicos son los *primers* o cebadores. Si son demasiado estrictos, se observará un sesgo negativo contra ciertas especies. Si la severidad es muy baja, habrá un incremento del riesgo de amplificar aleatoriamente fragmentos de ADN. El número de ciclos del PCR determina cuanto producto se forma, y en muchas ocasiones ciertas corridas aparentemente fallidas pueden ser exitosas con solo incrementar el número de ciclos. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que un mayor número de ciclos también puede incrementar el riesgo de que exista un sesgo de selección (Polz *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2014). Además si se corren demasiados ciclos y los *primers* y otros reactivos se agotan, se incrementa el riesgo de que se generen productos quiméricos (Qiu *et al.*, 2001).

#### 8.4.9.3 Limpieza de la biblioteca

Los pasos de limpieza de la biblioteca eliminan restos de reactivos (*primers*, nucleotidos, polimerasa, etc.) así como fragmentos de ADN pequeños y aleatorios (<200 pb). Todos estos contaminantes pueden interferir con la secuenciación del ADN, reducir la calidad de los datos o hacer que la secuenciación falle completamente.

El método de purificación aplicado en el protocolo se basa en la precipitación del ADN sobre pequeñas bolas de plástico magnéticas llamadas cuentas o perlas SPRI (Inmovilización Reversible en Fase Sólida). El principio no ha sido bien descrito todavía en la literatura (DeAngelis *et al.*, 1995), pero diferentes blogs presentan algunas hipótesis (Hadfield, 2012). Debido a su composición química, el ADN tiene una carga total negativa y se disuelve fácilmente en agua, donde interactúa electrostáticamente con las moléculas polares del agua. Para precipitar el ADN de la solución, se dosifica cloruro de sodio (NaCl). Los iones  $Na^+$  se forman y protegen las cargas negativas del ADN haciéndolo menos soluble, promoviendo la precipitación. El agente aglutinador PEG, incrementa la concentración efectiva del  $Na^+$  e incrementa drásticamente el efecto protector. Cuando el ADN precipita, prefiere la superficie de las cuentas SPRI. Contradictoriamente, esta preferencia es contraria a lo instruido porque la superficie de las cuentas está negativamente cargada por lo que deberían repeler al ADN negativamente cargado o

estabilizado. El tema es muy debatido y no existe una explicación clara, sin embargo algunos proponen que la interacción de las cuentas ADN/SPRI es mediado por una capa de iones  $\text{Na}^+$  o agua que cubre las cuentas SPRI. De aquí que si se mezcla el ADN disuelto y las perlas en una solución que contenga agentes aglutinantes, el resultado será la precipitación del ADN sobre las perlas. La solución aglutinante se puede eliminar y las perlas con el ADN pueden ser lavadas usando etanol concentrado al 80 %. La composición de la solución de lavado se optimiza para disolver contaminantes pequeños tales como sales, nucleótidos, etc., pero asegurando que el ADN no se redissuelva. Después del lavado, el ADN se disuelve en agua libre de nucleasa o en buffer, dejándolo listo para usar.

Las pequeñas moléculas de ADN son más propensas a permanecer en solución comparadas con las moléculas de ADN más grandes, cuando se adiciona una cierta cantidad de agente aglutinante y sal. Esto significa que los pequeños pedazos de ADN se pueden eliminar adicionando la cantidad correcta de solución aglutinante. En este protocolo, se usan 40  $\mu\text{L}$  de la solución de perlas Agencourt AMPure XP (perlas + solución aglutinante) para 50  $\mu\text{L}$  de muestra. Esta relación perla & muestra de 4:5 favorece el enlazamiento del DNA > 200 pb a las perlas y los pedazos más pequeños permanecen en la solución y son subsecuentemente eliminados. Se debe tener cuidado cuando se dispensa la muestra sobre la solución de perlas. Si la relación perla:muestra es < 0.5, el amplicon del 16S rARN será también eliminado. Si la relación es > 1.0 entonces la contaminación no se eliminará correctamente.

Al secar el etanol residual de las perlas después del lavado, tenga cuidado de no exagerar. No use calor ni lo seque por mucho tiempo. Si el pellet de perlas se seca demasiado (muchas grietas en el pellet), será muy difícil redissolver el ADN y el producto se perderá.

Se pueden usar otros métodos de purificación en lugar de las perlas, tales como métodos basados en columnas, por ejemplo el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). El principio general de todos los métodos de purificación son similares.

#### 8.4.9.4 Control de calidad de la biblioteca

La concentración de ADN se mide para proporcionar la base para la agrupación de librerías. No es necesario que la concentración que se mide sea muy precisa ( $\pm 20\%$  es apropiada), por tanto solo se hace una medición.

La electroforesis en gel se corre para asegurar la remoción de todos los contaminantes del ADN (*primers* y ADN amplificado aleatoriamente) y que solamente esté presente el amplicon 16S rARN objetivo (614 pb). La electroforesis en gel generalmente solo se corre en una subserie de muestras debido a que es un procedimiento caro y largo, y ya que un subconjunto al azar puede indicar el éxito de la purificación. Al elegir las muestras para el subconjunto siempre se incluyen muestras negativas y positivas. También, basados en la medición de la concentración, se incluyen muestras que tienen una baja concentración, para ver si está presente el producto del amplicon VI-3 16S rARN. Si no hay presencia de productos del amplicon VI-3 16S rARN, entonces vuelva a correr la PCR de esas muestras.

El producto de amplicon VI-3 16S rARN tiene un tamaño promedio de 614 pb, sin embargo el tamaño puede variar hasta en  $\pm 100$  pb entre diferentes especies. Para comunidades bacterianas con muchas especies diferentes esto usualmente se manifiesta como un pico con un máximo alrededor de 614 pb cuando se usa la electroforesis de tipo TapeStation. Si se analiza una comunidad con sólo unos pocos miembros, pueden aparecer múltiples picos entre 500 y 700 pb en el electroferograma del TapeStation.

No debe haber fragmentos de ADN inferiores a 300 pb. Si los hubiera, revise la etapa de purificación y repita la purificación. Si el contaminante es < 1 % del total de ADN en la muestra, la secuenciación aún podría producir un resultado útil y se pudiera omitir la repetición de la purificación. Raramente se observan contaminaciones desconocidas por encima de 700 pb. Si esto ocurriera, trate de repetir la PCR. Si se mantiene así, intente secuenciar la biblioteca de todos modos. Será posible filtrar el contaminante utilizando técnicas bioinformáticas.

La muestra positiva debe mostrar un producto claro de alrededor de 614 pb. La muestra negativa no debe mostrar nada, o un producto débil que sea < 1 % del total del ADN de otras muestras. Frecuentemente es difícil evitar totalmente la contaminación, pero siempre que el nivel de contaminación sea bajo el resultado es aceptable. Si el control negativo tiene un alto nivel de contaminación, es muy posible que todas las muestras

estén contaminadas. Revise su configuración de PCR, repita las reacciones de la PCR de todas las muestras, posiblemente con un nuevo lote de reactivos.

#### 8.4.9.5 Agrupación de las bibliotecas

La agrupación equimolar de bibliotecas se realiza para asegurar que cada muestra tenga una igual cantidad de datos durante la secuenciación. Los errores en la agrupación tendrán un efecto directo sobre la cantidad de datos obtenidos. Si se cometen errores en la agrupación, comience de nuevo si es posible.

#### 8.4.9.6 Control de calidad de la agrupación y dilución

La medición de la concentración de la agrupación de bibliotecas es muy importante ya que esta se usa para determinar la cantidad de la biblioteca que se debe cargar en el secuenciador. Si la concentración medida es mayor a lo que realmente es, se obtendrán menos datos en la corrida de la secuenciación. Si la concentración medida es más baja de lo que realmente es, el secuenciador puede estar sobrecargado, lo que da como resultado una calidad deficiente de los datos o que el secuenciador se rompa por completo.

Por tanto, la agrupación de biblioteca debe ser medida por triplicado y las concentraciones promediadas. Asegúrese de calibrar el fluorómetro antes de usarlo con muestras de referencia que sean conocidas y que no estén contaminadas o degradadas.

#### 8.4.9.7 Almacenamiento

El ADN debe ser almacenado en agua ultrapura o buffer TE (pH 7-8). Ha habido reportes de degradación del ADN después de un largo tiempo de almacenamiento en agua ultrapura, lo que probablemente se deba a un desbalance del pH ya que no había buffer presente. El ADN puro disuelto es muy estable aún a temperatura ambiente y puede ser almacenado o transportado sin problemas a temperatura ambiente por tiempos cortos. Para almacenarlo a mediano o largo plazo se recomienda congelarlo a -20 o -80 °C (Smith y Monn, 2005). Se deben evitar ciclos de congelación y descongelación del ADN ya que esto lo degrada. Si una muestra va a ser usada múltiples veces, prepare alícuotas.

### 8.4.10 Protocolo: secuenciación de amplicones Illumina V1-3 16S 16S

Este protocolo describe adiciones importantes al protocolo cuando se prepara la secuenciación de las

Librerías de Amplicones V1-3 16S rRNA con el sistema Miseq de Illumina. Para los detalles acerca de las etapas siguiendo el procedimiento estándar, refiérase a la Guía del Usuario del sistema Miseq (Illumina Inc. 2014b). El tiempo necesario para la ejecución del protocolo es de aproximadamente 3.5 h, sin embargo la secuenciación requiere 56 h.

#### 8.4.10.1 Equipo

Para la ejecución del protocolo se necesita:

- Equipo de secuenciación MiSeq (Illumina).
- Micropipetas (de 1 µL a 1,000 µL).
- Una Guía del Usuario del sistema MiSeq (Illumina Inc, 2014b).
- Software Illumina Experimental Manager v1.9 (illumina.com).

#### 8.4.10.2 Reactivos

Para la ejecución del protocolo se necesitan los siguientes reactivos:

- Hielo.
- Un kit v3 de reactivo MiSeq, 600 ciclos (Illumina). Incluye un cartucho de reactivo y un buffer HT1.
- NaOH 2M, grado molecular
- *Primers* para la secuenciación (Read1, Read2, e Index), ver la Sección 8.4.11.
- Puntas de micropipetas libres de ADNasa (10 µL, 300 µL y 1,000 µL).
- Tubos libres de ADNasa (1.5 mL).
- Agua libre de ADNasa (Qiagen).
- Biblioteca V3 de control PhiX, 10 nM (Illumina).
- Etanol al 70 % (grado molecular)
- Toallitas de laboratorio libres de pelusa.
- Toallitas para limpiar lentes del microscopio.

#### 8.4.10.3 Protocolo

##### • Preparación del MiSeq (2.0 h)

Esta sección describe el descongelado de los reactivos, y la preparación del instrumento MiSeq y el fichero de la muestra.

1. Lavado del instrumento
  - a. De acuerdo a las recomendaciones de la Guía del Usuario.
2. Reinicie el MiSeq para resetear la memoria
  - a. Bajo las *Indicaciones del Instrumento* en el software de control del MiSeq, presione *Reboot* y espere (esto puede tomar 10 min).
  - b. El software de control del MiSeq comenzará a inicializar el instrumento después del reinicio



Cuando se haga esto aparecerá la *interface de Control*.

3. Descongele los reactivos
  - a. Ponga el cartucho de los reactivos y el buffer HT1 en un baño de agua a temperatura ambiente por 1 h. Después de descongelarlos manténgalos a 4°C hasta su uso.
    - **Pausa** El cartucho de reactivos descongelados de MiSeq puede ser mantenido por una semana a 4 °C.
  - b. Inspección del cartucho de reactivos: Invierta el cartucho diez veces, inspeccione si hay precipitados, y entonces golpeelo suavemente contra la mesa para eliminar cualquier burbuja.
  - c. Descongele los *primers* de secuenciación (Read1, Read2 e index) y la solución de NaOH 2M a temperatura ambiente. Ponga los *primers* sobre hielo después de descongelarlos y deje el NaOH 2M a temperatura ambiente hasta su uso.
4. Prepare la hoja de de la muestra
  - a. Abra una planilla MiSeq"SampleSheet.cvs con Notepad++ u otro editor de texto.
    - ▲ **Etapa crítica** La hoja de cálculo 'SampleSheet.csv' es un archivo de texto con los valores separados por coma (.cvs) pero no debe ser abierto con Microsoft Excel. Excel podría corromperlo, vaciando el formato del archivo.
  - b. Cambie el proyecto y la información específica de la muestra: [Encabezamiento] Investigador, Nombre del Proyecto, Nombre del Experimento, Fecha; [Datos] Identificación de la Muestra, Nombre de la Muestra, Índice e Índice2 (ver Fig. 8.11).
    - ▲ **Etapa crítica** Es una información importante es: [encabezado] Química, [Reads] y [Datos] las columnas de índice e índice2. Esta información tiene un impacto significativo sobre como se realiza la corrida. Toda la otra información puede cambiarse posteriormente si esta fuera errónea.
  - c. Después de completar la hoja de la muestra, chequee la integridad del archivo 'SampleSheet.csv' cargándolo en el software Illumina "Experimental Manager". Si puede ser cargado, entonces debe ser compatible con el MiSeq.
  - d. Transfiera el 'SampleSheet.csv' al MiSeq con un dispositivo USB.

- **Preparación de las bibliotecas de secuenciación (1.0 h)**

Esta sección describe la desnaturalización y dilución de las bibliotecas de secuenciación.

1. Listado general de muestras
    - a. Biblioteca control: biblioteca de control PhiX v3, 10 nM.
    - b. Grupo de bibliotecas (hasta 400 muestras), > 4 nM.
    - c. Siga las siguientes etapas para ambos, la biblioteca control PhiX y el grupo de bibliotecas.
  2. Descongele las bibliotecas y manténgalas sobre hielo.
  3. Diluya las bibliotecas de secuenciación a 4 nM con agua libre de nucleasa.
  4. Prepare una solución 0.1 M de NaOH.
    - a. 475 µL de H<sub>2</sub>O (grado ADN) y 25 µL de NaOH 2 M.
  5. Desnaturalice las bibliotecas de secuenciación
    - a. Mezcle 5 µL de la biblioteca + 5 µL de NaOH 0.1 M. La concentración final de la biblioteca es 2 nM.
    - b. Pipetee hacia arriba y hacia abajo diez veces para mezclar.
    - c. Incube por 5 min a temperatura ambiente.
  6. Diluya las bibliotecas desnaturalizadas (2 nM) a 20 pM.
    - a. Mezcle 10 µL de la biblioteca desnaturalizada con 990 µL de HT1 pre-enfriado. La concentración será de 20 pM.
  7. Mezcle la biblioteca PhiX (20 pM) con el grupo de librerías (20 pM) de manera que ellas hagan el 20 % y el 80 % de la mezcla final, respectivamente.
    - a. Mezcle 120 µL de la biblioteca PhiX con 480 µL del grupo de bibliotecas.
    - b. Ponga la mezcla sobre hielo hasta su uso.
      - **Pausa** Las bibliotecas diluidas se pueden mantener hasta un mes a -20 °C. Mayores tiempos de almacenamiento podrían provocar una reducción en la concentración y consecuentemente afectar los resultados de secuenciación.
- **Carga de la muestra y los primers sobre el cartucho de los reactivos**
1. Adición de los *primers* de secuenciación sobre el cartucho de reactivos.
    - a. Ubicación de los *primers*:  
 Read1 = celda 12.  
 Index = celda 13.  
 Read2 = celda 14.
      - ▲ **Etapa crítica** La numeración de las posiciones sobre el cartucho de los reactivos puede ser confusa. Tómese el tiempo necesario para estar seguro que se están usando las posiciones correctos.
    - b. Para cada *primer*: perforo el papel de Aluminio que cubre la celda seleccionada con la punta de la pipeta de 1,000 µL, y entonces transfiera 100 µL

del contenido de la celda a un tubo de centrifuga. Adicione 3.4  $\mu\text{L}$  del *primer* respectivo y mezcle bien. Transfiera la solución de nuevo a la celda donde se encontraba y mezcle. Repita para todos los *primers*.

2. Adición de la muestra al cartucho de reactivo
  - a. Perfore la celda No. 17 con una punta y adicione 600  $\mu\text{L}$  de la mezcla PhiX/pool.

- **Secuenciación (0.5 + 56 h)**

Esta sección describe el comienzo de la corrida de secuenciación.

1. Presione *Sequence* en la interface del software Control MiSeq y siga las instrucciones de la Guía del Usuario del System MiSeq para preparar/cargar la celda de flujo, cargando el cartucho de reactivo, haciendo referencia a la hoja de muestra e iniciando la corrida de la secuenciación.
2. Durante la secuenciación el progreso puede ser monitoreado abriendo el archivo de la corrida en el software Viewer analysis Sequence y mirar la corrida.

#### 8.4.10.4. Interpretación y solución de problemas

- **Preparar el Miseq y los metadatos**

Es importante asegurarse que se ha realizado un lavado del MiSeq antes de la secuenciación. La contaminación cruzada entre corridas puede ser un problema. Los estudios han demostrado que existen derrames de muestra de una corrida a la otra. Usualmente el derrame no tiene impacto sobre el análisis del amplicon 16S de los lodos activados, y por tanto el lavado predeterminado *Lavado Post Corrida* es aceptable entre lavados. Sin embargo, para muestras delicadas, considere hacer uno o dos *lavados de Mantenimiento* entre corridas y/o un lavado específico de la línea de muestra. Estos lavados son más exhaustivos y la contaminación sobrante se diluye. De lo contrario siga las instrucciones de lavado de la Guía del usuario del sistema MiSeq.

Un reinicio de MiSeq ayuda a reiniciar la computadora del instrumento, y disminuye la posibilidad de que se bloquee durante la secuenciación.

Tenga cuidado cuando descongele los reactivos del MiSeq. La calidad de los reactivos tiene un impacto sobre la calidad de la secuenciación, especialmente en la lectura del extremo 3'. La experiencia demuestra que la secuenciación puede aún tener éxito con reactivos que han sido mantenidos por 24 h a temperatura ambiente, pero no existen garantías.

El archivo 'SampleSheet.csv' indica al instrumento MiSeq cómo debe hacerse la corrida de la secuenciación, como demultiplexar las muestras, y algunos metadatos básicos relativos a las muestras. La hoja de metadatos no puede ser preparada por el software Illumina Experiment Manager cuando se usan adaptadores y códigos de barra no adquiridos de Illumina. El archivo 'SampleSheet.csv' debe ser preparado en un editor de texto tal como Notepad++. Busque una plantilla (template) online o cree el suyo propio desde el Illumina Experiment Manager. Para una información detallada acerca del archivo SampleSheet.csv vea Illumina Inc. (2013).

```
[Header]
IEMFileVersion,4
Investigator Name,SMK
Project Name, DNASense-NDJ-RHK
Experiment Name,J214
Date,08/11/15
Workflow,GenerateFASTQ
Application,FASTQ Only
Assay,TruSeq HT
Description
Chemistry,Amplicon

[Reads]
301
301

[Settings]

[Data]
Sample_ID,Sample_Name,index ,index2 ,Description
LIB-CP034,16SAMP-6380,ACGTGTAC,GAGCTCTC,bv13fr-337
```

**Figura 8.15** Ejemplo de un archivo. El archivo SampleSheet.csv ha sido abierto en Notepad++. Los títulos de la sección están marcados por [ ].

Explicación de la información crítica en el archivo 'SampleSheet.csv':

#### **Química, Amplicon**

La configuración del amplicon permite el uso de dos índices (index1 e index2)

#### **[Reads]**

**301**

**301**

Ordena al MiSeq que realice una secuenciación final pareada, donde cada lectura es de una longitud de 300 pb.

#### **Descripción de Sample-ID, Sample-name, index, index2**

Columna Sample\_ID de identificación de las muestras: La ID de las muestras.

Columna Sample-Name: El nombre de las muestras. La salida de los datos serán llamadas por estos nombres.

Columna Index: Index column: El *primer* código de barras leído de las muestras. Escriba la secuencia del código de barras. La presencia y longitud del código de barras le indica al secuenciador que se desea secuenciar el código de barras.

Columna Index2: Similar al anterior.

Columna Descripción: Notas acerca de las muestras.

- **Preparación de las bibliotecas de secuenciación**

En esta etapa las bibliotecas de secuenciación (la biblioteca de control PhiX y el grupo de bibliotecas) se desnaturalizan con un alto pH (NaOH) para obtener los amplicones de bibliotecas en forma de bandas simples. Los amplicones de la biblioteca necesitan estar en forma de bandas simples para que sean capturados por el MiSeq.

El pH es muy importante, y tanto si el valor es muy alto o muy bajo impedirán que los amplicones de la biblioteca sean capturados. Preferiblemente se debe usar NaOH 2 M.

Las bibliotecas se diluyen después de la desnaturalización. La concentración es extremadamente importante ya que ésta determina la cantidad de información producida. Una concentración de 20 pM produce aproximadamente de 18 a 25 millones de lecturas. Si la concentración es menor o mayor, la salida será proporcionalmente menor o mayor. Fuera del rango de 2 a 25 pM hay un gran riesgo que la corrida de la secuenciación falle completamente.

La biblioteca-control PhiX se usa para estimar el valor del error y para asistir en la calibración del instrumento durante la secuenciación. Esto es especialmente importante para los grupos de bibliotecas que tienen una baja complejidad. Baja complejidad significa que las secuencias analizadas tienen una composición similar. Como el gen 16S rARN tiene regiones conservadas, este es el caso de las bibliotecas de amplicones 16S.

- **Carga de la muestra y los primers en el cartucho de reactivos**

La adición de los *primers* de la secuenciación al cartucho de reactivos MiSeq es necesario cuando las bibliotecas de secuenciación son preparadas con adaptadores no comprados a Illumina. Los *primers* inician las lecturas de Read1, Read2 e Index. La corrida fallará si ellos no están presentes.

- **Secuenciación**

Después de que haya comenzado la secuenciación, aparecerán las primeras estadísticas después de aproximadamente 4 h. El rendimiento por muestra aparecerá después de 32 h y la corrida se completará en 56 h.

La densidad del grupo (cluster) revela la producción estimada de la corrida. Como promedio una corrida preparada por el protocolo anterior producirá entre 700-1,000 k mm<sup>-2</sup>, lo que producirá de 17 a 25 millones de lecturas PE.

El cluster PF revela qué parte de la información cumple con los requisitos básicos de calidad interna. Con la secuenciación de las bibliotecas del amplicon V1-3 16S rRNA Amplicon, un valor de > 90% es estándar. Esto podría cambiar un poco durante la secuenciación.

Valores de %  $\geq$  Q30  $\geq$  Q30 revelan el número de bases en toda la serie que se espera tengan un puntaje de calidad superior a Q30. Esto cambia bastante durante la secuenciación. Para Read1 el promedio es usualmente > 70 % y para Read2 el promedio es usualmente > 60 %.

La tasa de error explica la tasa de error real medida en la secuencia de la biblioteca de control PhiX. Durante la secuenciación, el MiSeq reconoce los amplicones de la biblioteca de PhiX y los compara a un genoma PhiX de referencia, para detectar y medir errores en la secuenciación. En términos simples, el puntaje de calidad es la calidad teórica donde la tasa de error es la calidad empírica. La estadística alineada explica cuanto de la biblioteca control PhiX representa del total de la corrida. Esta debe estar próxima a 20 % si se siguió el protocolo anterior.

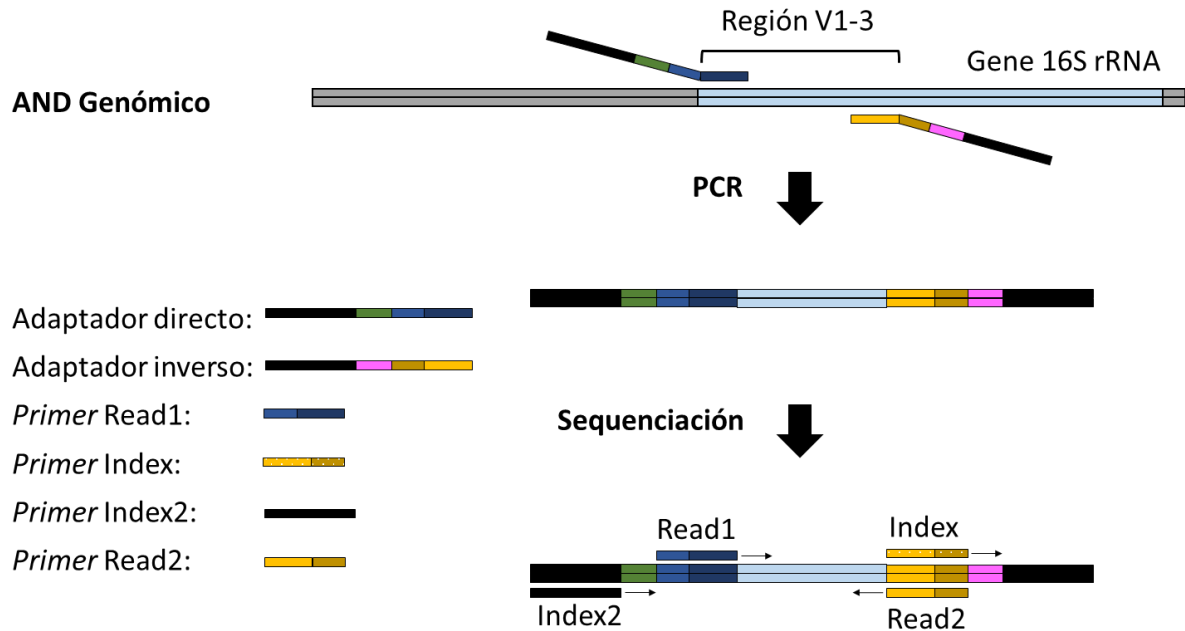
### 8.4.11 Diseño de adaptadores de Illumina para la secuenciación del amplicon 16S

La sección describe los diseños de *primers*/adaptadores y las funciones de las diferentes partes.

Para la preparación de las bibliotecas del amplicon 16S rARN, se usan los llamados adaptadores. Ellos vienen en pares, consistiendo de un adaptador en dirección directa (*forward*) y otro en inversa (*reverse*). Cada adaptador consiste de una parte del adaptador y una parte del *primer*. Durante la PCR de la biblioteca las partes del *primer* de los adaptadores directo e inverso se usan para amplificar específicamente la región variable 1 – 3 (VI-3) del gen 16S rARN (Figura 8.7). Los amplicones de la biblioteca final contienen las secuencias del VI-3 16S rARN y las partes del adaptador. Los

*primers* son adoptados del Proyecto de Microbioma Humano (HMP, 2010) y son llamados 27F y 534R. Las partes del adaptador son adoptadas de Caporaso *et al.* (2011; 2012) y de Illumina Inc. (2014a).

Durante la secuenciación, los *primers* de la secuenciación se unen a los adaptadores e inician la secuenciación (Figura 8.16).



**Figure 8.16** Vista conceptual de los oligos usados en la secuenciación del amplicón 16S. Los adaptadores se introducen durante la PCR y el resto de los oligos se usan para la secuenciación. Las partes coloreadas de los adaptadores/*primers* representan diferentes secuencias funcionales.

En total, se leen cuatro secuencias: lecturas de Read1 y Read2, las cuales abarcan la parte del gen VI-3 16S rARN y componen las secuencias de las lecturas finales pareadas, y las lecturas index y index2, que componen la parte del código de barras que se utiliza para identificar de dónde se origina cada amplicón de la biblioteca. La parte del código de barras se procesa directamente en el MiSeq y no es parte de la salida de datos.

Los adaptadores y los *primers* son oligos de ADN sintetizados, los cuales pueden ser ordenados a cualquier

compañía de reactivos. Las secuencias de los respectivos oligos de ADN se pueden encontrar en la Figura 8.17. Las diferentes partes de los oligos tienen nombres y un papel designado en la preparación y/o secuenciación de la biblioteca. La parte index de los adaptadores (NNNNNNNN) es diferente para cada muestra que va a ser secuenciada. Por ejemplo, si se van a secuenciar 96 muestras entonces usualmente habrá 8 adaptadores directos y 12 adaptadores inversos y todos tienen un índice único. De aquí, se puede obtener un total de 96 combinaciones únicas de adaptadores directos e inversos.

### Adaptador Directo



### Adaptador Inverso



### Primer de secuenciación Read1



### Primer de secuenciación Index



### Primer de secuenciación Read2



### Index2 sequencing primer

No requiere primer.

**Figura 8.17** Los adaptadores y *primers* son oligos de ADN sintetizados. Se muestran las secuencias de los respectivos oligos de ADN. Los diferentes oligos tienen nombres y papeles designados en la preparación y/o secuenciación. La parte indexada de los adaptadores (NNNNNNNN) es diferente para cada muestra que va a ser secuenciada.

## 8.5 OTROS MÉTODOS

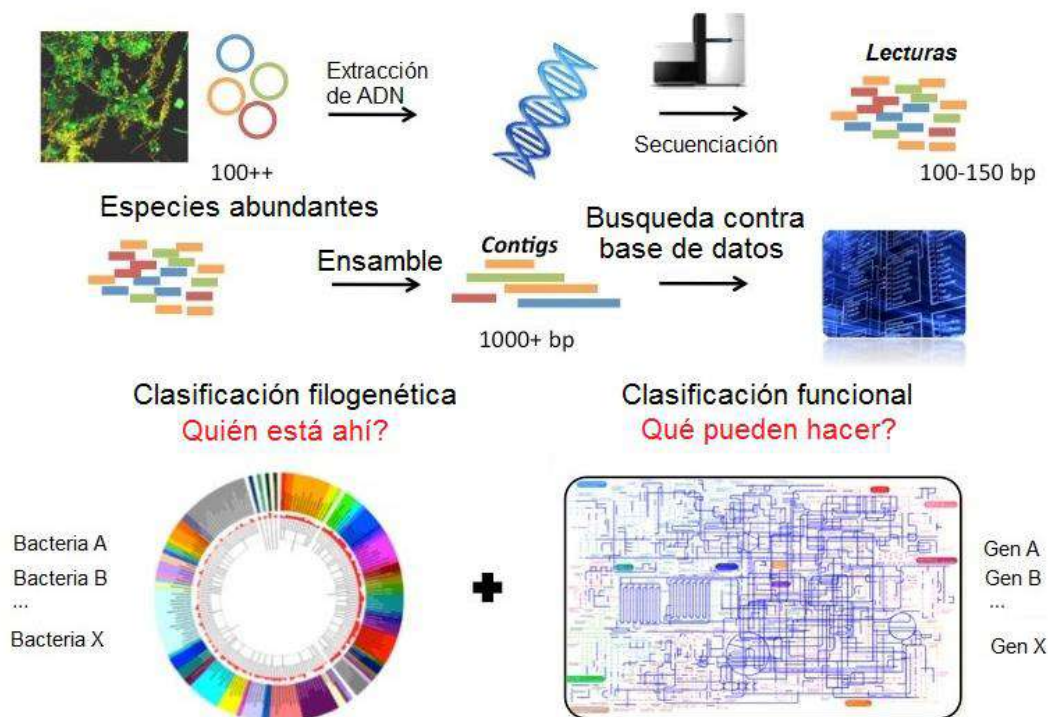
La Hibridación Fluorescente *in situ* (siglas en inglés FISH) es un método independiente para visualizar microorganismos mediante sondas de oligonucleótidos 16S rARN fluorescentemente marcados. FISH es de por sí un método muy poderoso para el análisis de comunidades microbianas, pero es también una técnica de apoyo excelente para validar resultados de secuenciación de amplicon. FISH se describe en detalle en el Capítulo 7.

Existen técnicas avanzadas basadas en la secuenciación, tales como la metagenómica, metatranscriptómica y

metaproteómica, que posibilitan el análisis independiente del cultivo y de funciones en comunidades microbianas. Estas técnicas están comenzando a ser aplicadas en sistemas de lodos activados para la investigación de las comunidades microbianas. Sin embargo, estas técnicas son complicadas y no lo suficientemente maduras para un uso generalizado en un futuro inmediato. Por lo tanto, la descripción de estas técnicas se limitará a una visión general.

Metagenómica, o genómica ambiental (Wooley *et al.*, 2010), es el estudio de todo el ADN de la comunidad recobrado directamente de muestras ambientales. La Figura 8.18 muestra los pasos o etapas del proceso.





**Figura 8.18** Vista general de las etapas o fases de la metagenómica y el resultado potencial.

El ADN de la comunidad se extrae y purifica antes de ser secuenciado, en este ejemplo por la plataforma Illumina, proporcionando lecturas pequeñas. Las lecturas son ensambladas en secuencias contiguas progresivamente más largas (contigs). Estas pueden ser aplicadas para obtener información acerca de la taxonomía y la función de los miembros de la comunidad comparando la información de la secuencia con bases de datos de referencia. Sin embargo, desafortunadamente la información resultante es muy sesgada. La clasificación taxonómica correcta de las secuencias de ADN requiere de genomas anotados y estrechamente relacionados en las bases de datos de referencia. En la actualidad relativamente pocos genomas están disponibles en las bases de datos de referencia, de manera que la clasificación resultante es muy poco fidedigna. Además una caracterización funcional detallada de los genes, también es difícil, una vez más debido a bases de datos de referencia incompletas (Albertsen *et al.*, 2013).

La metatranscriptómica y metaproteómica describen series completas de proteínas y genes expresados en los microorganismos en una muestra ambiental. Estas técnicas son raramente aplicadas en sistemas de tratamiento de aguas residuales por varias razones. La razón principal es la carencia de buenos genomas de referencia que son un requisito para un estudio confiable de las proteínas y genes expresados. Además, para las metaproteómicas, es difícil alcanzar eficiencias suficientemente altas en la extracción de proteínas (Seifert *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2014).

Las tecnologías de microarrays o micromatriz se consideraban muy prometedoras para la conducción de análisis taxonómicos y funcionales de comunidades, pero el rápido desarrollo de las tecnologías de secuenciación ha dejado atrás estas técnicas.

## Referencias

- Agilent Technologies (2012). Agilent 2200 TapeStation User Manual edition 8. Manual Part number G2966-90001.
- Agilent Technologies (2013). Agilent D1000 ScreenTape System Quick Guide edition 10. Manual Part number G2964-90032 Rev. B.
- Agilent Technologies (2015). Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide edition 6. Manual Part number G2964-90040 Rev. D.
- Albertsen, M., Karst, S.M., Ziegler, A.S., Kirkegaard R.H., Nielsen P.H. (2015). Back to Basics – The influence of DNA extraction and primer choice on phylogenetic analysis of activated sludge communities. *PLoS ONE* 10:e0132783.
- Albertsen M., Saunders, A.M., Nielsen K.L. y Nielsen P.H. (2013): Metagenomes obtained by "deep sequencing" - what do they tell about the EBPR communities? *Wat. Sci. Tech.*, 68: 1959-1968.
- Angly, F.E., Dennis, P.G., Skarshewski, A., Vanwonderghem, I., Hugenholtz, P., y Tyson, G.W. (2014). CopyRighter: a rapid tool for improving the accuracy of microbial community profiles through lineage-specific gene copy number correction. *Microbiome*, 2, 11.
- Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A. J., y Weightman, A.J. (2005). At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7724-7736.
- Basu, C. (2015). PCR primer design (New York: Humana Pr).
- Beers, E.H. Van, Joosse, S.A., Ligtenberg, M.J., Fles, R., Hogervorst, F.B.L., Verhoef, S., y Nederlof, P.M. (2006). A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *British J. Cancer* 94: 333-337.
- Beller, H.R., Kane, S.R., Legler, T.C., y Alvarez, P.J.J. (2002). A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environ. Sci. & Technol.* 36: 3977-3984.
- Bessetti, J. (2007). An introduction to PCR inhibitors. *J. Microbiol. Meth.* 28: 159-167.
- Bollet C, Gevaudan M.J., de Lamballerie X., Zandotti C., de Micco P. 1991. A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria. *Nucleic Acids Research* 19:1955.
- Brown, C.T., Hug, L.A. Thomas, B.C., Sharon, I., Castelle, C.J., Singh, A., ... Banfield, J. F. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15 % of domain Bacteria. *Nature*, 523: 208-211.
- Bru, D., Sarr, A., y Philippot, L. (2007). Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5971-5974.
- Brzoska, A.J., y Hassan, K.A. (2014). Quantitative PCR for detection of mRNA and gDNA in environmental isolates. In *Environmental Microbiology*, I.T. Paulsen, y A.J. Holmes, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 25-42.
- Bürgmann H, Pesaro M, Widmer F, Zeyer J. (2001). A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *J Microbiol. Methods* 45: 7-20.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55: 611-622.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., ... Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 7: 335-6.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal* 6: 1621-1624.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *PNAS* 108. Suppl 1, 4516-4522.
- Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J. a., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Tiedje, J.M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42: 633-642.
- Cock, P.J.A., Fields, C.J., Goto, N., Heuer, M.L., y Rice, P.M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa / Illumina FASTQ variants, *Nucleic Acids Research* 38: 1767-1771.
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M. y Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* Doi: 10.1038/nature16461.
- DeAngelis M.M., Wang D.G., Hawkins T.L. (1995). Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research* 23: 4742-4743.
- Dominiak, D.M., Nielsen, J.L., y Nielsen, P.H. (2011). Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environ. Microbiol.* 13: 710-721.
- Dueholm, M.S., Albertsen, M., D'Imperio, S., Tale, V.P., Lewis, D., Nielsen, P.H., y Nielsen, J.L. (2014). Complete genome sequences of *Pseudomonas monteilii* SB3078 and SB3101, two benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacteria used for bioaugmentation. *Genome Announc.* 2: 524-14.
- Dueholm, M.S., Marques, I.G., Karst, S.M., D'Imperio, S., Tale, V.P., Lewis, D., Nielsen, P.H., y Nielsen, J.L. (2015). Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Biores. Technol.* 186: 192-199.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10: 996-8.
- El Fantroussi, S., y Agathos, S.N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol* 8: 268-275.
- Farrelly, V., Rainey, F.A, y Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2798-2801.
- Faust, K., y Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews. Microbiology*, 10, 538-50.
- Faust, K., Lahti, L., Gonze, D., de Vos, W. M., y Raes, J. (2015). Metagenomics meets time series analysis: unraveling microbial community dynamics. *Current Opin Microbiol.*, 25: 56-66.
- Filippidou, S., Junier, T., Wunderlin, T., Lo, C-C., Li, P-E., Chain, P.S., Junier, P. (2015). Under-detection of endospore-forming Firmicutes in metagenomic data. *Comput. and Structural Biotechnol. J.* 13: 299-306.
- Fisher, S., Barry, A., Abreu, J. (2011). A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biology*, 12, R1 doi:10.1186/gb-2011-12-1-r1
- Flynn, J. M., Brown, E. a., Chain, F. J. J., MacIsaac, H. J., y Cristescu, M. E. (2015). Toward accurate molecular identification of species in complex environmental samples: testing the performance of sequence filtering and clustering methods. *Ecol. Evol.*, 5: 2252-2266.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., y Nielsen, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res.* 30: 1749-1758.
- Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., y Peng, Y. (2015). Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 140: 85-98.
- Gibson, D.J., Ely, J.S., Collins, S.L. (1999). The core-satellite species hypothesis provides a theoretical basis for Grime's

- classification of dominant, subordinate, and transient species. *J. Ecol.* 87: 1064-1067.
- Gilbert, E.M., S. Agrawal, S.M. Karst, H. Horn, P.H. Nielsen, S. Lackner (2014). Low temperature partial nitrification/anammox in a moving bed biofilm reactor treating low strength wastewater. *Environ. Sci. Technol.*, 48: 8784-8792.
- Green, M.R., Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Grime, J. (1998). Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *J. Ecol.* 86: 902-910.
- Guillén-Navarro, K., Herrera-López, D., López-Chávez, M.Y., Cancino-Gómez, M., Reyes-Reyes, A.L. (2015). Assessment of methods to recover DNA from bacteria, fungi and archaea in complex environmental samples. *Folia Microbiol.* 60: 551-558.
- Guo, F., Zhang, T. (2013). Biases during DNA extraction of activated sludge samples revealed by high throughput sequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 4607-4616.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., y Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 88: 7276-7280.
- Horz, H.P., Vianna, M.E., Gomes, B.P.F.A., y Conrads, G. (2005). Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: General implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5332-5337.
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., y Lin, S. (2010). Serious overestimation in quantitative pcr by circular (supercoiled) plasmid standard: Microalgal pna as the model gene. *PLoS ONE* 5, e9545.
- Humbert, S., Zopfi, J., y Tarnawski, S.-E. (2012). Abundance of anammox bacteria in different wetland soils. *Environ. Microbiol. Rep.* 4: 484-490.
- Huse, S. M., Welch, D. M., Morrison, H. G., y Sogin, M. L. (2010). Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol.* 12: 1889-1898.
- Illumina Inc. (2013) MiSeq Sample Sheet, Quick Reference Guide, Part # 15028392 Rev. J
- Illumina Inc. (2014a). Illumina Customer Sequence Letter. Oligonucleotide sequences © 2007-2013 Illumina, Inc. All rights reserved. Derivative works created by Illumina customers are authorized for use with Illumina instruments and products only. All other uses are strictly prohibited.
- Illumina Inc. (2014b) MiSeq System User Guide, Part # 15027617 Rev. O
- Illumina, Inc. (2015). An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology, www.illumina.com
- Janda, J. M., y Abbott, S. L. (2007). Minireview: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2761-2764.
- Jensen S.H., A. Stensballe, P.H. Nielsen, F.-A. Herbst (2014). Metaproteomics: Evaluation of protein extraction from activated sludge. *Proteomics* 14(21-22), 2535-2539.
- Hadfield, J. (2012). How do SPRI beads work? <http://coregenomics.blogspot.dk/2012/04/how-do-spri-beads-work.html>
- Human Microbiome Project (HMP) (2010). Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group (2010). 16S 454 Sequencing Protocol HMP Consortium. Version 4.2.2.
- Juretschko, S., Purkhold, U., Pommerening-ro, A., Schmid, M. C., Koops, H., y Wagner, M. (2000). Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5368-5382.
- Kim, J., Lim, J., y Lee, C. (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances* 31: 1358-1373.
- Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L., y Gerba, C.P. (2014). Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes identification of potential viral indicators. *Sci. Total Environ.* 488-489: 290-296.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., y Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, e1.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Medicine* 27: 95-125.
- Laureni, M., Weissbrodt, D.G., Szivák, I., Robin, O., Nielsen, J.L., Morgenroth, E., Joss, A. (2015). Activity and growth of anammox biomass on aerobically pre-treated municipal wastewater. *Wat. Res.*, 80: 325-336.
- Legendre, P., y Gallagher, E. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129: 271-280.
- Li, X., Wu, Y., Zhang, L., Cao, Y., Li, Y., Li, J., ... Wu, G. (2014). Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Analytical Biochemistry*, 451: 18-24.
- Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G., Abraham, A.G., Aziz, M., Hsueh, P.-R., Huang, Y.-T., Busch, J.D., Lamit, L.J., Gehring, C.A., et al. (2012). FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.* 12: 255.
- Love, M.I., Huber, W., y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15: 550.
- Lozupone, C.A., y Knight, R. (2008). Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 557-578.
- Ludwig, W., y Schleifer, K.-H. (2000). How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 556-562.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2006). *Brock Biology of Microorganisms*, 11<sup>th</sup> ed. Pearson Education International. ISBN 0131968939.
- Magurran, A. E. (2004). *Measuring biological diversity*. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., y Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 1-12.
- Marsh, T.L., 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 323-327.
- Marzorati, M., Wittebolle, T., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 10: 1571-1581.
- Matsuda, K., Tsuji, H., Asahara, T., Kado, Y., y Nomoto, K. (2007). Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 32-39.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., ... Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal*, 6: 610-618.
- McIlroy, S.J., Saunders, A.M., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., Hansen A.A., Karst, S.M., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H. (2015). MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. *Database* bav062. doi: 10.1093/database/bav062.



- McMaster, G.K., Carmichael, G.G. (1977). Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *PNAS* 74: 4835-4838.
- McMurdie, P.J., y Holmes, S. (2013). Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 8, e61217.
- Mendell, J.E., Clements, K.D., Choat, J.H., y Angert, E.R. (2008). Extreme polyploidy in a large bacterium. *PNAS* 105: 6730-6734.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., Ghiorse, W.C. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4715-4724.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 317-322.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A., y Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148: 257-266.
- Nanodrop Technologies, Inc. (2007). ND-1000 Spectrophotometer V3.3 User's manual, rev.3.
- Nolan, T., Hands, R.E., y Bustin, S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1: 1559-1582.
- Nyren, J., Svanvik, N., y Kubista, M. (1998). The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers* 46: 39-51.
- Okano, Y., Hristova, K.R., Leutenegger, C.M., Jackson, L.E., Denison, R.F., Gebreyesus, B., Lebauer, D., y Scow, K.M. (2004). Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1008-1016.
- Oksanen, J., Blanchet, G. F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., ... Wagner, H. (2015). Vegan: *Community Ecology Package*. <http://r-forge.r-project.org/projects/vegan/>.
- Pace, N. R., Sapp, J., y Goldenfeld, N. (2012). Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *PNAS*, 109: 1011-1018
- Padmanaban, A., Inche, A., Gassmann, M., Salowsky, R.. 2013. High-Throughput DNA Sample QC Using the Agilent 2200 TapeStation System. *J. Biomol. Techn. JBT* 24:S41.
- Panaro, N.J., Yuen, P.K., Sakazume, T., Fortina, P., Kricka, L.J., Wilding, P. 2000. Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the Agilent 2100 bioanalyzer. *Clinical Chemistry* 46: 1851-1853.
- Pecoraro, V., Zerulla, K., Lange, C., y Soppa, J. (2011). Quantification of ploidy in proteobacteria revealed the existence of monoploid, (mero-)oligoploid and polyploid species. *PLoS ONE*, 6, e16392. doi:10.1371/journal.pone.0016392.
- Polz, M.F., y Cavanaugh, C.M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR, *Appl Environ Microbiol.* 64(10): 3724-3730.
- Pruesse, E., Peplies, J., y Glöckner, F. O. (2012). SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28(14): 1823-1829.
- Qiu, X., Wu, L., Huang, H., Donel, P. E. M. C., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., y Zhou, J. (2001). Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol.* 67(2): 880-887.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41. doi:10.1093/nar/gks1219
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J., y Turnbaugh, P. J. (2011). Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics*, 12: 38.
- Pruesse, E., Peplies, J., y Glöckner, F. O. (2012). SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28(14): 1823-1829.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 62: 142-60.
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. In *Rapid Cycle Real-Time PCR*, P.D. med S. Meuer, P.D.C. Wittwer, y D.K.-I. Nakagawara, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 21-34.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., y Smyth, G.K. (2010). EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26: 139-40.
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W., (1997). The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol.* 63: 4704-4712.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilic-Stojanovic, M., Kekkonen, R. a., Palva, A., de Vos, W.M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J. Microbiological Methods* 81: 127-34.
- Saunders, A.M., Albertsen, M., Vollertsen, J., y Nielsen, P.H. (2015). The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2015.117
- Schloss, P.D. y Handelsman, J. (2005). Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol.* 6: 229.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., ... Weber, C.F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 7537-41.
- Schriewer, A., Wehlmann, A., y Wuertz, S. (2011). Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *J. Microbiol. Methods* 85: 16-21.
- Seifert, J.F.-A. Herbst, P.H. Nielsen, F.J. Planes, M. Ferrer, M. von Bergen (2013) Bioinformatic progress and applications in metaproteogenomics for bridging the gap between genomic sequences and metabolic functions in microbial communities. *Proteomics* 13: 2786-2804. doi: 10.1002/pmic.201200566.
- Singer, V.L., Jones, L.J., Yue, S.T., Haugland, R.P. (1997). Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical Biochemistry* 249: 228-238.
- Smith, S., Morin, P.A. (2005). Optimal storage conditions for highly dilute dna samples: a role for trehalose as a preserving agent. *J. Forensic Sci.*, 50: 1101-1108.
- Souazé, F., Ntoudou-Thomé, A., Tran, C.Y., Rostène, W., y Forgez, P. (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *BioTechniques* 21: 280-285.
- Stults, J.R., Snoeyenbos-West, O., Methe, B., Lovley, D.R., y Chandler, D.P. (2001). Application of the 5 fluorogenic exonuclease assay (taqman) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2781-2789.
- Tebbe, C.C., y Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol* 59(8): 2657-2665.
- Thermo Scientific (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity, T042-TECHNICAL BULLETIN, T042 Rev 1/11.

- Thermo Scientific (2015a), Qubit dsDNA HS Assay Kits – User Guide, MAN0002326, P32851, Revision: B.0
- Thermo Scientific (2015b), Qubit dsDNA BR Assay Kits – User Guide, MAN0002325, P32850, Revision: A.0
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb. Inform. Exp.* 2:3. 10.1186/2042-5783-2-3.
- Thompson, I.P., Van Der Gast, C.J., Ciric, L., y Singer, A.C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ. Microbiol.* 7: 909-915.
- Tsai, Y., Olson, B. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1070-1074.
- Tullis, R.H., Rubin, H. (1980). Calcium protects DNase I from proteinase K: a new method for the removal of contaminating RNase from DNase I. *Analyt. Biochem.* 107: 260-264.
- Větrovský, T., y Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE* 8. e57923. doi:10.1371/journal.pone.0057923.
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., y Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* 56: 277-286.
- Wang, Y., y Qian, P.-Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16s ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE* 4, e7401. doi:10.1371/journal.pone.0007401.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22: 474-476.
- Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(10): 3741-3751.
- Woese, C.R., y Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *PNAS*, 74: 5088-90.
- Wooley, J.C., Godzik, A., Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS Comput. Biol.* 6(2): e1000667. doi:10.1371/journal.
- Zhang, T., y Fang, H.H.P. (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 281-289.
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 316-322.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., y Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucl. Acids Res.* 32: e103–e103.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N. y Smith, G.M. (2007) *Analysing Ecological Data*. Springer, New York.



En los últimos veinte años, los conocimientos de los procesos de tratamiento de aguas residuales han avanzado y evolucionado partiendo de enfoques inicialmente empíricos a basarse en principios y fundamentos químicos, microbiológicos, y de ingeniería de procesos físicos y biotecnológicos, que frecuentemente involucran técnicas y métodos de laboratorio y experimentales. La mayoría de esos métodos y técnicas experimentales y de laboratorio han alcanzado una madurez tal que han sido aceptados como herramientas confiables para la de investigación y práctica del tratamiento de aguas residuales.

Para los profesionales y expertos que trabajan en el sector, especialmente para las nuevas generaciones de jóvenes ingenieros y científicos que ingresan en el campo del tratamiento de aguas residuales, la cantidad, complejidad y diversidad de estos nuevos desarrollos puede ser abrumadora, particularmente en países en vías de desarrollo y en transición en los cuales no es sencillo acceder a cursos avanzados de laboratorio en tratamiento de aguas residuales. Más aún, la información requerida y de interés generalmente se encuentra dispersa en diversas publicaciones científicas y raramente en libros de texto o guías de laboratorio. Este libro busca solucionar esta deficiencia al compilar e integrar diversos métodos experimentales innovadores desarrollados por diferentes grupos de investigación y de profesionales de todo el mundo y que han sido aplicados en la práctica e investigación de los procesos de tratamiento de aguas residuales.

Este libro intitulado *Métodos Experimentales para el Tratamiento de Aguas Residuales* forma parte del programa académico de cursos a distancia en ingeniería sanitaria ofrecidos por IHE Delft Institute for Water Education y, como tal, puede ser utilizado de manera conjunta con los videos de los cursos en línea desarrollados por los autores de este mismo libro, que incluyen guías que describen las mejores prácticas experimentales. Este libro ha sido escrito para estudiantes universitarios y de post-grado, investigadores, personal de laboratorio, operadores de plantas, consultores y para todos aquellos profesionales que laboran en el campo del tratamiento de aguas residuales.

*“Este libro va a contribuir significativamente al establecimiento de un lenguaje común entre los científicos y profesionales del sector del tratamiento de aguas residuales, mejorando y expandiendo la comunicación más allá de su campo específico de especialización, llevándola a una escala global.”*

Prof.Dr. Helmut Kroiss, President IWA

#### Autores y revisores

Carlos M. López-Vázquez  
Damir Brdjanovic  
Eldon R. Rene  
Elena Ficara  
Elena Torfs  
Eveline I.P. Volcke  
George A. Ekama  
Glen T. Daigger  
Gürkan Sin  
Henri Spanjers  
Holger Daims  
Ilse Y. Smets  
Imre Takács  
Ingmar Nopens  
Jeppe L. Nielsen  
Jiri Wanner  
Juan A. Baeza  
Kartik Chandran  
Krist V. Gernaey  
Laurens Welles  
Mads Albertsen  
Mari K.H. Winkler  
Mark C.M. van Loosdrecht  
Mathieu Spérandio  
Morten S. Dueholm  
Nancy G. Love  
Per H. Nielsen  
Peter A. Vanrolleghem  
Piet N.L. Lens  
Rasmus H. Kirkegaard  
Robert J. Seviour  
Sebastiaan C.F. Meijer  
Sophie Balemans  
Søren M. Karst  
Sylvie Gillot  
Tessa P.H. van den Brand  
Tommaso Lotti  
Yves Comeau

#### Editado por



#### Financiado por

BILL & MELINDA  
GATES foundation



Ministry of Foreign Affairs of the  
Netherlands



www.iwapublishing.com  
ISBN 9781780409269 (Hardback)  
ISBN 9781780409252 (eBook)

ISBN 978-1-78040-926-9



9 781780 409269